

**Beiträge zur Steigerung der industriellen  
Verwendung mikrobieller Lipasen:  
Produktion und Immobilisierung sowie  
Entwicklung eines quantitativen  
Nachweissystems**

Von der Fakultät für Umweltwissenschaften und Verfahrenstechnik der  
Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus – Senftenberg zur  
Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Master of Science (M.Sc.)

**Susann Barig, geb. Koall**

aus Hoyerswerda, Sachsen

Gutachter:

Prof. Dr.-Ing. Klaus Schnitzlein

Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Peter Stahmann

Prof. Dr. rer. nat. Marion Ansorge-Schumacher

Vorsitzender:

Prof. Dr.-Ing. Ulrich Riebel

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2014

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Technische Mikrobiologie der Fakultät für Naturwissenschaften an der Hochschule Lausitz (FH), jetzt Brandenburgische Technische Universität Cottbus - Senftenberg. In enger Kooperation mit dem Lehrstuhl für Chemische Reaktionstechnik der Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus wurde diese Dissertation möglich.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Schnitzlein für seine intensive Unterstützung während der gesamten Promotionszeit. Seine Bereitschaft zur Diskussion und fortwährenden Auseinandersetzung mit dem Thema haben entscheidend zum Gelingen beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Stahmann, in dessen Arbeitsgruppe die Studien für die vorliegende Dissertation durchgeführt wurden, möchte ich mich vor allem bedanken. Die fruchtbaren Diskussionen, die intensive Begleitung und die fachliche und menschliche Unterstützung, die ich in den letzten Jahren erfahren durfte, haben mir Mut gegeben und den Fortgang der Arbeit unterstützt.

Frau Prof. Dr. Marion Ansorge-Schuhmacher von der TU Dresden gilt mein großer Dank für die Begutachtung der vorliegenden Dissertation.

Die Finanzierung des Projektes erfolgte durch Zielvereinbarungsmittel des Landes Brandenburg. Für diese Unterstützung bedanke ich mich herzlich.

Herrn Prof. Dr. Vladimir Mirsky möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Etablierung und Charakterisierung des Lipase Nachweissystems danken.

Dank sage ich Romy Alisch und Manja Schiemann, die ihre Masterarbeiten in der Arbeitsgruppe Technische Mikrobiologie durchgeführt haben. Durch ihr Engagement, ihre Ideen und ihre wertvolle Arbeit haben sie einen wichtigen Beitrag geleistet.

Ebenfalls möchte ich Susanne Nieland und Hans-Michael Siebert für die sehr gute Arbeits- und Büroatmosphäre sowie ihre Unterstützung durch interessante Diskussionen und ihre Hilfe bei Labor-technischen Problemen danken.

Bei den derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Chemische Reaktionstechnik der Brandenburgischen Technischen Universität möchte ich mich für die Unterstützung durch anregende Diskussionen und Denkanstöße bedanken. Im Besonderen sind das Herr PD Dr. Reiner Schmid, Sandra Schröter und Marco Muth. Hervorheben möchte ich die sehr gute Zusammenarbeit mit Mahesh Huddar, welcher mir bei der Durchführung verschiedener Experimente geholfen hat und unsere Enzymimmobilisate in seinen Reaktorsystemen testete.

Für die gute Arbeitsatmosphäre sorgten alle Mitarbeiter innerhalb der Fakultät für Naturwissenschaften an der Hochschule Lausitz (FH). Herzlich möchte ich Lutz Wilk danken, der mir bei der technischen Umsetzung vieler Details geholfen hat. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im linken Flügel der ersten Etage für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt den Studenten und Praktikanten, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben. Besonders möchte ich Janine Schubert und Ringo Püschel danken. Beide waren eine große Unterstützung.

Vielen lieben Dank auch an meine Familie und meine Freunde, welche mich durchgehend unterstützt haben. Vor allem danke ich Steffen, der die Höhen und Tiefen mit mir gemeistert hat sowie meinen kleinen Sternen, Marika und Konrad, für die fantasievollen und leuchtenden Stunden.

## Abkürzungsverzeichnis

BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca.	circa
CLEAs	<i>Cross Linked Enzyme Aggregates</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Enzym/ Extinktion
EC	<i>Enzyme Commission</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
Hrsg.	Herausgeber
IEF	Isoelektrische Fokussierung
MM	Minimalmedium
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
P	Produkt
pNPPalm	<i>para</i> -Nitrophenyl-Palmitat
pNPProp	<i>para</i> -Nitrophenyl-Propionat
S	Substrat
SDS PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TA	Threonin Aldolase
TLL	<i>Thermomyces lanuginosus</i> Lipase
TM	<i>Trademark</i>
ÜS	Überstand
UV	Ultraviolett
v	Volumen
w	Masse
z.B.	zum Beispiel

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Danksagung</b>	<b>i</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>iii</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>iv</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>4</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>2. Struktur und Reaktionsmechanismus von Lipasen am Beispiel der <i>Thermomyces lanuginosus</i> Lipase</b>	<b>12</b>
<b>3. Selektive Kultivierung von Lipase-bildenden Pilzen in einem System mit minimierter Steriltechnik</b>	<b>17</b>
3.1 Mikroorganismen als Produktionseinheiten von Enzymen und niedermolekularen Stoffwechselprodukten - Stand und Ziele	17
3.2 Kultivierungsverfahren mit minimierter Steriltechnik	19
3.3 Kompostisolat <i>Phialemonium curvatum</i> AW02, ein Lipase-bildender Pilz	21
3.4 Charakterisierung und Optimierung des Kultivierungssystems mit minimierter Steriltechnik	22
3.4.1 Charakterisierung der Selektivbedingungen	22
3.4.2 Robustes Wachstum unter Selektivbedingungen im 100-l- und 350-l- Maßstab	23
3.5 Charakterisierung der <i>Phialemonium curvatum</i> AW02 Lipasen	27
3.6 Wachstum weiterer Mikroorganismen auf dem Selektivmedium	33
3.7 Wirtschaftliche Potentiale	34
3.8 Schlussfolgerung und Ausblick	37
<b>4. Wasserfreie Immobilisierung von Enzymen auf chemisch variablen Oberflächen ohne Funktionalisierung des Trägers oder der Enzyme</b>	<b>39</b>
4.1 Immobilisierungsmethoden im Überblick - Stand und Ziele	39
4.2 Charakterisierung der rekombinanten <i>Thermomyces lanuginosus</i> Lipase	47
4.3 Wasserfreies Einschlussverfahren zur Immobilisierung von Enzymen	50
4.3.1 <i>Thermomyces lanuginosus</i> Lipase im wasserfreien Einschlussverfahren	52
4.3.2 <i>Ashbya gossypii</i> Threonin Aldolase im wasserfreien Einschlussverfahren	57
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick	58

<b>5.</b>	<b>Entwicklung eines quantitativen Mikrotiter-Lipase-Nachweissystems</b>	<b>60</b>
5.1	Erschließung lipolytischer Enzyme und deren Aktivitätsbestimmung - Stand und Ziele	60
5.2	Entwicklung und Charakterisierung eines quantitativen turbidimetrischen Mikrotiter-Lipase-Nachweissystems	63
5.2.1	Das Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem zur Quantifizierung von Enzymaktivität	66
5.2.2	Charakterisierung des quantitativen Mikrotiter-Lipase- Nachweissystems	69
5.3	Anwendungen des quantitativen Mikrotiter-Lipase-Nachweissystems	72
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick	73
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>86</b>
7.1	Original Publikation: Barig S., Alisch R., Nieland S., Wuttke A., Gräser Y., Huddar M., Schnitzlein K., Stahmann K.-P. 2011. Monoseptic growth of fungal lipase producers under minimized sterile conditions: Cultivation of <i>Phialemonium curvatum</i> in 350 L scale. Engineering in Life Sciences. 11(4): 387–394.	87
7.2	Original Publikation: Barig S., Funke A., Merseburg A., Schnitzlein K., Stahmann K.-P. 2014. Dry entrapment of enzymes by epoxy or polyester resins hardened on different solid supports. Enzyme and Microbial Technology. 60:47-55.	96
7.3	Original Publikation: Barig S., Schiemann M., Mirsky V. M., Stahmann, K.- P. 2013. Quantitative turbidity assay for lipolytic enzymes in microtiter plates. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 405(26):8539-47.	106
<b>8.</b>	<b>Gelistete Veröffentlichungen als Patentanmeldung, Poster und Vorträge</b>	<b>116</b>
<b>9.</b>	<b>Anhänge</b>	<b>117</b>
	Eidesstattliche Erklärung	117

## Zusammenfassung

Lipasen sind esterolytische Enzyme, welche vorzugsweise an Lipid/Wasser Phasengrenzen aktiv sind. Von großer Bedeutung sind diese Biokatalysatoren bei etablierten industriellen Prozessen, wie z.B. in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie sowie der Herstellung von Detergenzien oder als Additiv in Waschmitteln. Neue Anwendungsgebiete, wie die Produktion von Feinchemikalien für die Pharma- und Agrarindustrie sowie die Herstellung von Biodiesel stellen Herausforderungen dar. Gerade in den letztgenannten Industriezweigen konkurrieren biokatalytische Prozesse stark mit herkömmlichen chemischen Verfahren. Vergleichend in Hinsicht auf Umwelt- und Sicherheitsaspekte sowie der Effizienz werden die konservativen Prozesse meist von den innovativen Umsetzungen geschlagen, allein die Herstellungskosten von Enzymen behindern oftmals einen großtechnischen Einsatz. Um die Kosten für den Einsatz des Biokatalysators zu minimieren, wurden drei Ansatzpunkte bearbeitet.

Bei der Herstellung von Lipasen oder anderen Enzymen durch Mikroorganismen fallen Investitions- und Betriebskosten an. Investitionskosten werden maßgeblich vom Reaktordesign und dessen Größe bestimmt, wobei die Betriebskosten zum Beispiel durch den hohen Einsatz von Energie und Zeit bei der Sterilisation sowie teuren Medienbestandteilen festgesetzt werden. Eine Verbesserung des Reaktordesigns sowie der Ausschluss der Sterilisation von Kultivierungseinheit und –medium sollen dazu beitragen die Gesamtkosten zu minimieren, um somit den Enzympreis zu senken. Aus dieser Zielstellung heraus wurde in vorhergehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe ein selektives Kultivierungsverfahren mit minimierter Steriltechnik entwickelt. Die Wahl definierter Kultivierungsbedingungen, welche sich aus I) aerobem Wachstum, II) bei Temperaturen von 21 °C, III) Pflanzenöl als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle, IV) Mineralsalzmedium als Wachstumsgrundlage, V) einem pH von 3 bis 4 sowie VI) Nitrat als Stickstoffquelle zusammensetzen, üben einen Selektionsdruck aus, welche das Wachstum einer Reinkultur erlaubt. Unter den gewählten Wachstumskriterien war *Phialemonium curvatum* AW02 aus Kompost isoliert und im 100-l-Maßstab erfolgreich monoseptisch kultiviert worden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Maßstabsvergrößerung, ein sogenanntes „Scale up“ des Systems, auf ein Volumen von 350 l durchgeführt. Die robuste Selektivität des Kultivierungssystems im 100-l- und 350-l-Maßstab wurde in 13 individuellen Läufen über einen Kultivierungszeitraum von acht bis zwölf Tagen gezeigt. Lipaseaktivität konnte in allen Durchgängen nachgewiesen werden. Der Mikroorganismus *P. curvatum* AW02 sowie dessen extrazelluläre Lipasen, wurden partiell

charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass *P. curvatum* AW02 mindestens eine zellwandgebundenen Lipase sekretiert, wobei diese lipolytische Aktivität im sauren Bereich zeigt. Es wurde weiterhin gezeigt, dass das selektive Kultivierungsverfahren mit minimierter Steriltechnik das alleinige Wachstum weiterer bekannter Mikroorganismen, wie z.B. *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* oder *Yarrowia lipolytica* begünstigt.

Der zweite Ansatzpunkt zur Kostenminimierung ist die Wiederverwendung sowie Stabilisierung des Enzyms durch Immobilisierung. Eine Fixierung von Enzymen benötigt intensive Entwicklungsarbeit, welche die Erfordernisse der biokatalytischen Umsetzung, die Eigenschaften des Biokatalysators sowie des eventuellen Trägermaterials berücksichtigen muss. Auf Grundlage dieser Problemstellung wurde ein Immobilisierungsverfahren entwickelt, das auf der Einbettung wasserfreier Enzympräparate in ein Polymer-Harz basiert. Dieses Enzym-Polymerharz-Gemisch kann auf Oberflächen mit unterschiedlichen physikalischen oder chemischen Eigenschaften aufgebracht werden. Als Modellenzym wurde die robuste, Co-Faktor unabhängige, monomere *Thermomyces lanuginosus* Lipase (TLL) genutzt. Die Immobilisierung mittels wasserfreiem Einbettungsverfahren konnte erfolgreich mit Aktivitäten von bis zu 250 mU/cm<sup>2</sup> beschichteter Oberfläche gegenüber *p*-Nitrophenyl-Palmitat (pNPPalm) nachgewiesen werden. Vergleichend wurden in einem Standard-Immobilisierungsverfahren auf Grundlage von amino-funktionalisierten Oberflächen und anschließender kovalenter Fixierung der TLL, lipolytische Aktivitäten von 4 mU/cm<sup>2</sup> Oberfläche gegenüber pNPPalm erreicht. Die Co-Faktor-abhängige und unter nativen Bedingungen als Homotetramer vorliegende Threonin Aldolase aus *Ashbya gossypii* wurde als zweites Beispielenzym in dem wasserfreien Einbettungsverfahren eingesetzt. Die Enzym-Polymerharz Reaktionseinheiten zeigten eine Aktivität von 90 mU/cm<sup>2</sup> beschichteter Oberfläche gegenüber dem Substratanalogon DL-Threo- $\beta$ -Phenylserin. Somit konnte gezeigt werden, dass das neuartige wasserfreie Einbettungsverfahren auf verschiedene Enzyme mit unterschiedlicher Komplexität erfolgreich anwendbar ist.

Der dritte Ansatzpunkt ist die Entwicklung eines quantitativen Mikrotiter-Lipase-Nachweissystems. Lipasen sind an Lipid/Wasser Grenzflächen aktiv, wobei sich verschiedene Faktoren, wie z.B. Adsorption an der Phasengrenze, Produktbildung, sowie Produktdiffusion, auf eine verlässliche quantitative Aktivitätsbestimmung auswirken können. Verschiedene labor- und zeitintensive Verfahren weisen lipolytische Aktivität nach. Im Verlauf eines Auswahlprozesses bei dem letztendlich eine Lipase im industriellen Maßstab eingesetzt werden soll, sind Methoden zur Bestimmung der Lipaseaktivität, sowie zur Charakterisierung notwendig. Wird ein schnelles und einfaches Lipase-Nachweissystem etabliert, könnte dieses

zur Kostenminimierung beitragen. Eine quantitative Methode zur Bestimmung von Lipaseaktivität, welche innerhalb einer Stunde viele Proben parallel auf Grundlage eines Triglyzerid-Wasser-Zweiphasensystems analysieren kann, ist bisher nicht bekannt. Aus diesem Grund wurde ein turbidimetrisches Lipase-Nachweissystem im Mikroliter-Maßstab, basierend auf einer 1 % (v/v) Tributyrinemulsion entwickelt. Die Emulsion wurde durch Agar in 96-well Mikrotiter Platten stabilisiert. Durch die Hydrolyse des Tributyrins kommt es zu einer kontinuierlichen Klärung, welche mittels Spektrophotometer bei 595 nm verfolgt werden kann. Das Auftragen variabler Mengen des Modellenzym TLL zeigte eine direkte Abhängigkeit zwischen Lipasekonzentration und Abnahme der Extinktion. Die Detektionsgrenze lag bei 20 ng aktivem Enzym pro Kavität, wobei sich bei bis zu 200 ng Enzym pro Kavität eine lineare Extinktionsabnahme pro Zeiteinheit zeigte. Eine eingehende Charakterisierung ergab, dass ein Substratüberschuss bei 1 % (v/v) Tributyrin vorliegt. Somit kann das turbidimetrische Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem zur Quantifizierung lipolytischer Proben eingesetzt werden.

Das selektive Kultivierungsverfahren mit minimierter Steriltechnik trägt das Potential, robust und einfach, unter kostenminimierten Bedingungen Enzyme herzustellen. Um eine höhere Enzymproduktion zu erhalten, müsste im nächsten Schritt mit gentechnischen Mutanten gearbeitet werden. Das Minimalmedium sollte den Einsatz von Komplementationsmarkern erlauben, welches ein weiterer Vorteil gegenüber heute üblichen dominanten Markern wäre. Für das wasserfreie Einbettungsverfahren von Enzymen wurde gezeigt, dass auch komplexere Enzymsysteme nach der Immobilisierung Aktivität zeigen. Dies eröffnet die Option für eine breite Anwendung, beispielsweise die immobilisierte Kombination zweier oder mehrerer Enzyme, die üblicherweise als Enzymmischung zu biokatalytischen Prozessen zugesetzt werden, wie zum Beispiel Zellulase. Zukünftig wäre zu untersuchen, ob bei der Polymerisierung der Harze kovalente Bindungen zwischen Träger und Enzym geknüpft werden oder eine Einbettung stattfindet. Die schnelle und einfache Quantifizierung lipolytischer Aktivität in einem multiplen Parallelansatz ist eine Bereicherung für wissenschaftliche, diagnostische und industrielle Einsatzgebiete. In Folgeuntersuchungen wäre die Ursache der Trübungsklärung zu ermitteln, wobei sich die Frage nach der Löslichkeit aller Hydrolyseprodukte stellt.

Insgesamt konnte mit den bearbeiteten Teilgebieten der Enzymtechnologie ein Beitrag zur Weiterentwicklung der Anwendung von Lipasen erbracht werden, der auch interessante wissenschaftliche Perspektiven bietet.

## Summary

Lipases are esterolytic enzymes preferring the lipid/water interface for activity. They are of interest in industrial processes, i.e. dietary and food industry, the production of detergents as well as additives for cleaning agents. The application in other industrial fields, such as the production of fine chemicals for pharmaceutical and agro-chemical usage and the production of biodiesel, is still a challenge. Especially in the last mentioned industrial areas biotechnical processes compete with traditional chemical methods. If the efficiency, the ecological as well as safety aspects are compared, the conventional processes are beaten by the innovative ones. Solely the high production costs of enzymes mostly hinder the application of enzymes in industrial processes. Therefore three aspects were studied to minimize the costs for the usage of a biocatalyst.

During the production process of lipases or other enzymes capital and operating costs are accumulated which in turn determine the selling price of an enzyme. Reducing the expenses will lead to a decrease in enzyme costs. The capital costs are mainly determined by the reactor design and dimension. Energy and time consuming sterile technique as well as expensive media components are increasing the operating costs. In previous experiments of the working group a selective cultivation system with minimized sterile technique to reduce the mentioned expenses was developed. Defined cultivation conditions favor the growth of a monoseptic culture: I) aerobic, II) 21 °C, III) plant oil as energy and carbon source, IV) mineral salt media, V) pH 3 to 4, and VI) nitrate as nitrogen source. The chosen growth limitations were used to isolate *Phialemonium curvatum* AW02 from a compost pile. It was successfully cultivated in 100-l-scale as a monoseptic culture. In the presented thesis it was shown that a scale up to a culture volume of 350 l was possible. Robustness of the cultivation system in 100-l- and 350-l-scale was confirmed by 13 individual runs during cultivation periods of eight to twelve days. Lipase activity was proven in each run. The microorganism *P. curvatum* AW02 as well as its extracellular lipases were partially characterized. It was shown that *P. curvatum* AW02 secretes a minimum of one cell wall associated lipase. Furthermore it is lipolytically active at low pH. The growth of further well-known microorganisms such as *Asperillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Yarrowia lipolytica*, in the cultivation system with minimized sterile technique was possible.

A second approach to minimize the costs was the re-use and stabilization of enzymes by immobilisation. The fixation of biocatalysts implies intensive work where the requirements of the process, the needs of the biocatalyst as well as of the potential scaffold need to be considered. Therefore, an immobilisation method was developed which was based on the entrapment of water-free enzyme preparations in a polymeric resin. The enzyme/polymeric resin mixture can be applied on different surfaces varying in physical and chemical properties. As model enzyme the robust, co-factor independent and monomeric *Thermomyces lanuginosus* Lipase (TLL) was used. The immobilisation by water-free entrapment was successfully carried out. Activities of up to 250 mU/cm<sup>2</sup> coated surface were determined using *p*-nitrophenyl-palmitate (pNPPalm) as substrate. In a comparative study, where TLL was covalently linked to an amino-functionalized surface, activities of up to 4 mU/cm<sup>2</sup> surface using pNPPalm were reached. As a second example the threonine aldolase of *Ashbya gossypii* was used for water-free entrapment. The main difference to TLL is the co-factor dependency and the homotetrameric superstructure of the threonine aldolase. The enzyme/polymeric resin reaction units showed an activity of up to 90 mU/cm<sup>2</sup> coated surface using the substrate analogue DL-threo- $\beta$ -phenylserine. Concluding to these results, the newly evolved immobilisation method on the basis of water-free entrapment is applicable on enzymes varying in their complexity.

The third approach was the development of a quantitative turbidity assay in microliter-scale for lipolytic enzymes. Lipases are active at the lipid/water interface. Due to the complex substrate structure on the interface and its influencing factors such as adsorption to the interface, product release and diffusion, a quantitative determination of activity is difficult. Many laboratory- and time-intensive methods determining lipolytic activity had been developed. A quantitative analysis which is fast and reliable for many samples in parallel using an interfacial system (triglyceride/water) is not known. Therefore a quantitative turbidity assay in microtiter plates was established. Basically, a 1 % (v/v) tributyrin/water emulsion was stabilized with agar in the cavities of a 96-well microtiter plate. Hydrolysis of tributyrin causes a continuous clearing which can be followed at 595 nm by spectrophotometry. Different amounts of the model enzyme TLL showed a direct dependency between lipase concentration and decrease of extinction. The detection limit was 20 ng active enzyme per well. Thereby, a linear decrease of extinction was shown up to 200 ng enzyme per cavity. A detailed characterization proved that substrate excess is given at 1 % (v/v) tributyrin. Therefore the turbidity assay in microtiter plates can be used to quantitatively determine lipolytic enzymes.

The selective cultivation system with minimized sterile technique has the potential to produce enzymes under simple, robust and cost-reduced conditions. A next step would be the use of genetically modified microorganisms to reach a higher enzyme production. The mineral salt media would allow the use of complementation markers which is an advantage to the usually applied dominant markers. The water-free entrapment method for the immobilisation of enzymes is applicable for complex enzyme systems showing still activity. Therefore, a much broader application of the newly developed system is possible. An example would be the combined fixation of two or more enzymes which is typically added as enzyme mix to a biocatalytic process, e.g. cellulase. In future experiments the polymerization reaction of the resin could be investigated. Until now it is assumed that an entrapment of the enzyme is taking place, but a covalent linkage between resin and enzyme during polymerization would be possible, too. The fast and simple quantification of lipolytic activity in a multiple parallel performance is important for scientific, diagnostic and industrial purposes. Using the developed turbidity assay in microtiter plates for the characterization of lipase activity in presence of positive or negative effectors, e.g. different metal ions or detergents would also be possible. Subsequent studies should give an idea about the cause of clearance of turbidity. If the solubility in water of each hydrolytic product is sufficient a clearance is not dependent on total hydrolysis.

Different aspects of enzyme technology were in the focus of the presented work. In each section a contribution to further increase the application of lipases was made. Additionally, interesting scientific questions arose from the discussion of these results.

# 1. Einleitung

Lipasen (EC 3.1.1.3) gehören in die Enzymklasse der Hydrolasen und katalysieren die Spaltung von Estern, vorrangig mit langkettigen Fettsäuren (>10 Kohlenstoffatome), welche wasserunlöslich sind, wie zum Beispiel Triglyzeride (Jaeger *et al.*, 1999). Neben der Hydrolyse von Esterbindungen und der Rückreaktion, der Veresterung, können sie auch Umesterungen katalysieren (Houde *et al.*, 2004). Lipasen teilen mit anderen Enzymen folgende Vorteile: ökoeffiziente Reaktionsbedingungen bei atmosphärischem Druck, milden Temperaturen und pH sowie Aktivität im Lösungsmittel Wasser (Sheldon, 2007). Weitere Eigenschaften, welche sie für die industrielle Anwendung ganz besonders interessant machen sind ihre Stabilität in organischen Lösungsmitteln sowie ihre hohe Enantio- und Regioselektivität und die Substratspezifität und -selektivität. Des Weiteren benötigen Lipasen häufig keine Co- Faktoren und sind grenzflächenaktiv, obwohl Ausnahmen bestätigt wurden (Hanefeld *et al.*, 2009; Bornscheuer und Kazlauskas, 2006).

Diese außerordentlichen Eigenschaften geben Lipasen ein hohes Potential, um industriell eingesetzt zu werden (Treichel, 2010). Die Hauptanwendungsgebiete sind mit 32 % aller verkauften Lipasen die Nahrungsmittel- und Detergenzienindustrie (Sharma, 2002). In der Nahrungsmittelindustrie werden sie zum Beispiel bei der Herstellung von strukturierten Lipiden eingesetzt, wobei natürliche Fette und Öle in ihrer molekularen Zusammensetzung so verändert werden, dass die ernährungsphysiologischen und physikalischen Eigenschaften verbessert werden (Devi *et al.*, 2008). Ein kommerzielles Beispiel ist Betapol<sup>TM</sup>, ein strukturiertes Lipid aus Palmöl, welches humaner Ersatzmilch zugesetzt wird. Humanes Milchfett besteht aus Triglyzeriden, welche in *sn2* Position eine gesättigte Fettsäure tragen. Zu 70 % ist das Palmitinsäure (C16), wohingegen an *sn1* und *sn3* Position vorrangig ungesättigte Fettsäuren gebunden sind. Bei pflanzlichen Fetten ist die Verteilung von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren am Glycerin-Rückgrat entgegengesetzt. Die äußeren Fettsäuren des Milchfettes werden durch die pankreatische Lipase spezifisch gespalten. Es wird angenommen, dass die freien Fettsäuren sowie die an *sn2* Position des Glycerins gebundene Palmitinsäure direkt durch die Enterozyten in den gastroenteralen Bereich aufgenommen werden. Weiterhin gibt es Hinweise, dass freie Palmitinsäure nicht effektiv in die Blutbahn aufgenommen wird (Houde *et al.*, 2004; Soumanou *et al.*, 2013).

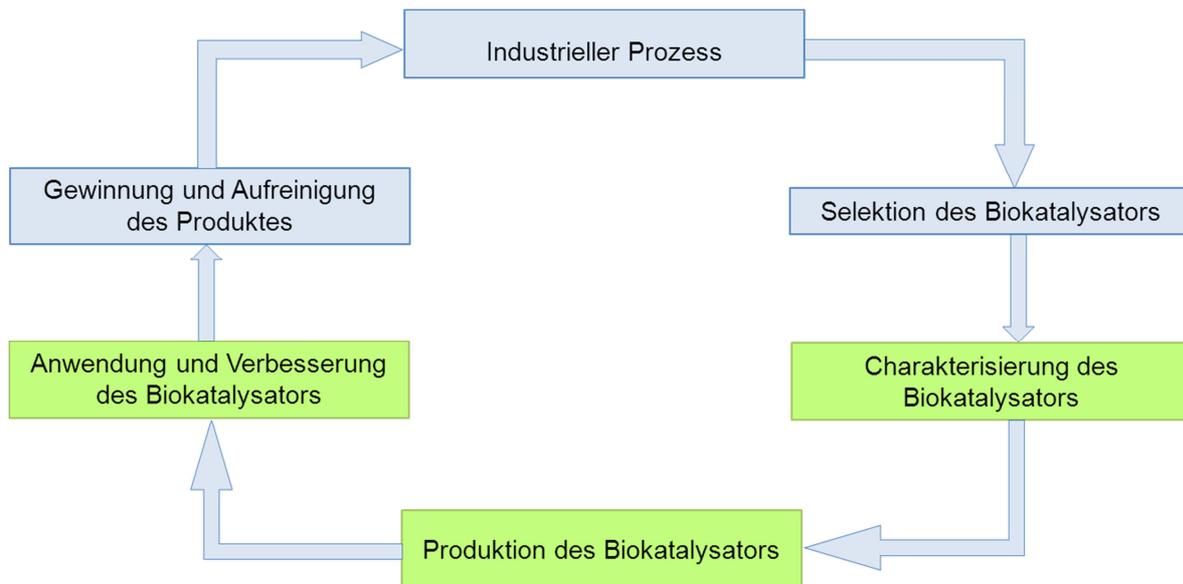
Für Säuglinge, die mit humaner Ersatzmilch ernährt werden, könnte somit die Verteilung der spezifischen Fettsäuren an den entsprechenden Positionen des Glycerins bedeutend für die gute Versorgung mit Fetten sein. Wichtig ist dies, da Fette die Hauptenergiequelle in diesem Stadium der Entwicklung sind (Houde *et al.*, 2004; Soumanou *et al.*, 2013).

In der Detergenzien-Industrie wird seit 1994 das Präparat Lipolase<sup>TM</sup> von Novo Nordisk (Dänemark) verschiedenen Waschmitteln zugesetzt, um die Reinigungsleistung zu steigern. Lipolase<sup>TM</sup> besteht aus der in *Aspergillus oryzae* rekombinant hergestellten *Thermomyces languginosus* Lipase (TLL) (Adrio und Demain, 2003; Hasan *et al.*, 2006).

Potentielle industrielle Einsatzgebiete für Lipasen sind zum Beispiel die Herstellung von Feinchemikalien für Pharma- und Agrarindustrie, die Herstellung von Biodiesel sowie die Abwasserbehandlung (Houde *et al.*, 2004).

Allgemein ist die Nachfrage nach geeigneten Lipasen in der Fett- und Ölindustrie groß. Im Jahr werden circa 60 Millionen t pflanzliche Öle produziert, von denen 2 Millionen t in freie Fettsäuren und Glycerin zur weiteren industriellen Verwendung gespalten werden (Hasan *et al.*, 2006). Drei Wege werden zurzeit genutzt: I) die Dampfspaltung unter hohen Temperaturen (240-260 °C) und Druck (70 bar), II) die alkalische Hydrolyse sowie III) die enzymatische Hydrolyse. Bei den beiden erstgenannten physikalisch-chemischen Verfahren entstehen instabile Zwischenprodukte und Abfälle, welche nachfolgende Reinigungsschritte nötig machen. Des Weiteren können hitzeempfindliche Öle nicht in diesen Verfahren gespalten werden, da sie zum Zerfall der komplexen Moleküle oder zur Polymerisierung neigen. Diese Argumente würden für einen intensiveren Einsatz von Lipasen sprechen. Eine lange Prozessdauer von zwei bis drei Tagen und das immer noch kostenintensive Enzym sind die Gegenargumente (Hasan *et al.*, 2006; Murty *et al.*, 2002).

Um das Anwendungsspektrum von Lipasen zu erweitern, kann auf dem Weg von der Suche nach der geeigneten Lipase bis zum industriellen Einsatz bei verschiedenen Schritten angesetzt werden, um insgesamt eine Kostenminimierung zu erzielen (Abbildung 1.1; nach Cantone *et al.*, 2013).



**Abbildung 1.1: Entwicklungsschritte von der Selektion eines geeigneten Biokatalysators bis zu dessen Einsatz in einem industriellen Prozess.** Drei Teilschritte in der stetig fortschreitenden und daher zyklisch dargestellten Entwicklung eines biokatalytischen Prozesses (grün) wurden näher betrachtet. Angepasst nach Cantone *et al.* (2013).

Obwohl in einigen industriellen Sparten schon etabliert, steht der Einsatz von Lipasen in anderen Industriezweigen, z.B. der Herstellung von Feinchemikalien oder der Biodieselproduktion in Kostenkonkurrenz zu herkömmlichen chemischen Verfahren (Cantone *et al.*, 2013). Ein Ansatzpunkt, um die Waagschale in Richtung Biokatalyse zu bewegen, ist die kostengünstige Produktion mikrobieller Lipasen. Mittlerweile gibt es eine Auswahl an Kultivierungsmethoden zur Lipaseproduktion. Entsprechende Medien, welche zur Optimierung der Lipaseherstellung beitragen, sind hinreichend beschrieben (Treichel *et al.*, 2010). Die Lipaseproduktion findet generell in einem komplexen Kultivierungssystem unter sterilen Bedingungen von bis zu 2000 l Kultivierungsvolumen statt (Fickers *et al.*, 2005). Für die Inbetriebnahme einer solchen Kultivierungseinheit fallen hohe Investitionskosten an, welche oft schon ein Hindernisgrund für den Bau einer solchen Anlage sind. Bei der Kostenfestsetzung in diesem Bereich nimmt das Reaktordesign, bei dem Material und Größe ausschlaggebende Punkte sind, eine wichtige Rolle ein. Des Weiteren sind die Betriebskosten für die Produktion eines Biokatalysators ein wichtiges Entscheidungskriterium zum Bau einer Anlage (Klein-Marcushamer *et al.*, 2012). Diese gemeinsamen Kosten definieren den Preis für den Biokatalysator, der abhängig vom gewünschten Prozess nur einen geringen Teil des letztendlichen Produktpreises ausmachen darf (Tufvesson *et al.*, 2011).

In vorhergehenden Arbeiten wurde in Senftenberg ein Kultivierungssystem etabliert, welches durch selektive Kultivierungsbedingungen (I. aerobes Wachstum, II. bei Temperaturen von 21 °C, III. Pflanzenöl als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle, IV. Mineralsalzmedium, V. Kultivierung bei pH 3 bis 4, VI. Nitrat als Stickstoffquelle) das Wachstum einer Monokultur begünstigt. Die Wahl des Reaktionsgefäßes, 200 l bzw. 500 l Polypropylen-Gefäß anstelle von Stahlbehältern sowie eine pneumatische Durchmischung anstelle eines Rührsystems, sollten die Investitionskosten senken. Mit Einsparung eines Rührsystems könnten gleichzeitig Energiekosten durch den Wegfall einer Kühlungsanlage minimiert werden. Eine Verringerung der Betriebskosten sollte durch die Kultivierung in dem selektiven Minimalmedium erreicht werden. Dieses bietet verschiedene Vorteile I) keine Zugabe komplexer Medienbestandteile sowie II) Senkung des Energieeintrages, da eine Sterilisation des Mediums entfällt.

Unter den gewählten Selektionskriterien konnte ein filamentöser Pilz, *Phialemonium curvatum* AW02, aus Kompost isoliert werden. Dieses Isolat sollte durch das gewählte Selektionskriterium Pflanzenöl als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle mindestens eine extrazelluläre Lipase synthetisieren. Da diese Enzyme vielseitig einsetzbar sind und das große Potential für weitere industrielle Anwendungen haben, wurden der Mikroorganismus sowie dessen extrazelluläre Lipasen eingehender betrachtet.

Ein weiterer Ansatzpunkt, um die Kosten für den Einsatz von Lipasen zu minimieren ist die Wiederverwendung. Diese kann durch eine Immobilisierung erreicht werden. Zusätzliche positive Effekte sind oftmals eine gesteigerte Stabilität besonders für Langzeitprozesse und deren chemische und physikalische Bedingungen, wie zum Beispiel mechanische Belastungen durch Rühren, organische Lösungsmittel sowie stark saure oder alkalische pH-Werte (Guisán, 2010). Trotz dieser Vorteile beruhen nur circa 15 % der großtechnischen biokatalytischen Prozesse auf immobilisierten Enzymen (Straathof *et al.*, 2002). Zum großen Teil liegt es daran, dass durch die Immobilisierung Mehrkosten entstehen, zum einen für die laborintensive Entwicklung sowie für die letztendliche Herstellung des Präparates durch Material- und Zeiteinsatz. Obwohl eine Fülle von Immobilisierungsmethoden existiert, gibt es keine universelle, welche ohne zeitintensive Arbeit auf verschiedenste Enzyme angewandt werden kann (Cao, 2005). Aus diesem Grund wurde basierend auf der Analyse verschiedenster Immobilisierungsverfahren eine neue Methode zum Einschluss von wasserfreien Enzympräparaten in einem Polymerharz-Bett entwickelt.

Für die Wahl einer für industrielle Prozesse geeigneten Lipase werden zum größten Teil Enzyme mikrobiellen Ursprungs genutzt, da sie einfacher und zuverlässiger produzierbar sind, als die entsprechenden Lipasen tierischen oder pflanzlichen Ursprungs (Houde *et al.*, 2004; Hasan *et al.*, 2006). Lipasen aus Pilzen sind am besten charakterisiert (Sangeetha *et al.*, 2011). Seit den 1980er Jahren verzeichnet man einen ständigen Anstieg der verfügbaren Lipasen, was auf eine große Nachfrage hinweist (Treichel *et al.*, 2010). Da bisher <1 % der Mikroorganismen im Labormaßstab kultiviert und deren Enzyme identifiziert worden, könnte geschlussfolgert werden, dass potentielle Lipasen für spezielle Anwendungen noch nicht bekannt sind (Hanefeld *et al.*, 2009). Um das Potential einer Lipase abzuschätzen sowie diese zu charakterisieren, existiert eine Fülle an Lipase-Assay- und Screening-Systemen. Je nach gesuchter Eigenschaft des Biokatalysators müssen oft arbeits- und kostenintensive Methoden angewandt werden (Gupta *et al.*, 2003; Beisson *et al.*, 2000; Hasan *et al.*, 2009). Ein quantitatives Lipase-Nachweissystem, bei welchem mehrere parallele Proben in kurzer Zeit auf Grundlage eines Triglyzerid-Wasser-Zweiphasensystem analysiert werden, ist zurzeit nicht bekannt. Aus diesem Grund wurde ein Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem auf Grundlage einer Tributyrin/Wasser Emulsion, stabilisiert mit Agar, entwickelt.

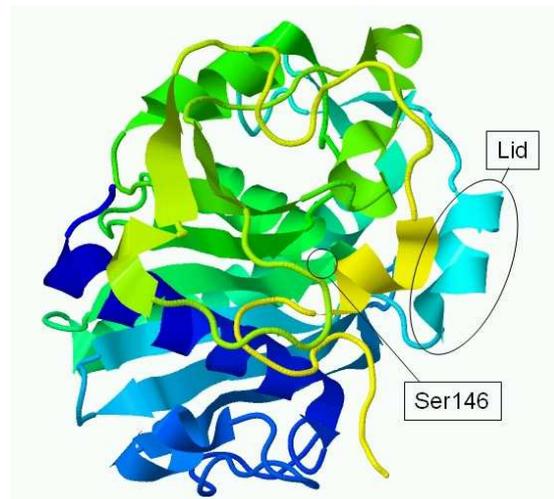
Bevor es zum Einsatz einer Lipase in einem industriellen Prozess kommt, müssen verschiedene Entwicklungsschritte durchlaufen werden (Abbildung 1.1). In der vorliegenden Dissertation wird aufgezeigt, wie an drei dieser Schritte (der Produktion, Verbesserung des Biokatalysators durch Immobilisierung sowie der Quantifizierung und Charakterisierung der Lipase) gearbeitet wurde, um den industriellen Einsatz von Lipasen zu steigern. Zusätzlich wurden zwei Lipasen, die gut untersuchte *Thermomyces lanuginosus* Lipase sowie die extrazellulären Lipasen von *Phialemonium curvatum* AW02, einem Naturisolat charakterisiert. Nachfolgend wird jeder einzelne Aspekt in Hinsicht auf den derzeitigen Kenntnisstand, die gesetzte Zielstellung sowie deren Erfüllung betrachtet. Ein Ausblick gibt einen Eindruck darüber, wie die errungenen Ergebnisse, sowohl wissenschaftlich als auch industriell weiter verwertet werden können.

## 2. Struktur und Reaktionsmechanismus von Lipasen am Beispiel der *Thermomyces lanuginosus* Lipase

Eine der am besten strukturell und kinetisch untersuchten Lipasen ist die *Thermomyces lanuginosus* Lipase (TLL). Dieses lipolytische Enzym stammt aus dem thermophilen Pilz *Thermomyces* (ursprünglich: *Humicola*) *lanuginosus*. Dieser Mikroorganismus wurde erstmals 1899 isoliert und seitdem an mehreren Orten der Welt, vor allem in organischem Abfall, gefunden. Charakteristisch sind die thermostabilen Eigenschaften seiner extrazellulären Enzyme wie zum Beispiel bei der Lipase oder den Zellulasen (Singh *et al.*, 2003). Omar *et al.* reinigten die extrazelluläre Lipase und bestimmten ausgewählte Eigenschaften. Die Lipase zeigt einen pI von 6,6 sowie eine molekulare Masse von 39 kDa. Das Enzym hat eine Präferenz für die *sn1* und *sn3* Positionen am Glycerin-Rückgrat und hydrolysiert mittellange (C12) Triglyzeride besser als kurz- (C4 und C6) oder langkettige (C16) (Omar *et al.*, 1987; Mogensen *et al.*, 2005). Seit 1994 wird das Enzym rekombinant durch NOVO NORDISK A/S (Dänemark) in *Aspergillus oryzae* hergestellt (Boel *et al.*, 1995; EP:0305216B1) und als Lipolase<sup>TM</sup> als Zusatz in Waschmitteln vertrieben (Sharma *et al.*, 2001). Das rekombinante Enzym umfasst 269 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 32 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 4,4 (Jha *et al.*, 1999). Die Abweichung in der Nettoladung zwischen nativer und rekombinanter Lipase lässt sich durch die unterschiedlichen Glykosylierungsmuster von *T. lanuginosus* und *A. oryzae* Proteinen erklären (Boel *et al.*, 1995; EP:0305216B1). Zurzeit sind 15 Einträge für die 3D Struktur der *Thermomyces lanuginosus* Lipase in der Protein Database verfügbar (<http://www.rcsb.org/pdb/>, Juni 2013). Die Kristallisierung des Enzyms erfolgte unter den unterschiedlichsten Bedingungen: nativ (Brzozowski *et al.*, 2000), veranschaulicht in Abbildung 2.1, sowie verschiedene Muteine im Enzym/Substrat Komplex mit Ölsäure (Yapoudjian *et al.*, 2002). Durch die Strukturanalyse dieser und anderer Lipasen sowie von Phospholipasen konnten wichtige Hinweise auf den Reaktionsmechanismus von Lipasen gewonnen werden (Derewenda *et al.*, 1994).

Für die Reaktion an sich ist in allen Lipasen, ebenso wie bei den Serin-Proteasen, die katalytische Triade aus Serin, Histidin und Asparaginsäure oder Glutaminsäure verantwortlich (Bornscheuer und Kazlauskas, 2006). Das aktive Serin ist essentiell für die Hydrolyse von Triglyzeriden durch Lipasen.

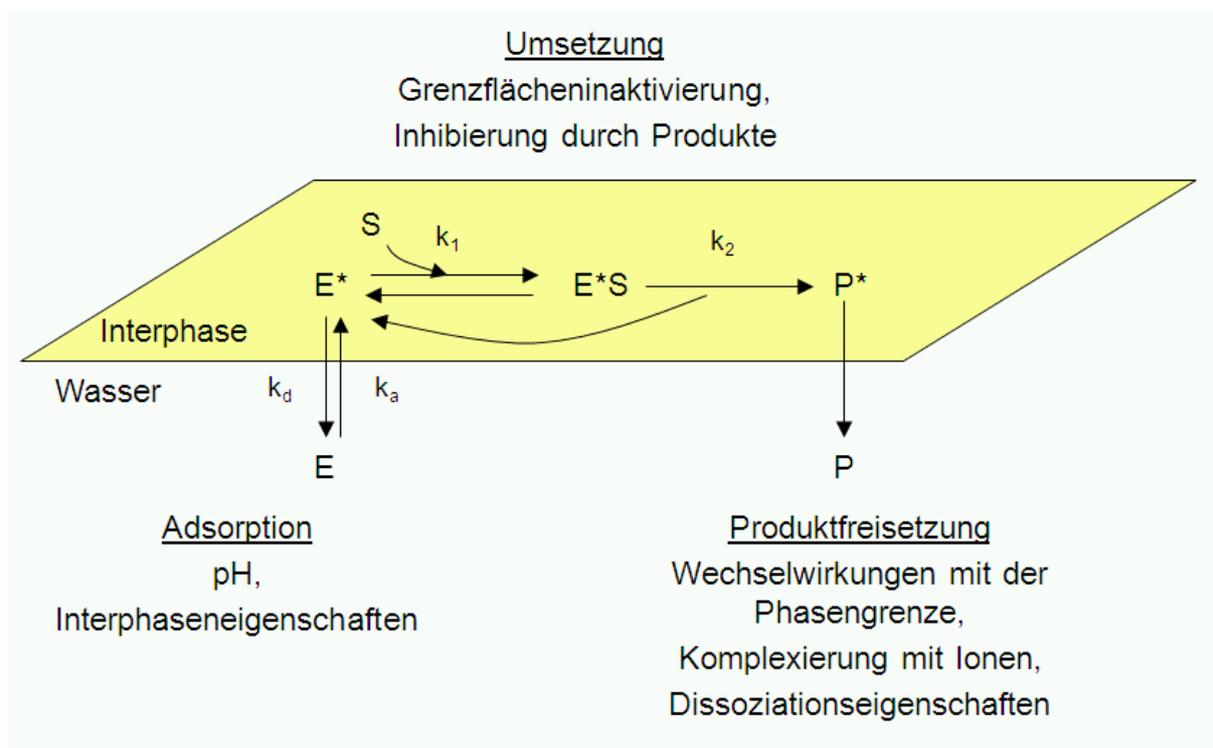
Dies wurde unter anderem für die *Thermomyces lanuginosus* Lipase anhand einer S146A Mutante gezeigt (Berg *et al.*, 1998). Gleichzeitig weist diese Mutante auch Defizite in der Bindungsfähigkeit an das Substrat auf (Peters *et al.*, 1998).



**Abbildung 2.1: Struktur der *Thermomyces lanuginosus* Lipase mit geschlossenem Lid.** Die 3D Struktur wurde von dem Eintrag 1DT3 der Protein Data Bank übernommen (25.06.2013: [www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1DT3](http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1DT3)) (Brzozowski *et al.*, 2000). Gekennzeichnet ist das geschlossene Lid, welches den Zugang zum aktiven Serin (146) verschließt.

Strukturell ähneln sich Lipasen in ihrer 2D Abfolge von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern. Eine wichtige Proteinstruktur, verantwortlich für die sogenannte Interphasenaktivierung, ist das Lid (Abbildung 2.1), welches das aktive Zentrum bedeckt (Bornscheuer und Kazlauskas, 2006). Interphasenaktivierung ist durch einen rapiden Aktivitätsanstieg gekennzeichnet, wenn das Substrat eine Konzentration erreicht, bei dem es nicht mehr gelöst vorkommt, sondern Micellen oder Emulsionen bildet (Brzozowski *et al.*, 2000). Für Tributyrin liegt die kritische Konzentration zum Beispiel bei 0,8 mM (Berg *et al.*, 1998). Trifft das Enzym nun auf ein wasserunlösliches Substrat, z.B. ein Triglyzerid, ändert sich die Stellung des Lids und erlaubt den Zugang zum aktiven Zentrum. Diese Konformationsänderung, bei der gleichzeitig hydrophobe Aminosäuregruppen des Proteins freigelegt werden, um eine Interaktion mit der Grenzfläche zu ermöglichen, ist typisch für Lipasen. Die hydrophilen Anteile des Proteins werden dabei nach innen verlagert. Während dieser Änderung der 3D Struktur kommt es, verglichen mit gelöstem Substrat, zu einer Aktivitätssteigerung von bis zu zwei Größenordnungen. Allerdings existiert mit der *Candida antarctica* Lipase B auch eine Lipase ohne Lid und ohne Grenzflächenaktivierung (Bornscheuer und Kazlauskas, 2006; Martinelle *et al.*, 1995).

Wie schon beschrieben, sind Lipasen vorrangig an Grenzflächen (Triglyzeride/Wasser) aktiv, wobei das Substrat in diesem Fall nicht frei im wässrigen Milieu verteilt ist, sondern dicht gepackt als „Superstruktur“ vorliegt. Aus diesem Grund kann die Michaelis-Menten-Kinetik nicht angewandt werden. Ein vereinfachtes kinetisches Modell wurde von Verger und seinen Mitarbeitern 1973 aufgestellt, um die Grenzflächensituation auf ein homogenes System anzupassen (Verger *et al.*, 1973). Abbildung 2.2 stellt dieses Modell vereinfacht mit einer Auswahl an Einflussgrößen dar. Es kommt zuerst zur Adsorption des Enzyms ( $E \rightarrow E^*$ ), folgend zur Enzym/Substrat ( $E^*S$ ) Komplexbildung mit anschließender Hydrolyse und der Produktfreisetzung.



**Abbildung 2.2: Kinetisches Modell für Reaktionen an Phasengrenzen nach Verger-De Haas (1973).** Das Enzym ( $E$ ) adsorbiert an die Phasengrenze, wobei es in einen aktivierten Zustand übergeht ( $E^*$ ). Es bildet einen Enzym/Substrat ( $E^*S$ ) Komplex mit anschließender Umsetzung zu Produkt ( $P$ ) und Enzym ( $E^*$ ). Das Enzym bleibt entweder auf der Oberfläche und beginnt einen folgenden katalytischen Zyklus („Scooting“) oder löst sich von der Oberfläche und trifft auf eine neue Interphasengrenze („Hopping“) (Berg *et al.*, 2001). Eine Auswahl von Einflussfaktoren ist genannt.  $k_d$  Enzym Desorptionskonstante;  $k_a$  Enzym Adsorptionskonstante.

Verschiedene Einflussgrößen bestimmen die Adsorption, Umsetzung und Produktfreisetzung. Hinzu kommt, dass Substrat, Produkt und Enzym jeweils ihre eigenen physikalischen Eigenschaften besitzen, welche Auswirkungen auf das Mikromilieu haben (Reis *et al.*, 2009). Die Gesamtheit der physikalisch-chemischen Einflussfaktoren, wie zum Beispiel Interphasendruck, Oberflächenviskosität und  $\gamma$ -potential werden als „Interphasen Qualität“ (interfacial quality) zusammengefasst (Beisson *et al.*, 2000).

In Abbildung 2.2 wird davon ausgegangen, dass das Produkt frei von der Oberfläche weg diffundiert. Dies ist bei kurz- bis mittelkettigen Fettsäuren der Fall ( $<C_{10}$ ). Am Beispiel Tributyrin ( $C_4$ ) ist eine Diffusion der entstandenen freien Fettsäuren, aber auch der Monoglyzeride, in die wässrige Phase nachgewiesen (Jurado *et al.*, 2008).

Liegen langkettige Triacylglyceride ( $>C_{10}$ ) vor, bei denen die Hydrolyseprodukte, wie Mono- und Diglyzeride sowie die freien Fettsäuren nicht wasserlöslich sind, kommt es zu Nebeneffekten auf der Oberfläche (Reis *et al.*, 2008). Die einzelnen Produkte sind oberflächenaktiv und können dadurch die Spannung an der Grenzfläche herabsetzen. Durch ihre Anlagerung an der Phasengrenze konkurrieren sie gleichzeitig mit der Lipase (Jurado *et al.*, 2008). Dadurch kann die Reaktionszeit beeinflusst werden (Berg *et al.* 2001). Mit fortschreitender Hydrolyse kommt es so zu einer ständigen Verschiebung der Gleichgewichte, so dass man auch von einer Selbstregulation der Lipolyse sprechen kann (Reis *et al.*, 2009).

Neben den Anlagerungseffekten der Lipase und dem eigentlichen katalytischen Schritt ist auch die weitere hydrolytische Umsetzung auf der Grenzfläche von großer Bedeutung. Es stellt sich die Frage, ob sich das Enzym nach erfolgreicher Umsetzung eines Substratmoleküls von der Phasengrenze löst oder ob das nächste Substratmolekül ohne weitere Konformationsänderung in das aktive Zentrum aufgenommen wird. Studien zu diesen Phänomenen, welche als „Hopping“, Ablösen und Neuanlagerung an die Grenzfläche, oder „Scooting“, keine Ablösung sondern weitere Katalyse auf der gleichen Grenzfläche, bezeichnet werden, liegen vor (Berg *et al.*, 2001). Generell ist jede Enzymspezies für sich zu betrachten. Im Fall der *Thermomyces lanuginosus* Lipase wurde gezeigt, dass diese eine starke Affinität zur Phasengrenze hat, welche durch hydrophobe Interaktionen verstärkt wird. Bei der Adsorption auf einer hydrophoben Oberfläche verringert sich der Diffusionskoeffizient der TLL, was darauf hindeutet, dass eine Ablösung eher unwahrscheinlich ist (Sonnesson *et al.*, 2005). Dieses Modell betrachtet aber nicht die komplexen Zusammenhänge in einem Emulsionssystem, welches durch die Hydrolyseprodukte in einem sich stetig ändernden Gefüge zusammenarbeitet. Jurado *et al.* (2008) untersuchten neben den Anfangsreaktionen durch die TLL an einer Tributyrin/Wasser Phasengrenze den weiteren kinetischen Verlauf der Hydrolyse. Dabei konnte eine Aussage über die schrittweise regioselektive Umsetzung von Tributyrin durch die TLL getroffen werden. Die Lipase hydrolysiert zuerst eine der äußeren Positionen des Triglyzerids bis die Oberfläche des Lipidtropfens mit Dibutyryl gesättigt ist, erst dann wird an der verbleibenden äußeren Position des Diglyzerids die nächste Fettsäure abgespalten, so dass ein *sn2* Monoglyzerid entsteht (Jurado *et al.*, 2008).

Die Anreicherung von Diglyzeriden auf der Oberfläche kann mit der Zugabe von Detergenzien verglichen werden. Die Mobilität der TLL auf hydrophoben Oberflächen wurde durch die Zugabe von Detergenzien erhöht, was durch die Analyse der Diffusionskoeffizienten ermittelt wurde. Durch Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie konnten die Autoren eine teilweise Ablösung der Lipase von der Oberfläche ermitteln, was zusammen mit der erhöhten Diffusion auf eine Desorption und anschließende Wiederanlagerung schließen lässt (Sonnesson *et al.*, 2006).

Somit scheint die Umsetzung von Lipid-Emulsionen nicht einem Modus zu folgen. Vielmehr beeinflussen die Hydrolyseprodukte sowie die Durchführungsbedingungen die Lipase in ihrer katalytischen Aktivität an der Grenzfläche. Die vorliegenden wissenschaftlichen Arbeiten geben Hinweise, dass die Anfangsreaktion im „Scooting“ Modus abläuft und später im Reaktionsverlauf, wenn es zu einer Konkurrenz mit anderen Molekülen auf der Oberfläche kommt, ein Wechsel in den „Hopping“ Modus stattfindet.

Die komplexe Zusammensetzung von Pflanzenöl/Wasser Emulsionen erschwert eine experimentelle Erfassung der Vorgänge an der Phasengrenze. Aus diesem Grund ist eher wenig zum Reaktionsverlauf des lipolytischen Umsatzes von natürlichen Fetten bekannt (Jurado *et al.*, 2008).

### **3. Selektive Kultivierung von Lipase-bildenden Pilzen in einem System mit minimierter Steriltechnik**

#### **3.1 Mikroorganismen als Produktionseinheiten von Enzymen und niedermolekularen Stoffwechselprodukten**

Die Produktion von Enzymen oder niedermolekularen Stoffwechselprodukten mittels Mikroorganismen kann als Festbettverfahren („Solid-state“ Fermentation) oder als Flüssigkulturverfahren („Submerged“ Fermentation) in drei verschiedenen Prozessführungen durchgeführt werden. Dabei unterscheidet man zwischen geschlossenen und offenen Systemen. Zu den geschlossenen Prozesssystemen gehört der Satzbetrieb („Batch“). Dabei wird das System ohne den Austausch von Kultivierungsmedium über einen festen Zeitraum gefahren, allein der Austausch der Gasphase ist möglich. Zu den offenen Prozesssystemen gehört der kontinuierliche Betrieb („Continuous“), wobei das System für die Flüssigphase ständig offen ist, d.h. neues Substrat kann eingetragen sowie Substrat/Produkt Suspensionen entfernt werden. Die dritte Option der Prozessführung ist ein teiloffenes System, auch Zulaufverfahren („Fed-batch“) genannt, bei dem es zur zeitweiligen Öffnung des Systems und dem Austausch von flüssigen Produkten kommt (Chmiel, 2011). Für die Lipaseproduktion mit Hefen oder Bakterien werden meist Flüssigkulturverfahren bevorzugt, während für die Produktion mit filamentösen Pilzen sowohl Flüssigkultur- als auch Festbettverfahren genutzt werden. Ein direkter Vergleich zwischen den unterschiedlichen Verfahren ist schwierig, da die veränderlichen Parameter Bezugsgrößen für die Berechnung sind. Eine wichtige Bezugsgröße, um die Produktivität zu bestimmen, ist zum Beispiel die Biomasseproduktion, welche im Festbettverfahren über den Zeitraum des Kultivierungsprozesses nicht bestimmbar ist (Treichel *et al.*, 2010).

Wichtig für die Frage, ob ein Prozess zur Herstellung von Enzymen oder niedermolekularen Stoffwechselprodukten industriell verwertbar ist, ist die Ermittlung der Herstellungskosten. Die Herstellungskosten bestimmen den Preis für den Biokatalysator, welcher nur einen kleinen Prozentsatz der Kosten für das letztendlich erwünschte Produkt, z.B. freie Fettsäuren, chirale Moleküle oder Biodiesel, betragen darf (Cantone *et al.*, 2013). Die Herstellungskosten für einen Biokatalysator werden in zwei Hauptpunkte, die Investitions- und die Betriebskosten unterteilt. Diese Kosten unterteilen sich weiterhin in verschiedene Unterpunkte, z.B. direkte, welche sich spezifisch auf den Herstellungsprozess beziehen, und indirekte, welche von der Produktion unabhängig sind.

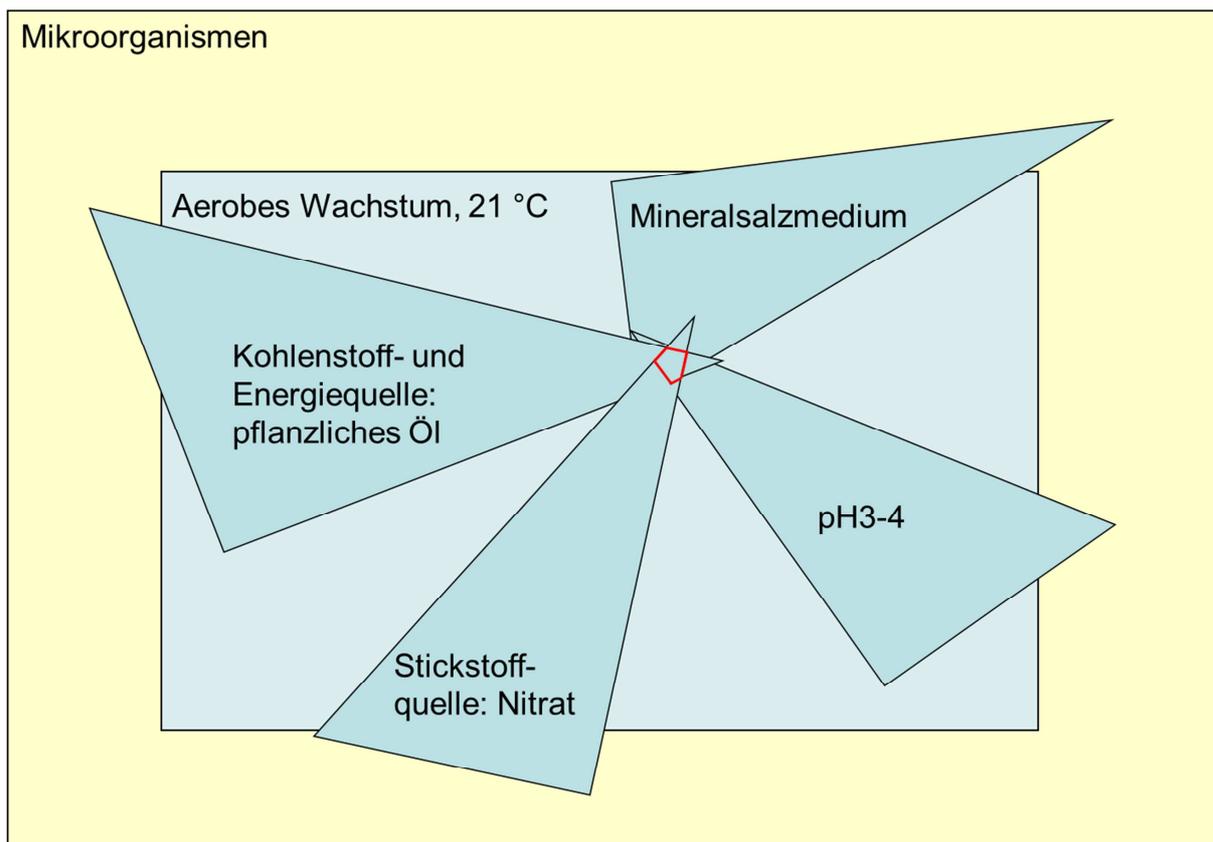
Um Einsparungen in bestimmten Teilen des Produktionsprozesses abschätzen zu können, muss dieser separat auf die Gesamtkosten analysiert werden (Tischer und Kasche, 1999). Wenn ein Biokatalysator auf den Markt gebracht wird und in großtechnischen Prozessen eingesetzt werden soll, ist auch die Produktivität eines Enzyms entscheidend, welche in kg Produkt/ kg Enzym ausgedrückt wird (Sheldon, 2011; Cantone *et al.*, 2013).

Klein-Marcushamer und seine Kollegen analysierten 2012 die einzelnen Kostenfaktoren für die Herstellung von Zellulase, wobei die Investitionskosten mit 48 % den größten Anteil ausmachten, während ein Drittel für Ausgangsmaterialien benötigt wurde. Wenn davon ausgegangen wird, dass der größte Kostenanteil für die Beschaffung und Instandhaltung der Produktionsanlage investiert werden muss, rückt die eigentliche Inbetriebnahme aufgrund der hohen Grundinvestitionen in weite Ferne (Klein-Marcushamer *et al.*, 2011). Jede Produktionsanlage mit dem jeweiligen Produkt muss differenziert gesehen werden. Steht das biokatalytische Verfahren in Konkurrenz mit chemischen Verfahren, können schon minimale Veränderungen zu Einsparungen führen, welche den ausschlaggebenden Punkt für eine industrielle Inbetriebnahme geben. Beispiele wären ein kostengünstiges Reaktordesign ohne den Einsatz von Stahl, der Einsatz günstiger Medienbestandteile ohne Zugabe von Antibiotika oder Vitaminen oder die Senkung der Energiekosten durch den Wegfall der Sterilisation. Weitere Ansatzpunkte, wie effektive Fermentation durch die Nutzung von rekombinanten Wirtsorganismen und hohen Zellzahlen, ein großes Produktionsvolumen sowie ein einfaches und kostengünstiges „Downstream Processing“ können die Kosten für den Biokatalysator um mehrere Größenordnungen senken (Tufvesson *et al.*, 2011).

Aus dieser komplexen Problemstellung ergab sich die Fragestellung nach einem einfachen, robusten Kultivierungssystem, welches unter selektiven Bedingungen das Wachstum einer Monokultur begünstigt und so eine Sterilisation unnötig macht. Ein Kultivierungsverfahren mit minimierter Steriltechnik wurde in vorhergehenden Arbeiten entwickelt. In dem vorliegenden Projekt sollten die gewählten Selektivkriterien analysiert werden, um dieses System in seiner einfachen und robusten Arbeitsweise zu bestätigen. Die Eignung des Prozesses für ein größeres Kultivierungsvolumen sollte gezeigt werden. Da bisher nur mit *Phialemonium curvatum* AW02 gearbeitet worden war, sollte das Wachstum unterschiedlicher Mikroorganismen in dem selektiven Kultivierungsverfahren untersucht werden, um die Anwendungsmöglichkeiten zu erweitern.

### 3.2 Kultivierungsverfahren mit minimierter Steriltechnik

Stahmann *et al.* patentierten 2008 ein einfaches, robustes Kultivierungssystem, geeignet für Laborpersonal mit geringen Vorkenntnissen. Der Hauptgedanke der Erfindung war die Auswahl von Kultivierungskriterien, welche spezifisch das Wachstum einer bestimmten Mikroorganismengruppe unterstützen. Abbildung 3.1 stellt die gewählten Selektionskriterien, welche das Wachstum einer Monokultur in dem System gewährleisten, schematisch dar. Damit ein Mikroorganismus unter den gewählten Bedingungen wachsen kann, muss er eine extrazelluläre Lipase sekretieren, keinen Bedarf an komplexen Medienbestandteilen, wie Vitaminen, oder Aminosäuren haben, eine hohe Hydronium Ionen ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) Konzentration tolerieren und eine Nitratreduktase zur Verwertung des Stickstoffs aufweisen (Stahmann *et al.*, 2008).

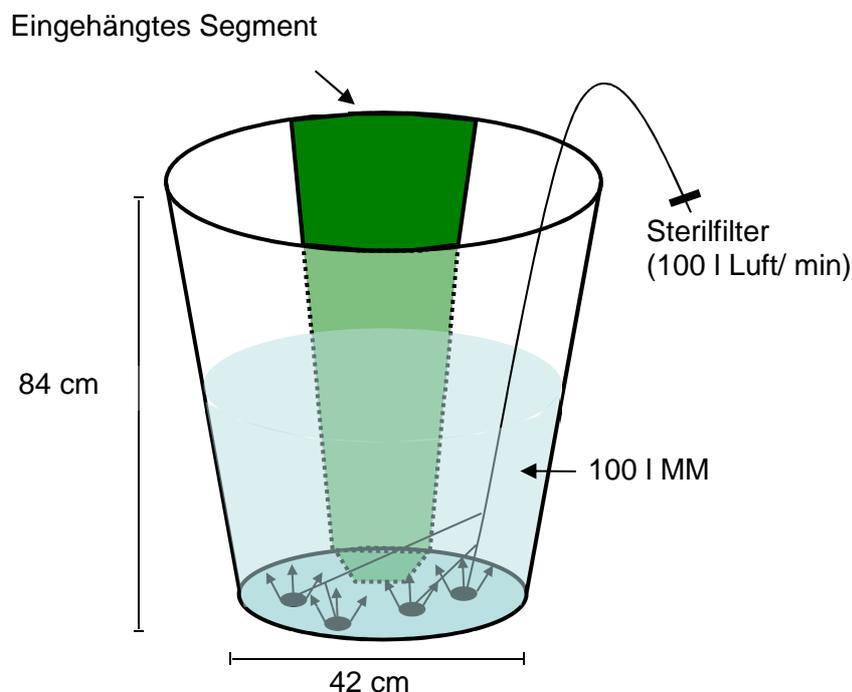


**Abbildung 3.1: Selektionskriterien bedingen das Wachstum einer Monokultur unter minimal-sterilen Bedingungen.** Die Gesamtheit der Mikroorganismen mit ihren Wachstumsbedingungen ist schematisch dargestellt. Wird ein spezifisches Kultivierungskriterium, z.B. Triglyzeride als Kohlenstoffquelle, gewählt, wird das Wachstum einer kleinen Teilmenge Mikroorganismen unterstützt. Die größere Teilmenge wird vom Wachstum ausgeschlossen. Die Anwendung einer Mehrzahl von Selektionskriterien engt die kultivierbare Mikroorganismengruppe zusätzlich ein. So ist die Kultivierung unter ausgewählten Bedingungen ohne Sterilisation der Prozessanlage und des Kultivierungsmediums möglich.

Die Begasung des Systems erfolgte durch komprimierte Luft über einen Sterilfilter. Dies hat mehrere Vorteile:

- I) die Vermischung des Mediums ist gewährleistet,
- II) der Eintrag von Luft ermöglicht den Sauerstoffübergang in die Flüssigphase, welche dem Mikroorganismus zugänglich ist. Ein effektiver Gasaustausch sollte somit gewährleistet sein, bei dem im Gegenzug das gebildete Kohlendioxid aus dem System ausgetragen wird,
- III) eine isotherme Kultivierung wird gewährleistet,
- IV) komplexe Rührapparate werden ausgeschlossen und ein Kühlsystem kann vermieden werden,
- V) Scherkräfte werden klein gehalten, was die Zellen für einen längeren Zeitraum intakt hält, so dass geringe Mengen von komplexen Bestandteilen in das Medium abgegeben werden.

Die Investitionskosten wurden durch die Kultivierung in einem 200 l Polypropylen-Reaktionsgefäß gering gehalten werden. Schematisch basierte der Aufbau auf der folgenden Abbildung 3.2. Das System wurde mit 100 l Minimalmedium gefüllt und eingehängte Segmente dienten dem Aufwuchs des Mikroorganismus. Die Kultivierung wurde im „Batch“-Verfahren über einen Zeitraum von acht bis zwölf Tagen durchgeführt.



**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des 100-l-Kultivierungsmaßstabes in einem offenen 200 l Reaktionsgefäß.** Zur Begasung wurden 100 l Luft/ min über einen Sterilfilter mittels vier Belüftungseinheiten verteilt. Ein zweites Kultivierungsgefäß wurde in sechs gleich große Teile geschnitten, fünf dieser Segmente wurden in 100 l Minimalmedium (MM) gehängt. Diese dienten dem Aufwuchs des Mikroorganismus als Biofilm, welcher von den Segmenten geerntet werden konnte.

### 3.3 Kompostisolat *Phialemonium curvatum* AW02, ein Lipase-bildender Pilz

Auf der Suche nach einem Pilz, welcher eine extrazelluläre, säurestabile und -aktive Lipase bildet, wurde der Pilz *Phialemonium curvatum* AW02 von der Arbeitsgruppe Stahmann aus Kompost isoliert. Es zeigte sich, dass dieser filamentös wachsende Pilz gut unter den gewählten Selektivbedingungen wuchs. Ein weiterer Vorteil war die Produktion hydrophiler Sporen in einer Größenordnung bis  $10^8$  Sporen/ml, was eine gute und einfache Animpfung möglich machte.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass *P. curvatum* AW02 während des Wachstums an Oberflächen haftet. Er bildet einen Biofilm, so dass eine einfache und kostengünstige Ernte möglich ist. Durch die genannten stringenten Kultivierungskriterien war es möglich, eine Monokultur von *P. curvatum* AW02 im 100-l-Maßstab in einem Polypropylen-Reaktionsgefäß ohne unerwünschte Komensalen über einen Kultivierungszeitraum von 8-12 Tagen zu kultivieren (Stahmann *et al.*, 2008).

*Phialemonium spec.* wurde erstmals 1983 von Gams *et al.* beschrieben und als Ascomycet klassifiziert. Diese Art ist weit verbreitet und konnte aus Luft, Bodenmaterial sowie Wasser isoliert werden (Gams *et al.*, 1983). Im Jahr 2004 waren 13 Fälle von Infektionen mit *Phialemonium spec.* bekannt, 11 davon betrafen immunsupprimierte Patienten. Dies lässt darauf schließen, dass *P. curvatum* ein opportunistisch humanpathogener Krankheitserreger ist (Proia *et al.*, 2004). Um die weitere Arbeit mit diesem Pilz in dem vorgestellten System zu gewährleisten, war eine eingehende Charakterisierung nötig.

Ein weiterer interessanter Punkt sind die extrazellulären Lipasen von *P. curvatum* AW02. Es wurde gezeigt, dass dieser Pilz bei einer hohen Hydronium-Ionen-Konzentration auf Triglyzeriden wächst, was die Lipasen als säureaktive Enzyme interessant macht. Säurestabile und -aktive Lipasen sind vor allem in der Medizin als Ersatz für die pankreatische Lipase wichtig. Die Hauptanforderung für einen Einsatz bei pankreasinsuffizienten Patienten ist eine gute Aktivität der Lipase bei pH 4 sowie im neutralen Bereich (Aloulou *et al.*, 2007).

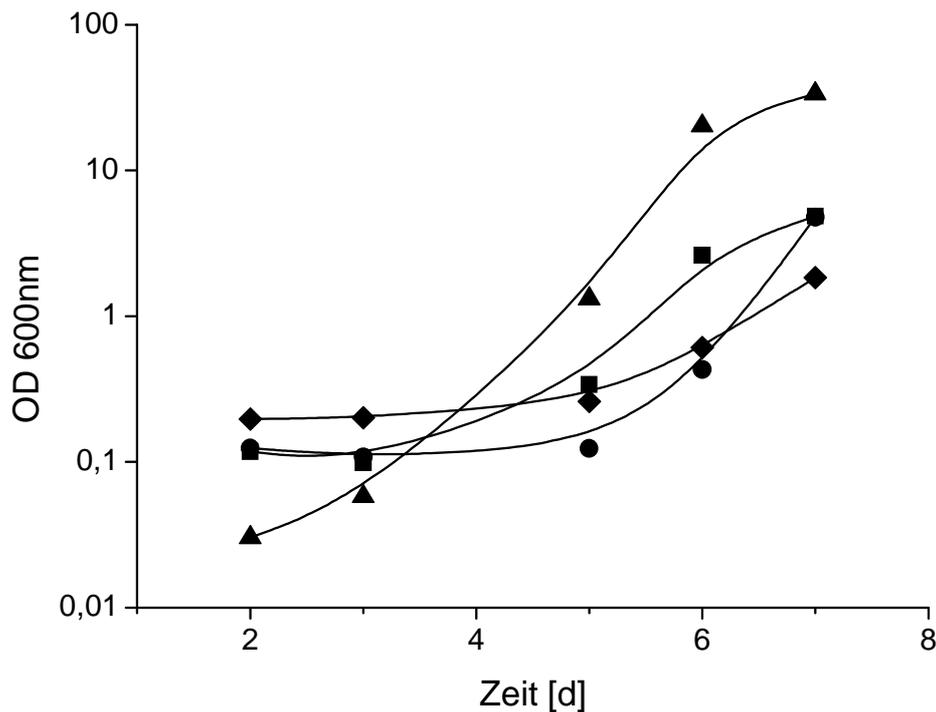
## 3.4 Charakterisierung und Optimierung des Kultivierungssystems mit minimierter Steriltechnik

### 3.4.1 Charakterisierung der Selektivbedingungen

Um die Robustheit des Systems bei der Kultivierung mit Minimalmedium zu überprüfen, wurden drei ausgewählte Kriterien, welche den beschriebenen Selektionsdruck hervorrufen, betrachtet. Bei der Durchführung von Experimenten im 100-ml-Maßstab wurden einzeln folgende Punkte verändert:

- I) Pflanzenöl als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle wurde gegen Glucose ausgetauscht,
- II) das Wachstum bei pH 3 bis 4 mit dem Wachstum bei pH 7 verglichen, und
- III) Nitrat wurde als Stickstoffquelle durch Ammonium ersetzt.

Das Wachstum von Mikroorganismen ohne Beimpfung, z.B. mit Bakterien aus der Laborluft, den Medienbestandteilen oder den Laborgefäßen wurde mittels Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) ermittelt (Abbildung 3.3). Das für die Kultivierung eingesetzte Minimalmedium mit allen gewählten Selektionsbedingungen war fünf Tage stabil. Erst am sechsten Tag war ein signifikanter Anstieg der  $OD_{600}$  messbar. Am deutlichsten wirkte sich die Änderung I) auf das Wachstum ohne Beimpfung aus. Dabei wurde bereits nach drei Tagen ein Wachstum von Mikroorganismen verzeichnet. Unter der Bedingung II), der Veränderung des pH-Wertes, wurde ebenfalls, wie bei der Einhaltung aller Selektionsbedingungen, ein Anstieg der optischen Dichte an Tag sechs verzeichnet. Bei dem Austausch von Nitrat gegen Ammonium im Kultivierungsmedium (III)) konnte Wachstum von Mikroorganismen ab Tag fünf bestimmt werden.

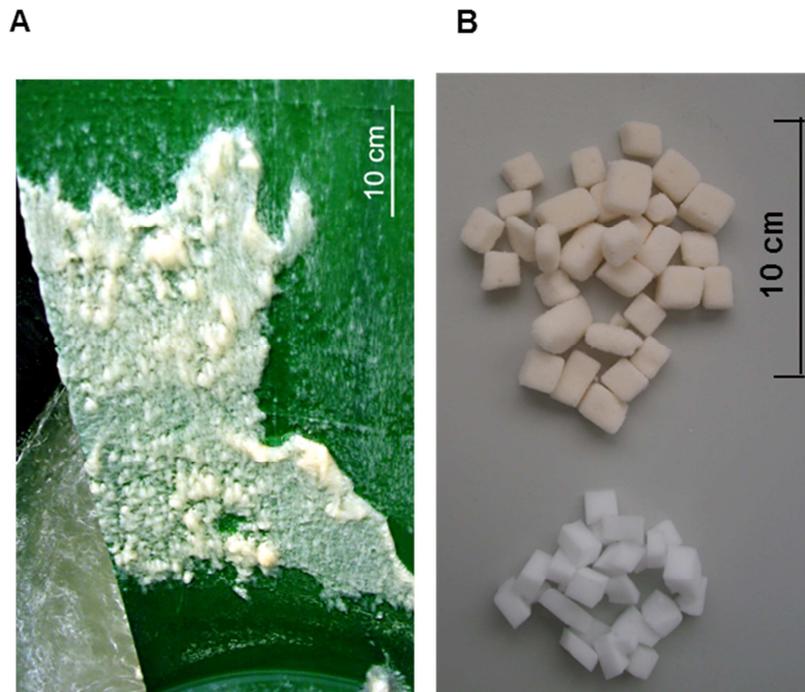


**Abbildung 3.3: Zeitlicher Verlauf über den Aufwuchs von Mikroorganismen in unsterilen Schüttelkolben gefüllt mit verschiedenen Minimalmedien.** Wachstum wurde durch die Änderung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt. Höchste Selektivität erreichte das Minimalmedium mit Rapsöl als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle sowie Nitrat als Stickstoffquelle und pH 3 (●). Minimierter Selektionsdruck wurde durch den Austausch von Fett gegen Glucose (▲), Nitrat gegen Ammonium (■) oder pH 3 anstelle von pH 7 (◆) gezeigt. Der Mittelwert zweier unabhängiger Durchführungen des Experiments wurden zur Datenanalyse genutzt.

### 3.4.2 Robustes Wachstum unter Selektivbedingungen im 100-l- und 350-l-Maßstab

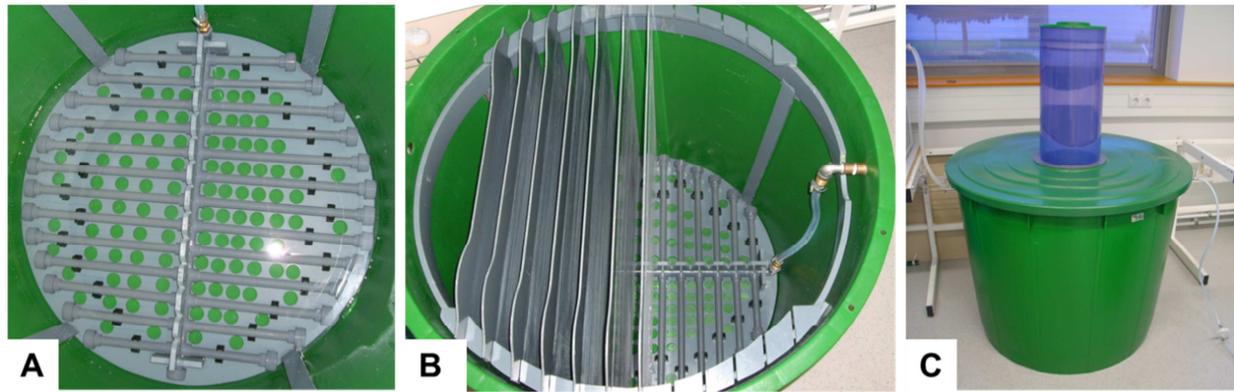
Ein 200 l Polypropylen-Reaktionsgefäß wurde mit 100 l Minimalmedium gefüllt. Standardmäßig wurde 1 l Rapsöl als Kohlenstoff- und Energiequelle zugesetzt. Abbildung 3.2 zeigt den schematischen Aufbau der offenen Kultivierungseinheit. Die Durchmischung wurde durch den Eintrag von 100 l/min komprimierter Luft über vier lokale Belüftungseinheiten gewährleistet (Abbildung 3.2). Da *P. curvatum* AW02 einen Biofilm bildet, wurde geeignetes Trägermaterial gewählt. Zum einen wurde ein zweites Kultivierungsgefäß in sechs gleich große Teile geschnitten und die Oberfläche aufgeraut. Ein einfaches Abstreifen des aufgewachsenen Biofilms vom Segment war möglich (Abbildung 3.4A). Alternativ wurden Basotect™ Würfeln von der Firma BASF (Schwarzheide, Germany) genutzt. Dabei handelt es sich um ein offenporiges Melaminharz, welches über Bünde und Stege vernetzt ist. Würfel von circa 1 cm<sup>3</sup> wurden vorbereitet und dem Medium zugegeben.

Diese Basotect™ Würfel wurden im Reaktorsystem durch die aufsteigenden Luftblasen verwirbelt. Zusammen mit der wässrigen und der öligen Phase ergab sich daraus ein Drei-Phasen-Wirbelschichtreaktor. *P. curvatum* AW02 bewuchs dieses Material und konnte leicht durch Siebe von der Kulturbrühe getrennt werden (Abbildung 3.4B).



**Abbildung 3.4: Aufwuchs von *Phialemonium curvatum* AW02 auf verschiedenes Trägermaterial während der Kultivierung in einem offenen 200 l Reaktionsgefäß. A: Unterer Teil eines eingehängten Segmentes mit Biofilmbewuchs von AW02 nach fünf Tagen Wachstum. B: BASOTECT™ Würfel als Trägermaterial ohne (unten) und mit AW02 Biofilm (oben).**

Um die Lipase- und Biomasseproduktion zu erhöhen, wurde die maßstabsgerechte Vergrößerung des Kultivierungssystems, ein sogenanntes „Scale up“, verfolgt. Ein 500 l Polypropylen-Reaktionsgefäß wurde dafür mit 350 l entsprechendem Minimalmedium gefüllt und *P. curvatum* AW02 kultiviert. Die Durchmischung erfolgte wiederum durch die Belüftung mit komprimierter Luft über einen Sterilfilter mit 100 l/min. Um eine bessere Begasung mittels der aufsteigenden Luftblasen zu ermöglichen, war der Einbau eines Röhrensystems erforderlich (Abbildung 3.5A). Die am Boden fixierten Rohre wurden mit Bohrungen versehen, welche die Luft über das gesamte Volumen fein verteilen. Der Aufwuchs des Biofilms wurde analog zum 100-l-Maßstab auf zwei unterschiedlichen Trägern untersucht, zum einen wurden aufgeraute Polypropylen-Platten in das System gehängt (Abbildung 3.5B) oder circa 6000 BASOTECT™ Würfel in die Kulturbrühe gegeben. Abbildung 3.5C zeigt das Kultivierungsgefäß mit einem entwickelten Abluftsystem bei dem es zur Abscheidung des Kondenswassers durch zwei Abscheidevorrichtungen und ein Filtersystem kommt.



**Abbildung 3.5: Kultivierungssystem für den 350-l-Kultivierungsmaßstab.** **A:** In die Kultivierungstonne wurde ein Röhrensystem integriert, welches aus einer Hauptachse und 13 Nebenachsen bestand. Komprimierte Luft wurde in das System gepresst und über Öffnungen, welche über das Röhrensystem verteilt waren, in das Medium abgegeben. **B:** Das Röhrensystem ist fest auf dem Boden der Tonne fixiert. Zwölf hängende Plastiksegmente dienen als Träger für den aufwachsenden Pilz. **C:** Die geschlossene Tonne hat ein in den Deckel integriertes Abluftsystem bestehend aus zwei Schikanen, welche Tröpfchen sammeln und einen Gewebefilter, der die Freisetzung von Aerosolen minimiert.

Die Kultivierungsstabilität gegenüber bakterieller Kontamination im 100-l- und 350-l-Kultivierungsmaßstab wurde in einer Reihe von Kultivierungen getestet. Tabelle 3.1 fasst die ersten 13 Durchgänge, wobei acht im 100-l- und fünf im 350-l-Maßstab durchgeführt wurden, zusammen. Jeder Kultivierungsgang wurde von anderen Personen mit unterschiedlichen Labor-Erfahrungen durchgeführt. Dabei musste nur in einem Fall (Durchgang Nr.:3, Tabelle 3.1) die Kultivierung wegen einer bakteriellen Kontamination abgebrochen werden. Anzumerken ist dabei, dass mit Glucose supplementiert wurde, um den Einfluss auf Wachstum, Dauer der Kultivierung und Lipaseproduktion zu testen.

**Tabelle 3.1: Robustheit der Kultivierung von *Phialemonium curvatum* AW02 ohne Sterilisierung des 200-l bzw. 500-l-Behälters und des Kultivierungsmediums.** Acht der 13 Durchgänge wurden im 100 l Kultivierungsvolumen durchgeführt, fünf im 350 l Maßstab. Der pH Wert im Medium wurde einmal pro Tag gemessen. Bei einem pH Wert von 4 wurde eine Rücktitration auf pH 3 mit HCl durchgeführt. Bakterielle Kontamination wurde mittels Lichtmikroskopie überprüft. *Para*-Nitrophenyl-Palmitat wurde zur Lipaseaktivitätsbestimmung genutzt. Wurden Sporen von AW02 durch Mikroskopie gefunden, wurde die Kultivierung beendet. "Nein" bei der Kontamination bedeutet ein klares Kulturfiltrat ohne sichtbare Bakterien mittels Mikroskopie. <sup>+</sup> Biofilm Bewuchs und Ernte von angerauten Plastik Segmenten oder Platten, <sup>#</sup> poröse BASOTECT™ Würfel als Wachstumsträger, \* Kulturmedium wurde zusätzlich mit 1 g/l Glucose angereichert.

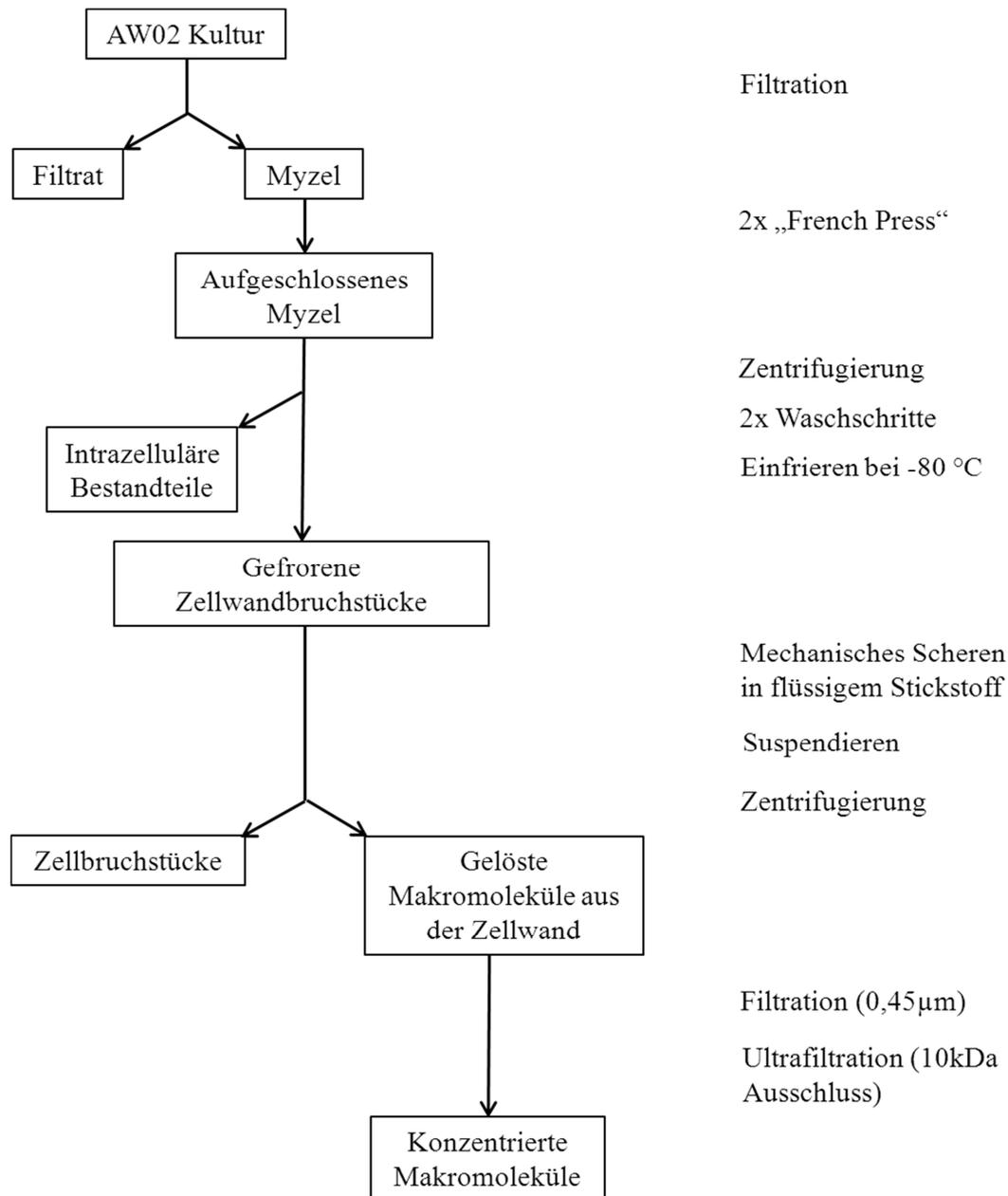
Durchgang Nr.	Kultivierungs- volumen	pH Titration	Kontamination	Gesamt- Lipase- aktivität	Kultivierungs- dauer
1 <sup>+</sup>	100 L	nein	nein	12 kU	7 d
2 <sup>+</sup>	100 L	nein	nein	28 kU	7 d
3 <sup>*/+</sup>	100 L	nein	ja	-	6 d
4 <sup>+</sup>	100 L	nein	nein	13 kU	11 d
5 <sup>#</sup>	100 L	nein	nein	10 kU	10 d
6 <sup>+</sup>	100 L	ja	nein	8 kU	8 d
7 <sup>#</sup>	100 L	ja	nein	17 kU	9 d
8 <sup>+</sup>	100 L	ja	nein	22 kU	10 d
9 <sup>#</sup>	350 L	ja	nein	20 kU	8 d
10 <sup>#</sup>	350 L	ja	nein	8 kU	5 d
11 <sup>#</sup>	350 L	ja	nein	12 kU	7 d
12 <sup>+</sup>	350 L	ja	nein	6 kU	8 d
13 <sup>+</sup>	350 L	ja	nein	18 kU	11 d

Es konnte bestätigt werden, dass ein robustes, selektives Kultivierungsverfahren entwickelt wurde, welches über einen Zeitraum von bis zu elf Tagen ohne bakterielle Kontamination durchgeführt werden kann. Konzentrationen an Lipaseaktivität von 34-280 U/l konnten erreicht werden. Wildtyp-Fermentationen von filamentösen Pilzen zur Lipaseproduktion in einem flüssigen „Batch“-betrieb ergaben Lipaseaktivitäten von 5.000 – 15.000 U/l (Sharma *et al.*, 2001; Treichel *et al.*, 2010).

Die Aktivität von verbesserten oder rekombinanten Stämmen wie *A. niger*, welcher die *T. lanuginosus* Lipase überexprimiert, liegt bei 5.700 U/g Trockengewicht. *P. curvatum* AW02 erreichte vergleichsweise Lipaseaktivitäten von 0,9 U/g Trockengewicht, was in einem nicht konkurrenzfähigen Bereich liegt (Prathumpai *et al.*, 2004). Um das Potential der extrazellulären Lipasen von *P. curvatum* AW02 besser einschätzen zu können, wurden diese teilweise charakterisiert.

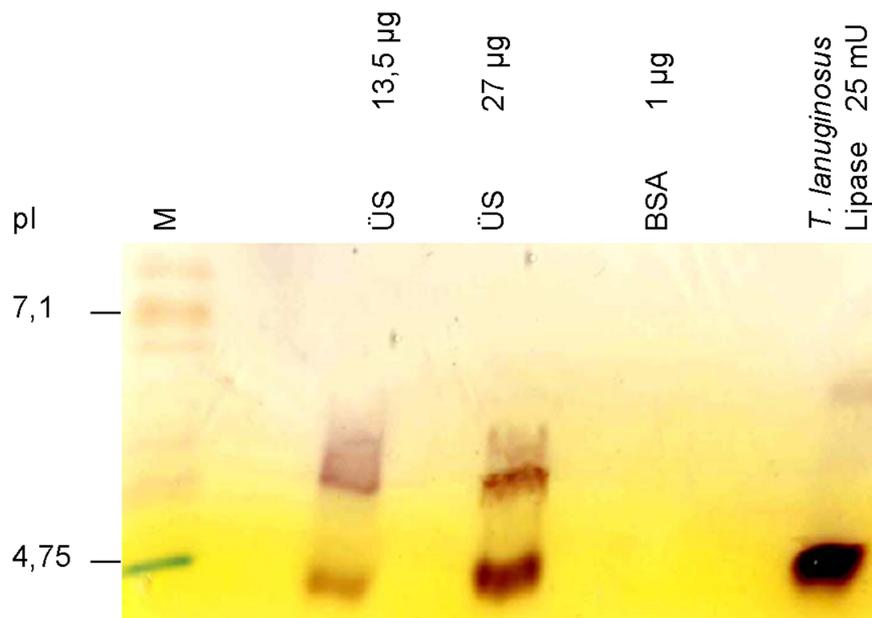
### 3.5 Charakterisierung der *Phialemonium curvatum* AW02 Lipasen

*P. curvatum* AW02 wächst bei niedrigen pH Werten zwischen pH 2,5 und pH 4 unter Selektivbedingungen, d.h. Triglyzeride als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle. Diese Fähigkeit lässt darauf schließen, dass mindestens eine extrazelluläre säurestabile und -aktive Lipase sekretiert wird. Lipasen, welche eine hohe Konzentration an Hydroniumionen tolerieren, sind zurzeit im Gegensatz zu alkalischen Lipasen nur wenig verfügbar. Ein Großteil verfügbarer säureaktiver Lipasen wird von Pilzen produziert (Sangeetha *et al.*, 2011). Extrazelluläre Lipasen können entweder frei in die Umgebung diffundieren oder liegen zellwandgebunden vor. Nach Trennung des Myzels von der Kulturbrühe konnte die extrazelluläre lipolytische Aktivität als zellwandgebunden klassifiziert werden. Eine Lösung des Enzyms und somit der lipolytischen Aktivität von der Zellwand mittels Salzen (NaCl), alkalisch-wässrigen Lösungen (NaOH), Detergenzien (SDS) oder zellwanddegradierenden Enzymen war nicht erfolgreich. Nur eine aufwendige Prozedur konnte die zellwandgebundenen Enzyme mit lipolytischer Aktivität von den Zellen trennen (Abbildung 3.6). Dabei wurde mittels „French Press“ und anschließender Zentrifugierung der Zellwandanteil vom Zellinhalt getrennt. Nachfolgend wurden die Bruchstücke der Zellwand in flüssigen Stickstoff mit einem Mörser zerrieben. Dieses komplexe „Down Stream Processing“ führte zu freier Lipase (Barig *et al.*, 2011).



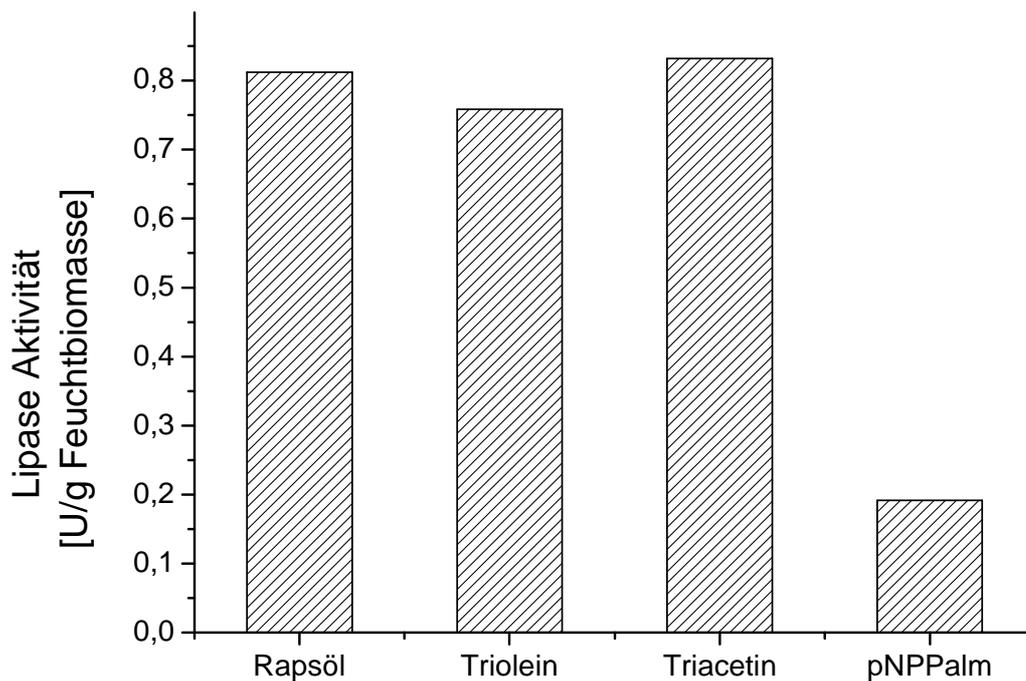
**Abbildung 3.6:** Freisetzung zellwandgebundener Lipasen von *Phialemonium curvatum* AW02.

Das Gemisch aus freigesetzten Zellwandbestandteilen wurde genutzt, um weitere Charakterisierungen durchzuführen. Mittels isoelektrischer Fokussierung und nachfolgender Esteraseaktivitätsfärbung konnten zwei Banden bei pI 4,7 und pI 5,6 identifiziert werden (Abbildung 3.7). Somit konnten in der Fraktion der freigesetzten zellwandgebundenen Proteine mindestens zwei esterolytische Enzyme nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.7: Visualisierung von aus der Zellwand von *P. curvatum* AW02 freigesetzten Lipasen durch Aktivitätsfärbung in einem Gel nach isoelektrischer Fokussierung.** Aus dem Überstand (ÜS) wurden 13,5 µg bzw. 27 µg freigesetzte Proteine aufgetragen, die durch mechanisches Scheren gewaschener Zellwände freigesetzt wurden. 1 µg Rinderserumalbumin und 25 mU *T. lanuginosus* Lipase dienten als negative bzw. positive Kontrolle. M: IEF Standardproteine: Human Hemoglobin C, pI 7,5; Human Hemoglobin A: pI 7,1; Myoglobin vom Pferd: pI 6,8; Phycocyanin: pI 4,75.

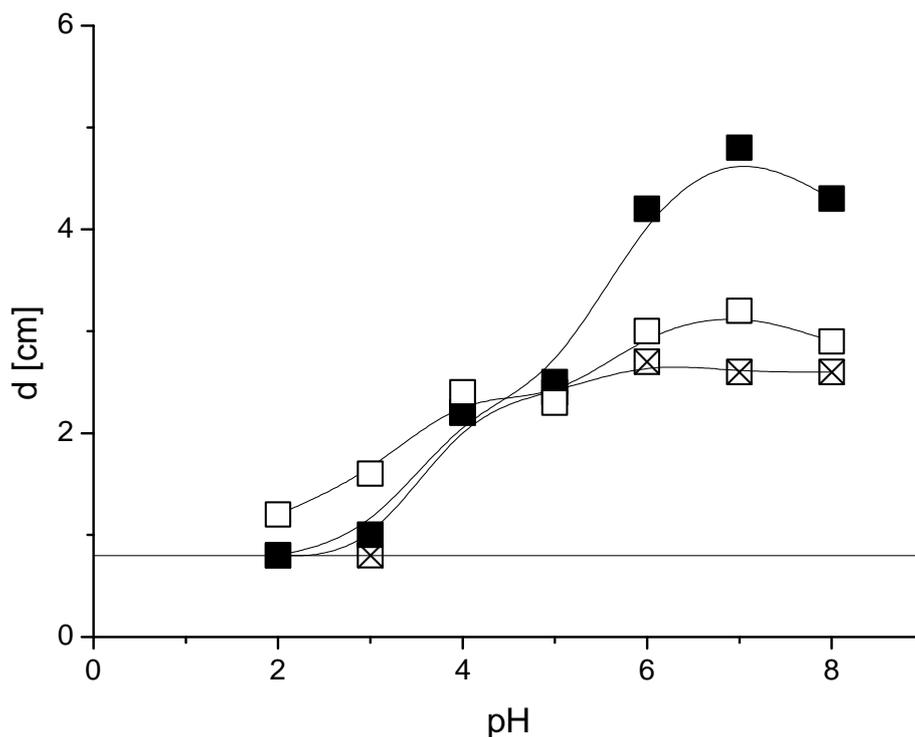
Die Substratabhängigkeit der zellwandgebundenen Lipasen wurde gegenüber dem in Lösung befindlichen *p*-Nitrophenyl-Palmitat und emulsionsbildenden Substraten wie Triacetin, Triolein, und Rapsöl untersucht. Dabei wurde das geerntete Myzel direkt zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt (Abbildung 3.8). Die zellwandgebundenen Lipasen von *P. curvatum* AW02 zeigen eine klare Präferenz für Triglyzeride, die auf das Vorhandensein von mindestens einer Lipase hinweist. Die Aktivitätsunterschiede zwischen lang- (C18) und kurz- (C2) kettigen Triglyzeriden sind dabei nicht signifikant.



**Abbildung 3.8: Substratspezifität der zellwandgebundenen Lipasen von *Phialemonium curvatum* AW02.** Die Lipaseaktivität wurde mittels Titrimetrie, bezogen auf Rapsöl, Triolein und Triacetin sowie spektrophotometrisch gegenüber auf *p*-Nitrophenyl-Palmitat (pNPPalm), bestimmt. Feuchtbioasse suspendiert in 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7) wurde im jeweiligen Nachweissystem eingesetzt. Der Mittelwert zweier unabhängiger Experimente ist dargestellt.

Um das Spektrum der Aktivität bei unterschiedlichen pH Werten beurteilen zu können, wurden die freigesetzten *P. curvatum* AW02 Lipasen in dem neu entwickelten Lipase-Nachweissystems im Petri-Platten-Maßstab verglichen (Abbildung 3.9). Dieses Nachweissystem basiert auf einer Tributyrin/Wasser Emulsion, welche durch Agar im Mikrotiter- bzw. Petri-Platten-Maßstab stabilisiert wird. Zwei Schichten, die untere ohne und die obere mit dem Substrat Tributyrin, sollen eine kurze Reaktionszeit ermöglichen und die Interferenz mit den Hydrolyse-Produkten minimieren (Barig *et al.*, 2013). Die Lipasen von *P. curvatum* AW02 zeigten Aktivität im Bereich pH 2 bis 8 und hatten ihr Optimum bei pH 7. Da keine reine Lipase, sondern ein Gemisch vorlag, könnte es neben der Hydrolyse zu Nebeneffekten, wie z.B. Zellwandfragmente als Lösungsvermittler der Tributyrin-Tröpfchen, kommen. Weiterhin kann Tributyrin auch von Esterasen hydrolysiert werden, da es bis zu einer Konzentration von 0,8 mM wasserlöslich ist (Berg *et al.*, 1998). Vergleichend wurden zwei gut untersuchte Lipasen, die *T. lanuginosus* Lipase sowie die *R. miehei* Lipase auf das System angewandt.

*T. lanuginosus* Lipase zeigte in diesem System ein pH Optimum von 7 und war aktiv zwischen pH 4 und 8. Das Optimum wird durch Literaturwerte bestätigt, wobei eine Langzeitstabilität über 24 h im Bereich pH 5 bis 9 ermittelt wurde (Omar *et al.*, 1987). Die *R. miehei* Lipase wurde in der Literatur mit einem pH Optimum von 8 und eine Langzeitstabilität im Bereich pH 7 bis 10 beschrieben (Wu *et al.*, 1996). Die vorliegenden Ergebnisse bestimmen ein Optimum bei pH 7, wobei darauf zu achten ist, dass das System Tributyrin als Substrat und die Arbeiten von Wu *et al.* (1996) auf der Hydrolyse von Olivenöl beruhen. Werden alle drei Lipasen verglichen, konnte bei pH 2 nur bei der *P. curvatum* AW02 Präparation noch Tributyrin-Hydrolyse festgestellt werden. Setzt man die Aktivität der drei Lipasen bei pH 6 auf 100 %, erreicht *P. curvatum* AW02 für pH 2 noch 40 % der maximalen Aktivität. *T. lanuginosus* Lipase zeigt ab pH 3 Lipaseaktivität, welche 23 % der Aktivität bei pH 6 entspricht. *Rhizomucor miehei* Lipase hingegen zeigt lipolytische Aktivität ab pH 4 mit 83 % gegenüber der Ausgangsaktivität bei pH 6. Daraus lässt sich schließen, dass die *P. curvatum* AW02 Lipase säurestabil und -aktiv ist.



**Abbildung 3.9: Abhängigkeit der Trübungsklärun einer Tributyrin-Emulsion vom pH.** Das turbidimetrische Lipase-Nachweissystem im Petri-Platten-Maßstab wurde mit verschiedenen Puffersystemen auf einen pH zwischen 2 und 8 eingestellt (pH 2-5: 0,05 M Na-Citrat; pH 5-7: 0,05 M Na-Phosphat; pH 8: 0,05 M Tris-HCl). Von drei verschiedene Lipasen wurde ein Volumen von 20 µl in vorgefertigte Ausstanzungen (Ausgangsdurchmesser d entspricht der horizontalen Linie) gegeben, *T. lanuginosus* Lipase (■) 7,4 mU, *R. miehei* Lipase (⊗) 0,3 mU sowie *P. curvatum* AW02 Lipase (□) 6,4 mU. Nach Inkubation von 24 h bei 30 °C wurde der Durchmesser der Klärhöfe bestimmt und vergleichend dargestellt. Zwei unabhängige Experimente wurden durchgeführt und der Mittelwert aufgetragen.

Es konnte gezeigt werden, dass die extrazellulären Lipasen von *P. curvatum* AW02 zellwandgebunden vorliegen. Eine Freisetzung der Lipasen kann durch mechanisches Scheren unter Einfluss von flüssigem Stickstoff erreicht werden. In dem freigesetzten Proteingemisch befinden sich zwei Proteinfractionen, welche esterolytische Aktivität nach isoelektrischer Fokussierung zeigen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Gemisch von Proteinen aktiv ist gegenüber lipolytischen Substraten, z.B. Triolein. Im sauren pH Bereich konnte Aktivität nachgewiesen werden.

Somit lässt sich schlussfolgern, dass mindestens eine aktive extrazelluläre Lipase zellwandgebunden vorliegt, weil nicht ausgeschlossen werden kann, dass eines der zwei im IEF-Gel gefundenen Enzyme eine Esteraseaktivität aufweist. Argumente für Säurestabilität und -aktivität sind einerseits die *in vitro* Daten aus den vorgestellten Experimenten zur Aktivität bei niedrigem pH und andererseits die Wachstumsexperimente. Hier wurde eine Lipase isoliert, welche für weitere Anwendungen bei hoher Hydroniumionen Konzentration anwendbar ist.

Um das weitere Potential dieser Lipase(n) zu testen sowie eine Abgrenzung zwischen Esterase und Lipase vorzunehmen, wäre eine Identifizierung der Lipasegene wünschenswert. Lipasen zeigen oft wiederkehrende Sequenzabfolgen, welche durch eine vergleichende Analyse mit dem Genom von *P. curvatum* AW02 einen Hinweis auf Lipasegene geben würde. Ein geeignetes Expressionssystem, wie z.B. *A. niger*, könnte die Lipase(n) in höheren Quantitäten exprimieren, um weitere Eigenschaften zu charakterisieren, wie z.B. die Temperaturstabilität oder den Einfluss von positiven und negativen Effektoren.

Ein mögliches Anwendungsgebiet für säurestabile und –aktive Lipasen ist der Ersatz der humanen pankreatischen Lipase. Dafür wären weitere Experimente nötig, wie zum Beispiel: Analyse des Einflusses verschiedener Konzentrationen von Gallensalzen auf die Lipaseaktivität, eingehende Untersuchung der Hydrolyse von Nahrungsfetten sowie die Resistenz gegenüber humaner Proteasen (Aloulou *et al.*, 2007).

Des Weiteren sind membrangebundene Lipase oft stabiler als frei diffundierende, da sie schon an der Zellwand oder –membran immobilisiert vorliegen (Colin *et al.*, 2011). Daher wäre der Einsatz als Ganzzellkatalysator für die Biodieselproduktion oder in Biogasanlagen denkbar.

Das vorgestellte selektive Kultivierungsverfahren wurde mit *P. curvatum* AW02 etabliert. Um die Möglichkeiten zu verbreitern, z.B. gentechnisch voll entwickelte Expressionssysteme anzuwenden, wurde nach weiteren Mikroorganismen gesucht, die in dem System kultivierbar sind.

### 3.6 Wachstum weiterer Mikroorganismen auf dem Selektivmedium

Verschiedene Mikroorganismen wurden im selektiven Kultivierungsverfahren auf ihr Wachstum getestet (Tabelle 3.2). Jeder von ihnen zeigte Wachstum auf dem vorgestellten selektiven Minimalmedium mit Rapsöl als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle.

In ersten Experimenten wurde gezeigt, dass eine Isolierung von Mikroorganismen aus Luft oder Kompost weitere Kandidaten für das selektive Kultivierungssystem hervorbringen kann. Eine Identifizierung erfolgte mittels der Sequenzierung der „Internal Transcribed Spacer“ (ITS Region) (Barig *et al.*, 2011). Diese Region liegt auf dem nuklearen rRNA Cluster, welcher aus den drei Genen für die 18S, 5,8S und 28S rRNA besteht. Die konservierten Regionen zwischen den Genen, die ITS, eignen sich sehr gut für die phylogenetische Analyse von Pilzen (Schoch *et al.*, 2012).

In einem zweiten Ansatz wurde nach gut untersuchten Stämmen in der Literatur gesucht, welche eine nachgewiesene extrazelluläre Lipase besitzen. Ein weiteres Kriterium war, dass diese extrazellulären Lipasen möglichst säurestabil und -aktiv waren oder die Stämme bevorzugt im sauren Milieu wachsen. Einer der Stämme, *Aspergillus niger*, ein anerkannter GRAS Mikroorganismus, welcher großtechnisch für die Produktion von Citronensäure genutzt wird (Alvarez-Vasquez *et al.*, 2008), produzierte in der Festbettfermentation eine säurestabile und –aktive Lipase. Diese Lipase wies ein pH Optimum bei pH 2,5 auf und war bei pH 1,5 noch zu 75 % aktiv (Mahadik *et al.*, 2002). Dies machte *Aspergillus niger* zu einem geeigneten Kandidaten für das vorgestellte selektive Minimalmedium. Gleiches galt für *Aspergillus oryzae* (aktive Lipase bei pH 4,0- 7,5; Toida, *et al.*, 1998), *Penicillium chrysogenum* (aktive Lipase bei pH 3- 10; Bancarz *et al.*, 2005), *Trichoderma reesei* (aktive Lipase bei pH 3,5- 8; Rajesh *et al.*, 2010) sowie *Yarrowia lipolytica* (aktive Lipase bei pH 4,5- 5,0; Domínguez *et al.*, 2003). Diese fünf Stämme wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bestellt und in dem vorgestellten Kultivierungssystem im 100 ml Labormaßstab auf Wachstum getestet. Ein weiterer Laborstamm, *Botrytis cinerea* B05.10, wurde auf sein Wachstum im Minimalmedium getestet (Reis *et al.*, 2005). Auch dieser pflanzenpathogene filamentöse Pilz zeigte Wachstum auf dem Minimalmedium (Barig *et al.*, 2011).

**Tabelle 3.2: Auswahl von Mikroorganismen, die auf Minimalmedium wachsen.** Die erste Kategorie bildeten Mikroorganismen, welche aus verschiedenen natürlichen Quellen isoliert wurden. Die Identifizierung erfolgte mittels ITS Sequenzierung (Barig *et al.*, 2011). In der zweiten Kategorie wurden nach Literaturrecherche anerkannte GRAS Organismen mit bekannter säureaktiver- und stabiler Lipase getestet.

Mikroorganismus	Quelle	DSMZ Nummer (Braunschweig, Germany)	Optimale Wachstums- temperatur
<i>Pseudozyma</i> sp. (JS01)	Luft	DSM 23899	23°C
<i>Torrubiella</i> sp. (JS02)	Luft	DSM 23900	23°C
<i>Phialemonium curvatum</i> (AW02)	Kompost	DSM 23903	30°C
<i>Geotrichum candidum</i> (JS04)	Kompost	DSM 23901	26°C
<i>Mucor circinelloides</i> (JS05)	Kompost	DSM 23902	28 °C
<i>Aspergillus niger</i>	DSMZ	DSM 11167	25 °C
<i>Aspergillus oryzae</i>	DSMZ	DSM 63303	30 °C
<i>Penicillium chrysogenum</i>	DSMZ	DSM 4154	24 °C
<i>Trichoderma reesei</i>	DSMZ	DSM 768	24 °C
<i>Yarrowia lipolytica</i>	DSMZ	DSM 8218	25 °C
<i>Botrytis cinerea</i> B05.10	Laborstamm (M. Hahn, Universität Kaiserslautern)	-	20 °C oder Raumtemperatur

Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur der Beispielmikroorganismus *P. curvatum* AW02 im selektiven Kultivierungssystem wächst, sondern auch anerkannte GRAS Mikroorganismen und weitere Naturisolate. Somit erweitert sich das Potential der Biomasse- und Lipaseproduktion auf niedermolekulare Produkte, wie z.B. Zitronensäure durch *A. niger*.

### 3.7 Wirtschaftliche Potentiale

Das Ziel war es, ein in der Durchführung einfaches und kostengünstiges Kultivierungsverfahren zu etablieren. Um die Rentabilität der Produktion eines Biokatalysators oder niedermolekularer Stoffwechselproduktes im industriellen Maßstab abschätzen zu können, muss ein Produktionsverfahren in ökonomischer Hinsicht betrachtet werden.

Ein prominentes Beispiel bei dem ein biotechnisches Verfahren den chemischen Prozess abgelöst hat, ist die Vitamin B<sub>2</sub> Produktion. Dieses Vitamin, auch Riboflavin genannt, wird als Zusatz für Vitaminpräparate und als Lebensmittelfarbe genutzt.

Zwei separate mikrobielle Verfahren, zum einen mittels *Ashbya gossypii* und zum anderen mit *Bacillus subtilis*, wurden seit den 1990er Jahren etabliert. Nach einer langen Entwicklungsphase wird Vitamin B<sub>2</sub> seit circa zehn Jahren alleinig durch die mikrobiellen Produktionsprozesse hergestellt (Stahmann und Hohmann, 2013). Dieses Beispiel zeigt, dass eine Kalkulation der ökonomischen Faktoren vor der Inbetriebnahme eines Produktionssystems wichtig ist, um die Rentabilität abzuschätzen. Dennoch ist eine endgültige Bestimmung der Wirtschaftlichkeit ein sich entwickelnder Prozess, der mit bestimmt wird durch Verbesserungen des Kultivierungssystems, einer guten Stammentwicklung, sowie einem kostengünstigen „Downstream Processing“.

Eine erste Abschätzung über das selektive Kultivierungssystem mit minimierter Steriltechnik kann in der vorliegenden Arbeit getroffen werden. Eine vollständige Einschätzung, ob das Verfahren konkurrenzfähig ist, hängt von weiteren Faktoren ab, wie einem erfolgreichen „Scale up“ in den großtechnischen Maßstab, der Produktivität des Enzympräparates, dem Marktwert sowie der Marktgröße.

Eine Kostenabschätzung kann in zwei Kategorien eingeteilt werden, die Investitions- und Betriebskosten (Tabelle 3.3). Die Investitionskosten umfassen das Zubehör, um einen Produktionsprozess zu starten. Dabei müssen weitere Faktoren, wie die Abschreibung einer Anlage und spezifische wirtschaftliche Faktoren betrachtet werden (Tufvesson *et al.*, 2011). Im vorliegenden Fall belaufen sich die direkten Kosten für die 350-l-Maßstab-Produktionsanlage, bestehend aus Polypropylen-Reaktionsgefäß, Belüftungssystem und Platten zum Bewuchs des Mikroorganismen-Biofilms, in einer Größenordnung von circa 200 €. Für kleinere Mengen Enzym, welche von mittelständischen Unternehmen produziert werden, wären diese Kosten kein Hindernisgrund, eine Produktion zu starten. Betrachtet man allerdings die konventionelle Fed-Batch Fermentation zur Produktion von Lipasen in Stahlfermentern bei denen Produktionsvolumina zwischen 5 und 150 l bearbeitet werden, liegt die Investitionssumme im fünf- bis sechststelligen Euro-Bereich (Maurer *et al.*, 2013). Da ein Bau dieser kostenintensiven Anlagen mit höheren wirtschaftlichen Risiken verbunden ist, kann dies nur von größeren Unternehmen getragen werden. Weitere Punkte, welche zur Kostenminimierung bei der Produktion von Enzymen oder niedermolekularen Stoffwechselprodukten aus Mikroorganismen betrachtet wurden, sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Vergleichend ist das konventionelle Verfahren zur Enzymproduktion unter sterilen Bedingungen mit den selektiven Kultivierungsverfahren mit minimierter Steriltechnik dargestellt.

**Tabelle 3.3: Betrachtung ausgewählter Kostenpunkte im Vergleich zwischen konventioneller Enzymproduktion und der Produktion im selektiven Kultivierungssystem.** Die Produktionskosten werden in zwei Hauptkategorien, den Investition- und Betriebskosten, eingeteilt. Gegenübergestellt sind die Argumente, welche zur Reduktion der Ausgaben beitragen sollen. Die Einteilung der Kostenkriterien sowie der Zahlenwerte zur Kostenabschätzung berufen sich auf Tufvesson *et al.*, 2011.

	Konventionelle Enzymproduktion unter sterilen Bedingungen	Enzymproduktion im selektiven Kultivierungssystem mit minimierter Steriltechnik
<b>I. Investitionskosten</b>		
Direkte Kosten für die Anlage	<p>Hohe Kosten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Stahlfermenter im Labormaßstab mit einem Kultivierungsvolumen von 30 l erfordert Investitionen im sechsstelligen Bereich</li> <li>- technisches Zubehör, z.B. Überwachungsanlage für die prozessrelevanten Parameter z.B. pH, Sauerstoffsättigung</li> <li>- komplexes Rühr- und Kühlsystem</li> </ul>	<p>Minimierte Kosten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Polypropylen Behälter mit einem Kultivierungsvolumen von 350 l erfordert Investitionen im dreistelligen Bereich</li> <li>- geringe technische Überwachung nötig</li> <li>- Begasung durch komprimierte Luft gewährleistet Durchmischung, Gasaustausch und isotherme Prozessführung</li> </ul>
Indirekte Kosten	- kostenintensive Ausstattung zur Ernte und Aufreinigung der Enzyme, z.B. Zentrifugen, Filtereinheiten zur Separation, Chromathographie-Zubehör	- Ausstattung zur Ernte und Aufreinigung der Enzyme werden minimiert, durch Bewuchs als Biofilm auf porösem Material oder aufgerauten Oberflächen
<b>II. Betriebskosten</b>		
Direkte Kosten	<p>Hohe Kosten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Komplexe Medienbestandteile, z.B. Antibiotika, Vitamine</li> <li>- Energieaufwand durch Sterilisation und Kühlung</li> <li>- Kosten für das „Downstream Processing“ sind je nach gewünschtem Reinheitsgrad entsprechend intensiv</li> <li>- Ganzzelltrennung: 90 €/kg</li> <li>- roher Enzymextrakt aus Kulturbrühe: circa 180 €/kg</li> <li>- Enzym,</li> <li>- reines Enzym: bis zu 1100 €/kg</li> <li>- Enzym</li> </ul>	<p>Minimierte Kosten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Minimalmedium</li> <li>- Sterilisation und Kühlung entfällt</li> <li>- einfache Trennung des Beispielmikroorganismus <i>P. curvatum</i> AW02 vom Reaktionsmedium, da dieser als Biofilm aufwächst</li> <li>- zellwandgebundene Enzyme werden simultan geerntet, Kosten liegen im Bereich der Ganzzelltrennung</li> </ul>
Indirekte Kosten, z.B. Qualitätskontrolle, Gehälter	Kein Unterschied erkennbar	
Festkosten, z.B. Miete, Steuern, Versicherung	Kein Unterschied erkennbar	

Obwohl die dargestellten Punkte aus Tabelle 3.3 überzeugend sind, ist das Verfahren mit dem Beispielmikroorganismus *P. curvatum* AW02 zur Lipaseproduktion nicht konkurrenzfähig. Ein wichtiger Punkt ist die Produktivität, d.h. wieviel lipolytische Aktivität pro Volumeneinheit oder g Biomasse hergestellt werden kann. Im Kapitel 3.4.2 wurde gezeigt, dass Lipaseaktivitäten von bis zu 0,9 U/g Biomasse nach 10 Tagen Kultivierung von *P. curvatum* AW02 erreicht wurden. Verglichen mit einem rekombinanten Stamm von *A. niger* liegen diese Produktionsraten um drei Größenordnungen niedriger (Prathumpai *et al.*, 2004). Wird nun in folgenden Arbeiten die Steigerung der Lipase Expression sowie der Zellzahl verfolgt, könnte die Produktivität so gesteigert werden, dass das vorgestellte Verfahren ökonomisch mit konventionelle Verfahren konkurrieren könnte (Tufvesson *et al.*, 2011).

### 3.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Ein einfach durchzuführendes Kultivierungssystem war in vorangegangenen Arbeiten entwickelt worden. Eine systematische Untersuchung der drei wichtigsten Selektivbedingungen ergab, dass Glucose wesentlich schneller zum Bewuchs des Minimalmediums mit unerwünschten Mikroorganismen führt als Rapsöl. Die Anpassung an einen größeren Kultivierungsmaßstab wurde erfolgreich durchgeführt sowie die Robustheit in 13 Kultivierungsdurchgängen gezeigt.

Das Kompostisolat *P. curvatum* AW02 produzierte unter den gewählten Bedingungen extrazelluläre Lipase. Durch eine Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass mindestens eine zellwandgebundene Lipase sekretiert wird. Diese ist säurestabil und -aktiv.

Weitere Mikroorganismen, darunter Pilze, die als nicht-pathogen akzeptiert und gentechnisch voll entwickelt sind, konnten erfolgreich in dem selektiven Kultivierungssystem unter minimalen Sterilbedingungen kultiviert werden.

Nach Betrachtung der Kostenfaktoren kann geschlussfolgert werden, dass das Verfahren mit dem Wildtyp von *P. curvatum* AW02 zur Lipaseproduktion ein nicht konkurrenzfähiges System darstellt. In dem System liegt aber das Potential zur kosteneffizienten Produktion von Biokatalysatoren und niedermolekularen Stoffwechselprodukten. Dies bedarf weiterer fortführender Arbeiten, wie zum Beispiel der Entwicklung eines rekombinanten Produktionsstammes, welcher unter den gewählten Bedingungen wächst.

Der Einsatz eines anerkannten GRAS Mikroorganismus, der mit einem entsprechenden Expressionssystem das identifizierte Lipasegen von *P. curvatum* AW02 trägt, wäre ein interessanter Ansatzpunkt für weiteren Untersuchungen. Dabei könnte eine nachfolgende intensive Charakterisierung des Enzyms gegenüber verschiedenen Substraten sehr interessant für die pharmakologische und medizinische Anwendung sein.

Nur wenig ist über die Wechselwirkung von Proteinen mit pilzlicher Zellwand bekannt. Ein weiterer wissenschaftlicher Ausblick wäre daher die Untersuchung der Bindung der Lipase an die Zellwand von *P. curvatum* AW02. Da verschiedene Chemikalien und auch der enzymatische Abbau der Zellwand die Lipase nicht freisetzen konnten, wären eine strukturelle Analyse des Enzyms sowie ein definierter enzymatischer Abbau des zellwandgebundenen Enzyms mit anschließender Massenspektroskopie aufschlussreich. Interessant wäre die Isolierung eines Fragments, das eine kovalente Bindung zwischen einem Glucan der Zellwand und einer Aminosäure der Lipase aufweist.

## **4. Wasserfreie Immobilisierung von Enzymen auf chemisch variablen Oberflächen ohne Funktionalisierung des Trägers oder der Enzyme**

### **4.1 Immobilisierungsmethoden im Überblick**

Enzyme haben neben den oben ausgeführten Vorteilen auch Nachteile in ihrer Anwendung. Sie verfügen über eine geringe Stabilität bei thermischer, mechanischer oder chemischer Belastung. Eine Langzeitprozessführung sowie die Wiederverwendung des Enzyms sind nicht möglich. Auch ein verbessertes Reaktordesign, wie zum Beispiel Festbett- oder Membranreaktoren, können eine Stabilisierung von Enzymen gegenüber mechanischen Kräften nicht vollständig umsetzen (Ansorge-Schuhmacher und Thum, 2011). Um dies zu kompensieren, ist Immobilisierung eine Methode der Wahl. Folgende Vorteile sprechen für eine Fixierung von Enzymen: I) verbesserte Stabilität, II) einfache Trennung des Enzyms vom Produkt, III) Wiederverwendung des kostenintensiven Enzyms sowie IV) eine verbesserte Prozesskontrolle (Sheldon, 2007; Cao, 2005). Die Immobilisierung von Enzymen schlägt sich zuerst auf die Herstellungskosten des Präparates nieder und kann so eine Barriere für die Anwendung von immobilisierten Enzymen im industriellen Maßstab werden. Sieht man aber die kontinuierliche oder über mehrere Zyklen laufende Anwendung, senkt dies die Enzymkosten/kg Produkt. Ein Beispiel dafür ist die kontinuierliche Anwendung immobilisierter *Candida antarctica* Lipase, welche für die Herstellung von Biodiesel aus Pflanzenöl im Labormaßstab eingesetzt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym über 70 Zyklen (Dauer: 105 Tage) im Satzverfahren der Biodieselherstellung ohne signifikanten Aktivitätsverlust stabil war (Watanabe *et al.*, 2000). Des Weiteren entfällt die Schwierigkeit ein gelöstes Enzym vom Produkt zu trennen, was die Aufreinigungskosten senken kann (Tischer und Kasche, 1999).

Eine Fülle von Methoden zur Immobilisierung von Proteinen wird genutzt. Diese können nach verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden, z.B. nach reversibler/irreversibler Fixierung, Anwesenheit/Abwesenheit von Trägermaterialien oder grundlegenden Bindungseigenschaften, wie ionischen, physikalischen oder kovalenten Wechselwirkungen. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die fünf am häufigsten genutzten Immobilisierungsmethoden in Industrie und im Labormaßstab mit einigen prominenten Beispielen (Hanefeld *et al.*, 2008; Sheldon, 2007; Brena und Batista-Viera, 2006; Fernandes,

2010). Häufig werden auch Kombinationen der einzelnen Methoden genutzt, um eine optimale Aktivität und Selektivität sowie eine gute Verteilung auf der Oberfläche oder im Medium zu erreichen, um nur einige Kriterien zu nennen.

Viele verschiedene Einflussfaktoren müssen in Betracht gezogen werden, wenn ein Enzym immobilisiert eingesetzt werden soll, so dass die Entwicklungsphase oft ein langwieriger, kosten- und arbeitsintensiver Prozess ist. Ein hohes Ziel ist eine Universalmethode, aber schon die Erstellung allgemeingültiger Richtlinien für eine optimale Immobilisierung ist eine Herausforderung (Cantone *et al.*, 2013; Cao, 2005).

Eine interessante Gruppe der Immobilisierungsverfahren ist die Verkapselung oder der Einschluss (Tabelle 4.1, Nummer 5). Dabei werden Enzyme entweder in ein strukturiertes Netzwerk aus Makromolekülen oder in eine Polymermembran eingeschlossen (Spahn und Minter, 2008). Verschiedenste Materialien können für diesen Einschluss genutzt werden. Meist werden ungesättigte Monomere mit ihren Co- Monomeren gemischt und eine chemische oder physikalische Vernetzung ausgelöst. Der Träger wird somit simultan zur Immobilisierung geschaffen. Dabei können Materialien natürlicher Quellen, wie Zellulose oder Alginat aber auch synthetische Stoffe, wie Polymerharze und anorganische Materialien genutzt werden. Ein positiver Aspekt ist die oft einfache Anpassung der geometrischen Struktur des Immobilisats an die Reaktoreigenschaften, die den Biokatalysator schonenden Immobilisierungsbedingungen und damit eine erhöhte Aktivitätsregeneration sowie die Schaffung einer Mikroumgebung, welche sich positiv auf die Aktivität des Enzyms auswirkt. Als negativ ist die Limitierung des Substrat- und Produkttransportes durch Diffusion zu sehen (Cao, 2005).

Polymerharze werden bei Einschlussverfahren für die Immobilisierung von Enzymen und Zellen genutzt. Bekannt sind dafür Epoxid- Harze (Klein und Kressdorf, 1982; Henrik, 1994), Polystyrole (Yan *et al.*, 2012), und Methacryl (Mateo *et al.*, 2000), um nur einige zu nennen. Wird ein Harz für die Immobilisierung gewählt, müssen die physikalischen (Porengröße, Quellverhalten oder mechanische Stabilität) und chemischen (positive und negative Ladungen, funktionelle Gruppen) Eigenschaften in Betracht gezogen werden (Cao, 2005). Meist werden Enzyme nach der Polymerisation auf und in dem Trägermaterial immobilisiert (Miltec *et al.*, 2011). Eine simultane Immobilisierung während der Synthese des Polymers wurde nur in einigen wenigen Fällen durchgeführt (Klein und Kressdorf, 1982; Henrik *et al.*, 1994).

**Tabelle 4.1: Übersicht gängiger Immobilisierungsmethoden.** Zusammenfassend wurden die fünf am häufigsten genutzten Immobilisierungsmethoden mit ausgewählten Beispielen dargestellt. Vor- und Nachteile der Methode sowie eventuelle Anwendungsgebiete wurden gelistet. Grundlage für die Tabelle sind die Arbeiten von Hanefeld *et al.* (2008), Sheldon (2007) sowie Brena und Batista-Viera (2006).

<b>Immobilisierungsmethode</b> <i>Art der Bindung</i>	<b>Hintergrund</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Referenz</b>
<b>1) Nicht-spezifische Adsorption und Ablagerung</b>	Basierend auf physikalischer Wechselwirkungen	Keine Vorbehandlung des Enzyms nötig  Wiederverwendung des Trägermaterials durch Ablösung des Enzyms durch Änderung der Umgebungsbedingungen möglich, z.B.: pH, Ionenstärke, Temperatur	Auswaschen des Enzyms, besonders in wässrigen Medien	Im Labormaßstab: - zur Aufreinigung von Kulturüberständen - zur schnellen und zuverlässigen Immobilisierung	Hanefeld <i>et al.</i> , 2008; Sheldon, 2007; Brena und Batista-Viera, 2006
<b>1a) van der Waals Wechselwirkungen/ Hydrophobizität</b>	Enzyme mit lipophilen Aminosäuren an der Oberfläche adsorbieren an hydrophobe Materialien	Für Reaktionen in organischen Lösungsmitteln anwendbar  Milde Immobilisierungsbedingungen erhalten die katalytische Aktivität des Enzyms	Meist mit einer zweiten Immobilisierungsmethode kombiniert, um Enzym Diffusion zu vermeiden, z.B. Vernetzen durch Glutaraldehyd	Aufreinigung von Lipase aus Kulturüberständen Reaktionen in organischen Lösungsmitteln	Sharma <i>et al.</i> , 2001; Heinsman <i>et al.</i> , 2003

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 42

<i>1b) Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen</i>	Hydrophile Aminosäurereste und Glykosylierungen bedingen die Adsorption durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen  Geeignete Oberflächen sind Cellulose sowie poröses Glas	Verwendbar im wässrigem Milieu ohne Enzymverlust durch Diffusion	Immobilisierung auf Celit (Kieselerde): Enzym immobilisiert auf den inneren Poren, welche auch Wasser aufnehmen, speziell für Lipase-Reaktionen in organischen Lösungsmitteln	Inagaki <i>et al.</i> , 1992; Basso <i>et al.</i> , 2000
<i>1c) Ionische Interaktion</i>	Unterschiedliche Elektronegativitäten der Moleküle werden für die Wechselwirkung zwischen Träger und Protein genutzt	Gewünschte Enzymeigenschaften können durch Einstellung des Puffersystems hervorgerufen werden	Starke Bindung zwischen Träger und Protein sowie volle Aktivität des Enzyms können meist nicht gewährleistet werden  Falls Substrat und/oder Produkt auch geladen sind, interagieren sie mit dem Träger, daher kann es zu Diffusions- oder Abscheideeffekten kommen  Enzymeigenschaften können ungewollt verändert werden, z.B. pH Optimum, pH Stabilität  Immobilisierung ist abhängig von Salzkonzentration und pH Wert	Pessela <i>et al.</i> , 2003

## 2) spezifische Adsorption

	Wiederverwendung des Trägermaterials nach Ablösung des Enzyms		
2a) <i>Affinitätsbindung</i>	Hohe Selektivität	Kostenintensive kovalente Bindung des Affinitätsliganden zur Matrix Änderung in der Proteinstruktur durch C- oder N-terminale Fusion des komplementären Liganden an die Proteinsequenz	Strep-tag/Streptavidin/ Biotin System: Aufreinigung, Isolierung und Immobilisierung von einzelnen Proteinen oder Proteinkomplexen  Terpe, 2003
2b) <i>Chelatbildung oder Metallbindung</i>	Einfache Ablösung der gebundenen Proteine durch Zugabe von löslichen Liganden oder pH Absenkung Erhalt von 30-70 % der Enzymaktivität	Probleme bei der Reproduzierbarkeit C- oder N-terminale Fusion eines His-tag ist nötig	Aufreinigung und Immobilisation von Zellextrakten in einem Schritt  Ho <i>et al.</i> , 2004
	Affinität zwischen zwei komplementären Biomolekülen wird ausgenutzt		
	Träger (z.B. Silicate, Cellulose) werden mit Metall-Ionen überzogen ( $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ ), welche dann die Proteine über die Komplexierung zweier Histidin binden		

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 44

3) Kovalente Bindung auf feste Oberflächen	Funktionelle Gruppen, z.B. an Aminogruppen oder Zuckerreste auf der Oberfläche von Enzymen können zur kovalenten Vernetzung von Enzym und Träger genutzt werden	Enzym ist eng gebunden, dadurch eingeschränkte konformelle Flexibilität und thermische Reaktion: Proteinfaltung und Denaturierung ist eingeschränkt /höhere Stabilität	Eingeschränkte konformelle Flexibilität: Senkung der Aktivität, Änderung in Selektivität und Spezifität, chemisch verändertes Enzym	Gerichtete kovalente Immobilisierung: die Sequenz eines Lipase-Proteins wurde so geändert, dass nur eine potentielle Aminogruppe zur punktuellen Immobilisierung mittels Glutaraldehyd auf einem Träger vorhanden war	Svendsen <i>et al.</i> , 2007
Das Enzym kann über lange oder kurze Moleküle mit dem Träger verbunden sein, meist wird Glutaraldehyd als Vernetzungs-Molekül genutzt	Nutzung in wässrigem Milieu ohne Enzymdiffusion	Alle Moleküle in der Enzympräparation müssen berücksichtigt werden, da sie während der Immobilisierung reagieren können, z.B. Zucker in der Lösung als Stabilisator verwendet			
Zusätzlich kann der Träger, z.B. Agarose, Methacryl, Silicat, verschiedene Eigenschaften aufweisen, z.B. hydrophil, hydrophob		Enzym ist irreversibel gebunden			
Gerichtete Immobilisierung ist möglich	Ausbildung kovalenter Bindungen unter milden Bedingungen			Immobilisierung von $\alpha$ -Amylase auf Agarose mit Disulfid-Gruppen zur Hydrolyse von Stärke	Carlsson <i>et al.</i> , 1975 Bastida-Viera <i>et al.</i> , 2006
Eine Disulfid-Bindung zwischen Träger (mit reaktiven Disulfiden oder Disulfidoxiden) und Enzym (mit freien Thiol- Gruppen) wird gebildet					
Diese ist reversibel durch reduzierende Reagenzien, z.B. Dithiothreitol					

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 45

4) "Cross Linking"	<p>Vernetzen durch einen bifunktionellen Stoff wie z.B. Glutaraldehyd</p> <p>Enzym-Präzipitate oder -Kristalle werden gebildet und nachfolgend miteinander vernetzt</p>	<p>Kein Träger erforderlich</p> <p>Änderung von Selektivität und Spezifität möglich</p>	<p>Enge Bindung, wodurch Flexibilität eingeschränkt wird</p> <p>Eingeschränkte Diffusion zu innen liegenden Enzymmolekülen</p>	<p>Herstellung von Combi-CLEAs aus Hydroxynitrilase, Nitrilase und Amidase zur Umsetzung von Benzaldehyd zu L-Mandelsäure</p>	Sheldon 2011
<b>5) Verkapselung/ Einschluss</b>					
5a) Sol-Gel Methode	<p>Enzyme werden in ein strukturiertes Netzwerk aus Makromolekülen oder in eine Polymermembran eingeschlossen</p> <p>Hochporöses Silica Material</p> <p>Abhängig von der genutzten Silicat-Grundkomponente können Sol-Gele mit verschiedenen Eigenschaften hergestellt werden</p> <p>Xerogele and Aquegele sind auch möglich</p>	<p>Thermisch und mechanisch sehr stabil</p> <p>Schützen das Enzym in den Poren</p>	<p>Eingeschränkte Substratdiffusion zum Enzym</p> <p>Herstellung führt bei sensiblen Proteinen zur Denaturierung</p> <p>Geringe Enzym-Beladung</p>	<p>Herstellung von Biosensoren</p>	Pierre 2004
5b) Poröse Silicate (MPS)	<p>Hergestellt aus Silan-Vorstufen mit Detergenzien als Templates</p> <p>Porendurchmesser 2 - 25 nm</p>	<p>Porengröße kann durch entsprechendes Detergenz variiert werden</p> <p>Zusätzliche funktionelle Gruppen können durch spezielle Silan-Vorstufen eingeführt werden</p> <p>Schützender Charakter des porösen Umfeldes</p>	<p>Eingeschränkte Substratdiffusion zum Enzym</p>	<p>Immobilisierung von Cytochrom c und Xylanase auf porösen Silicaten im Labormaßstab</p>	Hudson <i>et al.</i> , 2005

Epoxid-Harze sind engmaschig vernetzt und weisen eine gute thermische und mechanische Beständigkeit auf. Sie eignen sich sehr gut zur Beschichtung verschiedener Materialien mit beliebiger Form. Charakteristische Unterschiede zwischen verschiedenen Epoxid-Harzen hängen von den verwendeten Epoxid-Harz Vorstufen, der chemischen Komponente, welche zur Vernetzung genutzt wird sowie bestimmten Füllstoffen ab. „Normalharze“ werden meist aus Bisphenol A und Epichlorhydrin hergestellt. Bei der sogenannten Kalthärtung (Vernetzung) bei Raumtemperatur und Normaldruck reagiert die endständige Epoxid-Gruppe mit Verbindungen, welche reaktionsfähige Wasserstoffatome im Molekül enthalten, zum Beispiel mehrwertige aliphatische oder aromatische Amine (Gnauck und Fründt, 1991).

Polyester-Harze gehören ebenfalls wie Epoxid-Harze zur Kunststoffgruppe der Duroplaste. Lineare, ungesättigte Polyester werden mit organischen Peroxiden als Härter (z.B. Benzoylperoxid) versetzt, welche die Polymerisation starten. Werden Beschleuniger (z.B. Dimethylanilin) dazu gegeben, kann diese Reaktion auch bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Als Brücken zwischen den Polyesterketten dienen zwei bis drei Styrolmoleküle, welche die Netzwerkstruktur ausbilden (Gnauck und Fründt, 1991).

Aus der Fülle an Immobilisierungsmethoden ergab sich das Ziel, ein kostengünstiges, in der Handlungsweise generalisiertes und auf unterschiedlichste Enzyme anwendbares Immobilisierungsverfahren zu entwickeln. Von besonderem Interesse war die Aktivität pro Fläche im Vergleich zu bekannten Immobilisierungsmethoden.

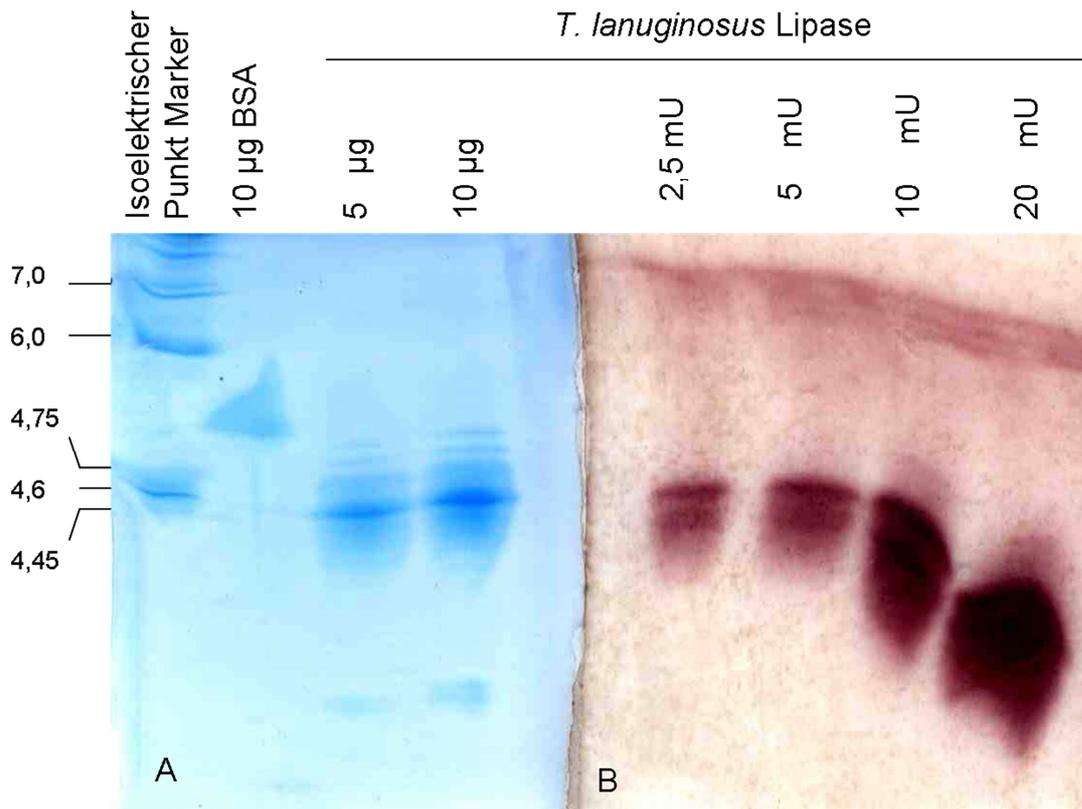
Als Modellenzym sollte die bekannte und gut untersuchte *Thermomyces lanuginosus* Lipase genutzt werden. Diese Lipase ist als einfach und robust bekannt, was durch zusätzliche biochemische Untersuchungen bestätigt werden sollte. Ein in seinen biochemischen Eigenschaften weitaus komplexeres Enzym, die Threonin Aldolase von *Ashbya gossypii*, sollte eine breitere Anwendbarkeit des neu entwickelten Immobilisierungssystems bestätigen.

## 4.2 Charakterisierung der rekombinanten *Thermomyces lanuginosus* Lipase

Die rekombinante *T. lanuginosus* Lipase (TLL) wurde als Lipasepräparat „Typ NOVAREKO“ von der Nova Biotech Dr. Fechter GmbH (Berlin, Deutschland) bezogen. Laut Herstellerangaben wurde diese Lipase rekombinant in *A. oryzae* produziert. Das Präparat lag in wässriger Lösung, stabilisiert durch 8 % Propylenglykol und circa 13,5 % Polyethylenglykol, vor. Die TLL gehört zu den Enzymen, die sowohl kinetisch als auch biochemisch am besten untersucht wurden (Fernandez-Lafuente, 2010). Da der Expressionsorganismus (*A. oryzae*) in vielen Fällen eine Auswirkung auf die posttranslationale Modifikation des Enzyms hat, war eine Charakterisierung des Produktes für die weitere Nutzung der *T. lanuginosus* Lipase wichtig.

Die molekulare Masse wurde mittels denaturierender SDS Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS PAGE) ermittelt und ergab 34 kDa, was vergleichbar mit Literaturwerten ist (Omar *et al.*, 1987). Die Reinheit der Enzymlösung wurde mit ca. 90 % für die Haupt-Proteinbande abgeschätzt (Ergebnisse nicht dargestellt).

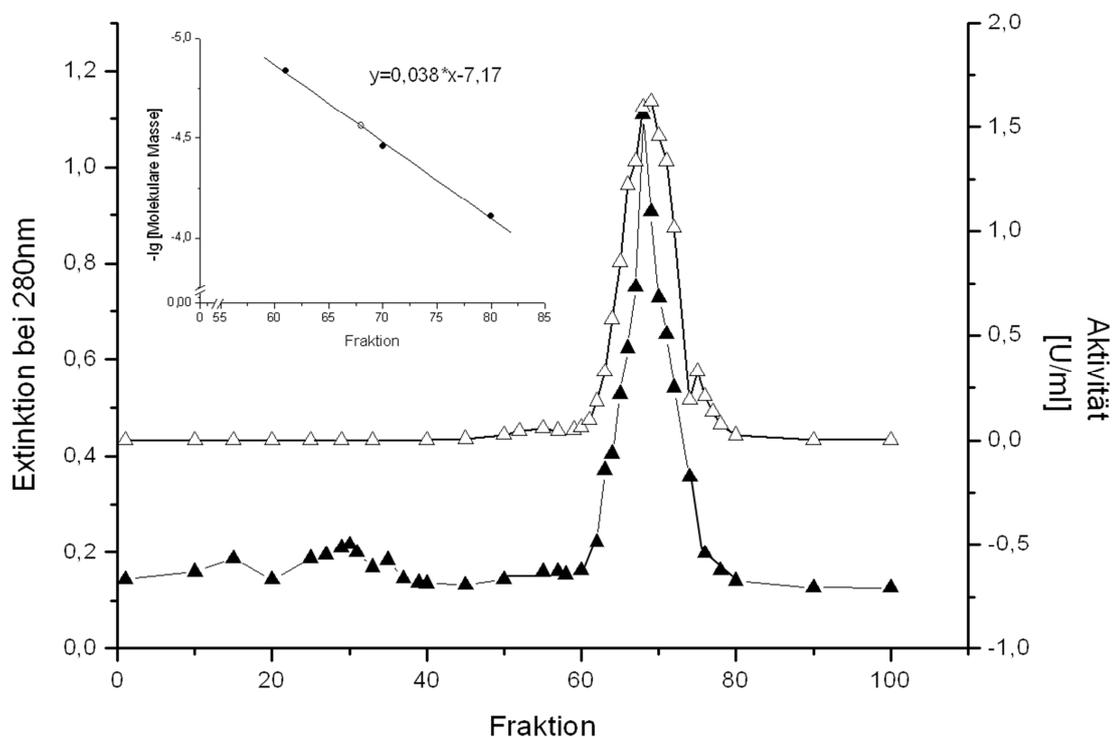
Native isoelektrische Fokussierung (IEF) mit nachfolgender Färbung mit Coomassie Brilliant Blau ergab multiple Banden zwischen pI 4,2 und pI 4,8, wobei zwei Hauptbanden bei pI 4,2 und 4,4 sichtbar wurden (Abbildung 4.1A). Parallele IEF mit nachfolgender Esterase Aktivitätsfärbung bestätigte die beiden Hauptbanden als esterolytische Enzyme (Abbildung 4.1B).



**Abbildung 4.1: Bestimmung des pI des rekombinanten *Thermomyces lanuginosus* Lipasepräparates sowie Aktivitätsfärbung.** Isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde unter Verwendung von Ampholyten im Bereich pH 3- 5 durchgeführt. **A:** Das Coomassie Brilliant Blau angefärbte Gel zeigt für die *T. lanuginosus* Lipase (TLL) multiple Banden zwischen pI 4,2 und 4,8. **B:** Im Parallelgel wurde eine Aktivitätsfärbung genutzt, wobei zwei Hauptbanden bei pI 4,2 and 4,4 abgeschätzt wurden, welche  $\alpha$ -Naphthol-Acetat hydrolysieren. Standards (pI): Rinderserum Albumin (BSA) (5,0), Humanes Hämoglobin C (7,5), Humanes Hämoglobin A (7,1), Myoglobin vom Pferd (6,8; 7,0), Carbonic Anhydrase vom Rind (6,0),  $\beta$ -Lactoglobulin B (5,1), Phycocyanin (4,45; 4,65; 4,75). Die aufgetragene Proteinmenge wurde mittels Bradford Assay bestimmt. Die aufgebrauchte Lipaseaktivität wurde mittels *p*-Nitrophenyl-Palmitat Assay bestimmt. Ein mU entspricht 0,2 µg Protein.

Eine Aufreinigung der TLL mittels „Fast Protein Liquid Chromatography“ (FPLC) mit dem Anionenaustauscher Q Sepharose wurde durchgeführt (Ergebnisse nicht als Abbildung dargestellt). Die Elution wurde mittels UV Spektroskopie bei 280 nm verfolgt. Zwei Hauptelutionsspitzen, welche mittels *p*- Nitrophenyl-Palmitat-Assay nachgewiesene esterolytische Aktivität enthielten, wurden detektiert. Somit stimmen die Ergebnisse aus der Aktivitätsfärbung nach IEF mit der Auftrennung durch FPLC überein. Es existieren zwei Enzyme, die sich in ihrer Nettoladung unterscheiden. Die aufgereinigten Enzymfraktionen zeigten eine Reinheit von 95 % in der SDS PAGE (Ergebnisse nicht als Abbildung dargestellt).

Die Quartärstruktur der aufgereinigten TLL wurde mittels Größenausschluss-Chromatographie mit einer Sepharose G-100 Säule analysiert (Abbildung 4.2). Die Elution wurde vergleichend mit Standards durchgeführt, um die molekulare Masse der Proteinfractionen abzuschätzen. Klar erkennbar ist ein monomeres Enzym mit einer molekularen Masse von 36 kDa unter den gewählten Bedingungen. Frühere Experimente ergaben verschiedene Ergebnisse zur Quartärstruktur der TLL. Omar *et al.* (1987) gehen mit den vorliegenden Ergebnissen eines monomeren Enzyms einher, wobei Palamo *et al.* (2002) eine Dimerisierung der TLL zeigten. Anzumerken ist, dass letztere Autoren andere experimentelle Grundlagen wählten.



**Abbildung 4.2: Ermittlung der aktiven Quartärstruktur der *Thermomyces lanuginosus* Lipase durch Größenausschlusschromatographie.** Die Fraktionen des Größenausschlusses der *T. lanuginosus* Lipase (TLL) Präparates wurden mittels UV Spektroskopie (E: Extinktion) bei 280 nm (▲) analysiert. Die Hauptfraktion der Lipaseaktivität (Δ) stimmt mit der Hauptfraktion der Proteinmenge überein. Einschub: Kalibriergerade der Säule mit Standard Molekülen (●) in einer separaten Durchführung lässt eine Berechnung der molekularen Masse der TLL (○) von 36 kDa zu. Standards: Rinderserum Albumin (69 kDa), Carboanhydrase (28,8 kDa), und Cytochrom c (12,4 kDa).

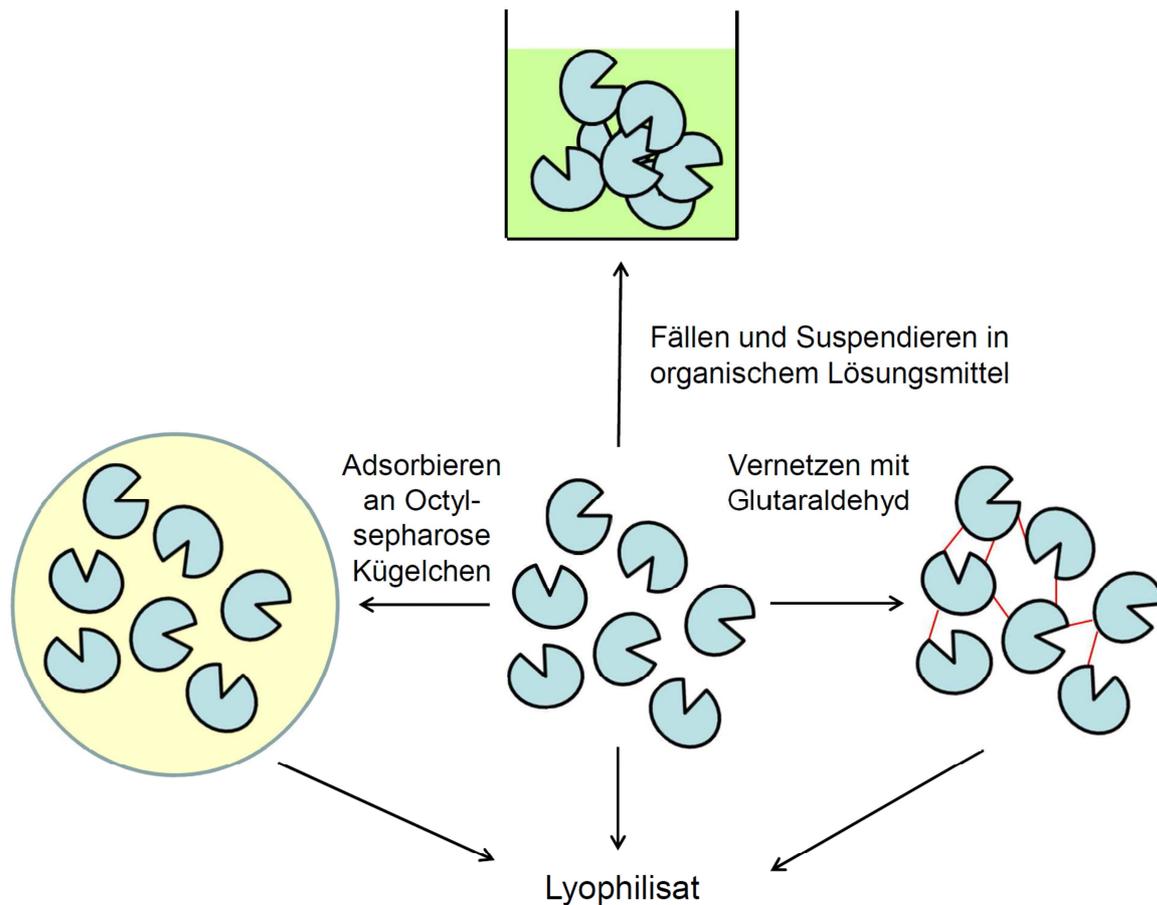
Es konnte gezeigt werden, dass die rekombinante TLL mit einer molekularen Masse von 34 kDa aus zwei nativen Enzymen mit unterschiedlicher Nettoladung besteht. Posttranslationale Modifikationen durch den Wirtsorganismus könnten zu den Unterschieden in der Ladung der beiden Enzymvarianten geführt haben. Um dies zu klären, wäre ein enzymatischer Verdau der Glykosyl-Reste möglich. Die beiden Varianten der TLL sollten danach die gleiche Nettoladung aufweisen (Barig *et al.*, 2014).

### **4.3 Wasserfreies Einschlussverfahren zur Immobilisierung von Enzymen**

Aus den Erfahrungen, die mit den gut untersuchten und schon in industrieller Anwendung befindlichen Immobilisierungsmethoden gemacht wurden, entstand die Idee für ein neues, einfaches und robustes Immobilisierungsverfahren, welches auf der Grundlage eines wasserfreien Einschlusses in ein Polymerharz erfolgt.

Dafür wurden zwei gängige Polymerharze, Epoxid- und Polyester-Harz, mit verschiedenen lyophilisierten Enzympräparationen gemischt und auf eine Oberfläche aufgetragen oder das streufähige Material auf einer Schicht Polymerharz verteilt.

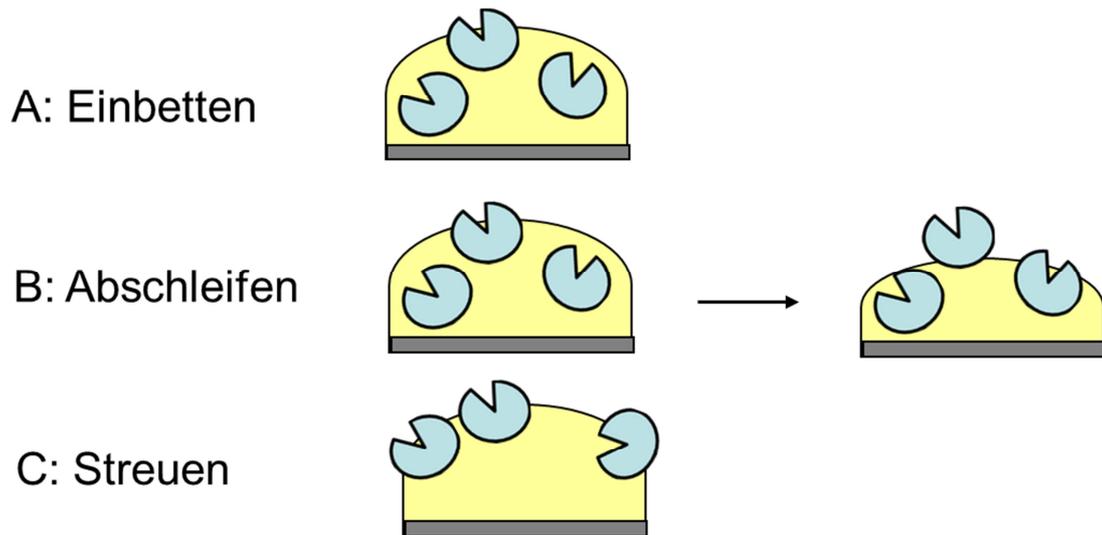
Abbildung 4.3 zeigt, dass die Bereitstellung von vier Enzympräparationen durchgeführt wurde. Drei dieser Enzympräparationen wurden vor der Weiterverarbeitung lyophilisiert. Dazu gehören das Präparat mit den freien Enzymen sowie die vor-immobilisierten, welche entweder adsorbiert an Octylsepharose oder als „Cross Linked Enzyme Aggregates“ (CLEAs) vorlagen. Eine weitere Möglichkeit war die Suspension des Enzyms in einem organischen Lösungsmittel, wie zum Beispiel Aceton.



**Abbildung 4.3: Wasserfreie Enzympräparationen zur Mischung mit einem Polymerharz.** Vier verschiedene Möglichkeiten zur Herstellung eines in der wasserfreien Immobilisierung einsetzbaren Enzympräparates wurden angewendet. Drei Methoden führten zu streufähigen, trockenen Materialien, welche nach der Lyophilisierung mit dem Polymerharz gemischt wurden. Entweder wurde freies Enzym lyophilisiert oder vor-immobilisierte Präparate durch Adsorption an Octylsepharose oder durch Vernetzen von Enzympräzipitaten durch Glutaraldehyd hergestellt. Die vierte Methode führte zu suspendierten Enzympräzipitaten in organischen Lösungsmitteln, z.B. Aceton, welche mit dem Polymerharz mischbar sind.

Die Enzympräparationen wurden mit den Monomeren der Harze gemischt und in unterschiedlichen Beschichtungsarten auf Oberflächen aufgebracht. Die Polymerisierung erfolgte simultan zur Immobilisierung.

Abbildung 4.4 gibt einen Überblick über drei von vier möglichen Aufbringungsarten des Enzym-Harzgemisches auf einen festen, trockenen Träger: Beschichtung durch „Einbetten“ ohne oder mit mechanischer Nachbehandlung sowie „Streuen“ auf eine Epoxid-Schicht. Die vierte Aufbringungsart beinhaltet die Fällung und Suspension der Enzyme in einem organischen Lösungsmittel wie in Abbildung 4.3 dargestellt. Nachfolgend wird diese Mischung mit dem Polymerharz vermengt und im Verfahren „Sprühen“ auf die Oberfläche aufgebracht. Dabei entsteht eine sehr dünne Schicht, welche die Oberfläche benetzt.



**Abbildung 4.4: Mögliche Beschichtungsarten der wasserfreien Immobilisierung.** Lyophilisierte, freie Enzyme sowie in einem ersten Immobilisierungsschritt fixierte Enzyme können mit drei unterschiedlichen Verfahren auf einer Oberfläche aufgebracht werden. **A:** „Einbetten“: eine Mischung aus Enzym-Harz wird auf eine Oberfläche gestrichen. **B:** „Abschleifen“: das gewonnene Präparat aus A wird nach der Polymerisierung mechanisch weiter behandelt. **C:** „Streuen“: auf eine Polymerharzschicht wird eine zweite Schicht Enzym gestreut.

#### 4.3.1 *Thermomyces lanuginosus* Lipase im wasserfreien Einschlussverfahren

##### Methoden

Zwei verschiedene Materialien, 1x1cm große Stahlplättchen und Polyestergewebe, wurden als Beschichtungsträger zur Immobilisierung der TLL im wasserfreien Einschlussverfahren genutzt. Als Einschlussmaterial wurde entweder Epoxid-Harz oder Polyester-Harz genutzt. Jede der vier beschriebenen Enzympräparationen (Abbildung 4.3) wurde dabei mit der entsprechenden Beschichtungsart auf die Trägermaterialien aufgebracht. Nach der Polymerisation wurden die Lipaseaktivitäten gegenüber *p*-Nitrophenyl-Palmitat (pNPPalm) bestimmt. In einigen Fällen wurde die Aktivität zusätzlich gegenüber dem artifiziellen kurzkettigen Substrat *p*-Nitrophenyl-Propionat (pNPPProp) und dem natürlichen Substrat Rapsöl bestimmt. Um einen Vergleich mit einem konventionellen Immobilisierungsverfahren, z.B. kovalente Immobilisierung auf amino-funktionalisierten Oberflächen, zu ziehen, wurden die Aktivitäten in U/cm<sup>2</sup> beschichteter Oberfläche angegeben. Wenn ein Bezug zur Menge an immobilisiertem Protein möglich war, wurde dies in den entsprechenden Tabellen dargestellt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der verschiedenen Beschichtungsarten mit den entsprechenden Enzympräparationen der TLL aufgezeigt.

## „Einbetten“ und „Abschleifen“

Als Modell wurden 1 x 1 cm große Stahlplättchen genutzt, welche als Träger für das Enzym/ Polymerharzgemisch dienten. Die robuste Lipase von *T. lanuginosus* wurde im Verfahren „Einbetten“ und „Abschleifen“ auf die Oberfläche als lyophilisiertes freies oder als lyophilisiertes CLEA Präparat aufgebracht. Die aufgetragenen Proteinmengen pro Metallplättchen variierten zwischen 3 und 10 mg. Tabelle 4.2 stellt vergleichend die Lipaseaktivitäten gegenüber pNPPalm zwischen den in wässriger Lösung vorliegenden Enzympräparaten und den im wasserfreien Einschlussverfahren „Einbetten“ mittels Epoxid-Harz immobilisierten Präparationen dar. Als Bezugsgröße diene die Proteinmenge. Erkennbar ist, dass es durch die Immobilisierung bei beiden Enzympräparationen zu einem Aktivitätsverlust um circa 99 % kommt. Die rigide Struktur im Polymerbett sowie eine Limitierung der Substratdiffusion könnten Gründe für die Senkung der spezifischen Aktivität sein.

**Tabelle 4.2: Aktivitäten der freien oder „Cross Linked“ *Thermomyces lanuginosus* Lipase in wässriger Lösung sowie immobilisiert mittels wasserfreiem Einschlussverfahren.** Lipaseaktivitäten wurden gegenüber *p*-Nitrophenyl-Palmitat bestimmt. Vergleichend sind die freie *T. lanuginosus* Lipase (TLL) in wässriger Lösung und dessen wasserfreier Einschluss in Epoxid-Harz sowie die TLL CLEA Präparation und dessen wasserfreier Einschluss in Epoxid-Harz dargestellt.

Aktivität mU/mg			
Freie TLL		„Cross Linked“ TLL	
In wässriger Lösung	Wasserfreier Einschluss	In wässriger Lösung	Wasserfreier Einschluss
2.500	24	96	0,5

Zwei unterschiedliche Polymerharze auf Grundlage von Epoxid oder Polyester wurden für die wasserfreie Immobilisierung genutzt. Tabelle 4.3 stellt die Lipaseaktivitäten der immobilisierten TLL Präparate im Verfahren „Einbetten“ und „Abschleifen“ gegenüber verschiedenen Substraten dar. Werden Vergleiche zwischen dem Verfahren „Einbetten“ und „Abschleifen“ gezogen, zeigt sich, dass die Lipaseaktivität nach der mechanischen Behandlung in fünf von sechs Fällen ansteigt. Vergleicht man die beiden Enzympräparationen lyophilisierte freie und „Cross Linked“ TLL ist erkennbar, dass die Aktivität bei den freien Enzymen sehr viel höher liegt.

Wird zum Beispiel das Substrat pNPPalm betrachtet, liegt die Lipaseaktivität eine Größenordnung höher. Zu erklären ist dies durch multiple Faktoren, zum einen die rigide Struktur nach dem Vernetzen von TLL, wobei die TLL CLEAs eine Restaktivität von 10 % gegenüber pNPPalm zeigen (Tabelle 4.2 sowie Barig *et al.*, 2014, Cao *et al.*, 2000). Zum anderen spielt die Limitierung der Diffusion eine Rolle, innen liegende Enzymmoleküle des Proteinnetzwerkes sind nicht gut erreichbar für das Substrat. Der Vorteil eingebetteter CLEAs ist eine zusätzliche Stabilisierung der vernetzten Proteinpräzipitate sowie ein geringerer Verlust von Enzymen in das Reaktionsmedium durch mechanische Belastung. Das zusätzliche „Einbetten“ kann aber zu einem höheren Aktivitätsverlust führen, wie von Wilson *et al.* (2004) für die Penicillin G Acylase gezeigt wurde. Bei der Einbettung von TLL CLEAs zeigt sich, dass Polyester ein geeigneteres Polymerharz ist, da selbst bei dem Substrat Rapsöl Aktivität nachgewiesen werden konnte. Vergleicht man freie lyophilisierte Lipase in beiden Harzen, kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Zusätzlich wurde ein gängiges Immobilisierungsverfahren mit der TLL durchgeführt. Dabei diente eine amino-funktionalisierte Oberfläche als Träger zur Fixierung von TLL durch Glutaraldehyd. Die Aktivität gegenüber pNPPalm war um eine Größenordnung kleiner als die der neuen Immobilisierungsmethode auf Grundlage des wasserfreien Einschlusses. Ein Grund dafür könnte die erhöhte Proteinladung auf der Oberfläche durch das neue Verfahren sein.

**Tabelle 4.3: Flächenbezogene Aktivität nach Immobilisierung auf Stahlplättchen.** Gefriergetrocknete freie oder „Cross Linked“ *T. lanuginosus* Lipase (TLL) wurde durch das wasserfreie Einschlussverfahren entweder mit Epoxid- oder Polyester-Harz immobilisiert. Zwei verschiedene Methoden des Einschlusses: „Einbetten“ und „Abschleifen“ wurden angewandt. Zwei verschiedene Lipase-Assay Systeme wurden genutzt, ein spektrophotometrischer Assay mit *p*-Nitrophenyl-Propionate (pNPPProp) oder *p*-Nitrophenyl-Palmitat (pNPPalm) als Substrat und ein titrimetrisches Assaysystem mit Rapsöl als Substrat. Aktivitäten wurden von zwei unabhängigen Experimenten ermittelt und deren Mittelwerte dargestellt. Als Kontrolle diente eine Standard Immobilisierungsmethode, wobei TLL auf einer Amino-funktionalisierten Oberfläche immobilisiert wurde. Diese wurde mittels pNPPalm Assay analysiert und ergab eine Aktivität von \*4,2 mU/cm<sup>2</sup>.

Substrat	Nachbehandlung im Polymerharz	Freie <i>T. lanuginosus</i> Lipase [mU/cm <sup>2</sup> ]		“Cross Linked” <i>T. lanuginosus</i> Lipaseaggregate [mU/cm <sup>2</sup> ]	
		Epoxid- Harz	Polyester- Harz	Epoxid- Harz	Polyester- Harz
		pNPPalm*	“Einbetten”	250	560
	“Abschleifen”	1200	640	33	14
pNPPProp	“Einbetten”	31	46	< 0,1	7
	“Abschleifen”	44	66	6	2,4
Rapsöl	“Einbetten”	170	830	<1	10
	“Abschleifen”	260	60	<1	3

## „Streuen“

In einem ersten Immobilisierungsschritt wurde die TLL entweder adsorptiv an Octylsepharose Kügelchen gebunden oder durch die Herstellung von CLEAs immobilisiert. Diese Präparate wurden lyophilisiert und in einem zweiten Immobilisierungsschritt mittels der Methode „Streuen“ auf ein mit Epoxid-Harz beschichtetes Polyestergerewebe gegeben. Nach der Polymerisation konnten diese Gewebe auf Lipaseaktivität mittels pNPPalm Assay getestet werden. Dieses zweistufige kombinierte Verfahren, welches den wasserfreien Einschluss der TLL beinhaltet, zeigte vergleichend mit einer gängigen Immobilisierungsmethode Aktivitäten, die um eine Größenordnung höher liegen (Tabelle 4.4). Ein Grund für die höhere Aktivität pro Fläche könnte wiederum eine höhere Proteinladung sein.

**Tabelle 4.4: Spezifische und flächenbezogene Aktivität nach zweistufiger Immobilisierung von *T. lanuginosus* Lipase auf Polyestergerewebe.** Durch Adsorption an Octylsepharose gebundene oder “cross linked” *T. lanuginosus* Lipase (TLL) wurde in einem zweiten Immobilisierungsschritt mittels wasserfreiem Einschlussverfahren auf einem Polyestergerewebe fixiert. Dabei wurde Epoxid-Harz aufgetragen und die Enzympräparationen darüber gestreut. Die Aktivitäten pro Menge immobilisiertem Enzym oder pro Oberfläche wurden mittels *p*-Nitrophenyl-Palmitat Assay bestimmt. Als Vergleich wurde freie TLL (spezifische Aktivität: 5 U/mg Protein) mittels Adsorption auf dem Polyestergerewebe immobilisiert. n.b.- nicht bestimmt

1. Stufe der Immobilisierung	2. Stufe der Immobilisierung	Aktivität	
		Nach 1. Stufe der Immob. [mU/mg Protein]	Nach 2. Stufe der Immob. [mU/mg Protein] [mU/cm <sup>2</sup> ]
Octylsepharose	Wasserfreier Einschluss	11	5,8
	„Streuen“		5,5
CLEAs	Wasserfreier Einschluss	110	34
	„Streuen“		6,8
-	Adsorption auf Polyestergerewebe	entfällt	n.b. 0,9

## „Sprühen“

Das vierte Enzympräparationsverfahren startet mit der Suspension des Enzyms in einem organischen Lösungsmittel, welches mischbar mit dem Polymerharz ist. Durch das „Sprühen“-Verfahren wird eine dünne Schicht aus Enzym/Polymer auf dem Trägermaterial aufgebracht. Es wurden 1 x 1 cm große Stahlplättchen für diese Versuche genutzt, wobei unterschiedliche Mengen an Enzym mit dem Epoxid-Harz gemischt wurden. Die Enzymaktivitäten wurden mittels pNPPalm Assay bestimmt (Tabelle 4.5).

Die Lipaseaktivitäten sind vergleichbar mit den flächenbezogenen Aktivitäten aus dem Verfahren „Einbetten“ und „Abschleifen“ aus Tabelle 4.3. Eine Steigerung der Enzymmenge bis 0,16 mg lässt die Lipaseaktivität entsprechend steigen. Oberhalb dieser Menge an TLL stagniert die Enzymaktivität. Vergleicht man nun die spezifische Enzymaktivität des Verfahrens „Einbetten“ mit freier, lyophilisierter TLL (24 mU/mg) mit der maximalen spezifischen Aktivität aus dem Verfahren „Sprühen“ (780 mU/mg), kann angenommen werden, dass ein höherer Anteil des eingesetzten Proteins im Verfahren „Sprühen“ aktiv ist. Da in beiden Verfahren die Oberflächenaktivität in der gleichen Größenordnung liegt, könnte eine Sättigung der Oberfläche mit TLL angenommen werden. Dies müsste durch eine Reihe von definierten Enzymmengen pro Stahlplättchen und der entsprechenden Aktivitätsbestimmung nachgewiesen werden. Eine Bestimmung der aktiven Lipasemoleküle pro Oberfläche wäre eine weitere Möglichkeit, um die maximale Beladung mit aktivem Enzym gegenüber der Gesamtproteinmenge zu ermitteln (Perrson *et al.*, 2002).

**Tabelle 4.5: Lipaseaktivitäten der mittels „Sprühen“ im wasserfreien Einschluss-Verfahren immobilisierten *Thermomyces lanuginosus* Lipase.** Verschiedene Mengen der *T. lanuginosus* Lipase (TLL), welche in Suspension mit Aceton vorliegen, wurden mit Epoxid-Harz vermischt und auf ein Stahlplättchen gesprüht. Aktivitäten gegenüber *p*-Nitrophenyl-Palmitat (pNPPalm) wurden auf die Oberfläche sowie Menge an Protein bezogen.

pNPPalm Aktivität		
Berechnete Menge an TLL auf Stahlplättchen (1 cm x 1 cm) [mg]	[mU/cm <sup>2</sup> ]	[mU/mg TLL]
0,04	21	500
0,16	120	780
0,22	100	470

### 4.3.2 *Ashbya gossypii* Threonin Aldolase im wasserfreien Einschlussverfahren

Threonin Aldolasen (TA) gehören zur Klasse der Lyasen und knüpfen bzw. spalten C-C Bindungen. Physiologisch katalysiert dieses Enzym die Spaltung von L-Threonin zu Glycin und Acetaldehyd sowie die stereospezifische Rückreaktion, dabei ist es abhängig von Pyridoxal-5-phosphat (Dückers *et al.*, 2010). Industriell sind TA besonders interessant für die Produktion von  $\beta$ - Hydroxy-  $\alpha$ - Aminosäuren (L- Threonin, L- Serin and 3-Hydroxyprolin), die Vorstufen für aktive pharmazeutische Substanzen sind (z.B. Anti-Krebsmedikamente, Antibiotika und Immunsuppressoren); (Steinreiber *et al.*, 2007).

In vorhergehenden Arbeiten wurde das *GLY1* Gen aus *A. gossypii*, welches für die Threonin Aldolase kodiert, in einen *E. coli* Expressionsvektor kloniert, das Bakterium mit dem Plasmid transformiert und die TA exprimiert. Die rekombinant hergestellte TA wurde biochemisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym eine molekulare Masse von 43 kDa aufweist und unter nativen Bedingungen als Homotetramer aktiv ist. Weiterhin ist die aktive TA vom Co-Faktor Pyridoxal-5-phosphat abhängig (Barig *et al.*, 2014).

Dieses im Vergleich zur TLL komplexere Enzym wurde im wasserfreien Einschluss-Verfahren „Einbetten“ und „Abschleifen“ mit Epoxid-Harz immobilisiert (Tabelle 4.6). Dabei wurde freie lyophilisierte TA mit dem Polymerharz gemischt und auf 1 cm<sup>2</sup> große Stahlplättchen aufgetragen. Nach Polymerisation wurde die Enzymaktivität mittels DL-threo- $\beta$ -Phenylserin, einem Substratanalogen, bestimmt. Eine Freisetzung von Benzaldehyd bei 280 nm konnte detektiert werden, was bestätigte, dass die Immobilisierung und Herstellung aktiver TA Reaktionseinheiten erfolgreich war (Barig *et al.*, 2014).

**Tabelle 4.6: Immobilisierung der *Ashbya gossypii* Threonin Aldolase im wasserfreien Einschluss-Verfahren.** Zwei Beschichtungsverfahren „Einbetten“ und „Abschleifen“ wurden im wasserfreien Einschlussverfahren mit Epoxid-Harz für die Threonine Aldolase (TA) angewandt. Enzymaktivität wurde mittels Freisetzung von Benzaldehyd bei 280 nm nach Spaltung des Substratanalogons DL-threo- $\beta$ -Phenylserin bestimmt. 1 U entspricht der Menge TA, die nötig ist, um 1  $\mu$ mol Benzaldehyd pro Minute freizusetzen.

	Aktivität [mU/cm <sup>2</sup> ]	
	Versuch a	Versuch b
„Einbetten“	83	98
„Abschleifen“	12	113

#### 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Ein neues Immobilisierungsverfahren auf Grundlage eines wasserfreien Enzym-Einschlusses konnte etabliert werden. Das Konzept, lyophilisierte oder in organischer Suspension befindliche Enzympräparate mit einem Polymerharz zu mischen, die Polymerisation auszulösen und verschiedene chemische Oberflächen zu beschichten, wurde mittels TLL bestätigt. Dabei wurden vier verschiedene wasserfreie Enzympräparationen mit Epoxid-Harz gemischt, polymerisiert und deren Enzymaktivität ermittelt. Diese Lipaseaktivitäten können mit Standardimmobilisierungsverfahren konkurrieren. Ein zweites Polymerharz auf Basis von Polyester ist für die Verfahren „Einbetten“ und „Abschleifen“ einsetzbar. Die Anwendung auf ein weiteres, in seiner Komplexität zweifach höheres Enzym, die TA (Homotetramer statt Monomer und Co- Faktor abhängig anstatt unabhängig), wurde erfolgreich durchgeführt. Somit konnte ein robustes System entwickelt werden, welches die Anforderung an das Enzym, Aktivität nach Lyophilisierung und/ oder Suspension im organischen Lösungsmittel zu haben, stellt. In dem System stellt das verwendete Polymerharz den Enzymträger dar, wobei eine Haftung an verschiedene Oberflächen vermittelt wird.

Eine Beschreibung der physikalischen und chemischen Eigenschaften des Enzym/Polymer-Komplexes sowie das Verhalten bei Langzeitprozessführungen stehen noch aus. Physikalische Eigenschaften beziehen sich zum Beispiel auf das Quellverhalten des Harzes in wässrigen Lösungen. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Epoxid-Harze Wasser absorbieren, was dem Enzym ein mikrohydrophiles Milieu zur besseren katalytischen Aktivität zur Verfügung stellen würde (Zhou und Lucas, 1999). Die Porengröße der Polymerharze sowie deren Einfluss auf Diffusion der Substrate sowie Aktivität der Enzyme, wäre ein weiterer Ansatzpunkt für Folgestudien (Miltéc *et al.*, 2011).

Bei der Untersuchung der chemischen Eigenschaften des Enzym/Polymerharz-Komplexes könnte die Art der Immobilisierung näher betrachtet werden. Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei der Immobilisierung um einen Einschluss oder ein sogenanntes Einbetten des Enzyms in das entstehende dreidimensionale Netzwerk aus Makromolekülen handelt. Es wäre aber auch möglich, dass bei der Additionsreaktion zwischen den Epoxid-Vorstufen und dem Härter Amino-, Thiol- oder Phenolgruppen der Aminosäuren mit den Epoxid-Gruppen reagieren. Im wässrigen Milieu ist diese Möglichkeit der Reaktion mit dem Biokatalysator eher unwahrscheinlich, aber da in der vorliegenden Arbeit in organischen Lösungsmittel und Enzympräzipitaten gearbeitet wurde, ist eine kovalente Bindung an die Trägermatrix nicht auszuschließen (Mateo *et al.*, 2006).

Um die Immobilisierungsmethode zu definieren, wäre eine schrittweise Auflösung der Epoxid-Matrix durch spezielle organische Lösungsmittel möglich (Mayor *et al.*, 1961). Die Freisetzung von Proteinen könnte mittels SDS-PAGE verfolgt werden.

Die Stabilität des immobilisierten Präparates in einem Zwei-Phasen (Öl/Wasser) Rührreaktoren für die TLL steht noch aus. Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die Nutzung anderer Polymerharze, welche spezielle funktionelle Eigenschaften (z.B. hydrophil, hydrophob) haben. Weitere Enzyme könnten in dem System getestet werden.

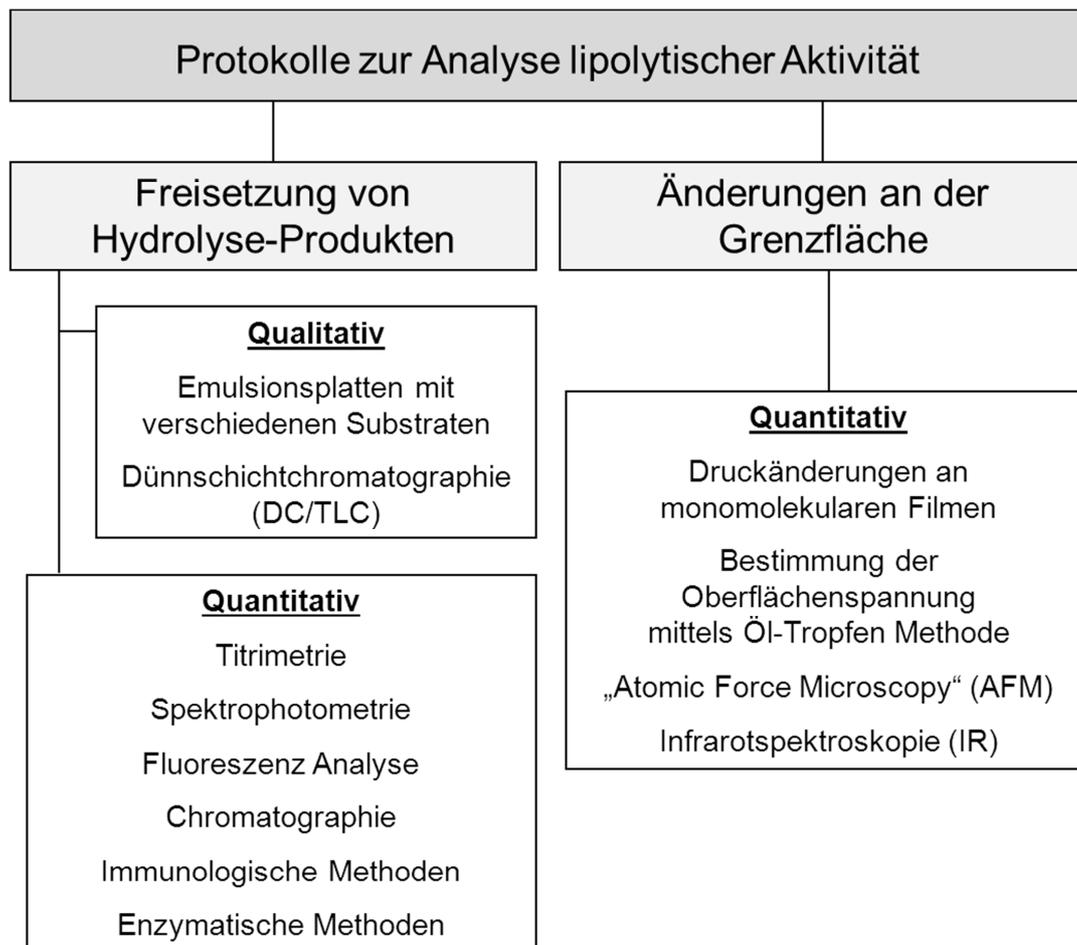
Mit der beschriebenen Methode zum wasserfreien Einschluss von Enzymen ergeben sich multiple Anwendungsmöglichkeiten. Die Beschichtung von Netzen oder Gittern, die in Reaktorsystemen eingehängt werden, könnten nach der katalytischen Umsetzung entfernt werden und würden dadurch die Kosten für eine Trennung von Enzym und Produkt minimieren.

Die relativ dicke Schicht nach „Einbetten“ und „Abschleifen“ könnte als Enzymreservoir dienen, die nach Inaktivierung der oberflächlichen Enzyme durch mechanische Behandlung aktive Enzyme freisetzt. So würde sich eine neue Immobilisierung erübrigen und die Aufarbeitung könnte vor Ort am Reaktorsystem durchgeführt werden.

## 5. Entwicklung eines quantitativen Mikrotiter-Lipase-Nachweissystems

### 5.1 Erschließung lipolytischer Enzyme und deren Aktivitätsbestimmung

Um neue Lipasen mit gewünschten Eigenschaften, wie Aktivität bei niedrigem bzw. hohem pH Wert oder einer breiten Temperaturtoleranz, zu isolieren, werden Quellen durchsucht, die den zukünftigen Reaktionsbedingungen ähneln, wie zum Beispiel Abfall mit hohem Anteil an Fetten, heiße Quellen oder alkalisch bzw. saure Gewässer. Daraus werden Mikroorganismen isoliert, welche vorzugsweise Enzyme synthetisieren, die die gesuchten Eigenschaften widerspiegeln (Sharma *et al.*, 2001). Ein zusätzlicher Selektionsdruck, wie z.B. Triglyzeride als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle oder niedrige bzw. hohe Hydroniumionen Konzentrationen bei der Kultivierung unter Laborbedingungen, könnte klassisch Mikroorganismen selektieren, welche besonders stabile und aktive Enzyme unter den gewählten Kriterien produzieren. Durch konventionelle Mutagenese, wie z.B. UV Bestrahlung oder chemische Substanzen könnte das Erbgut so verändert werden, dass Enzyme mit spezifischen Eigenschaften synthetisiert werden. Kombiniert mit einem Selektionsdruck ist diese Methode bei unbekanntem Genom erfolgreich. Seit den 1980er Jahren werden „Protein Engineering“ Methoden genutzt, um durch die Änderung der Struktur von Enzymen bestimmte Eigenschaften, wie Substratspezifität und Regioselektivität zu verbessern. Im Fokus steht besonders die katalytische Umsetzung von synthetischen Substraten, wie z.B. enantiomer-reine Produkte für die Pharmaindustrie. Neuere Methoden nutzen die sogenannte „Directed Evolution“. Durch den zufälligen Austausch von Aminosäuren in einem Enzym wird eine Vielzahl von Varianten des Biokatalysators generiert. Diese werden in folgenden Schritten in Hinblick auf ihre Stabilität, Substratspezifität und Regioselektivität getestet (Bornscheuer *et al.*, 2012). Im Fall der Lipase gibt es für das „Screening“ eine Fülle an Protokollen, die sich in ihrem Prinzip der Substratelektion, Sensitivität und Anwendbarkeit unterscheiden (Gupta *et al.*, 2003). Abbildung 5.1 gibt eine Übersicht über mögliche experimentelle Ansätze (Gupta *et al.*, 2003; Beisson *et al.*, 2000).



**Abbildung 5.1: Schematische Übersicht über Protokolle zur Analyse lipolytischer Aktivität.** Nach Art des Nachweis-Verfahrens wurden zwei Hauptgruppen unterschieden: I) Freisetzung von Hydrolyseprodukten und deren Detektion und II) Analyse der Änderungen an der Grenzfläche während und nach der Reaktion (Gupta *et al.*, 2003; Beisson *et al.*, 2000).

Oft werden bei der Detektion extrazellulärer lipolytischer Enzyme in einem ersten Schritt Mikroorganismen auf Petri-Platten-Nachweissystemen aufgebracht. Diese können emulgiertes Tributyrin (C4) enthalten (Fakhreddine *et al.*, 1998). Durch die Umsetzung des Substrates entstehen wasserlösliche Produkte, wie zum Beispiel Buttersäure, welche in die Umgebung diffundieren können. Durch den Abbau der Tributyrintröpfchen kommt es zu einer Klärung der Emulsion, die auf Lipaseaktivität hinweist. Da Tributyrin bis 0,8 mM wasserlöslich ist, kann es auch zur Detektion von Esterasen im Petri-Platten-Nachweissystem eingesetzt werden (Berg *et al.*, 1998). Eine weitere Möglichkeit Lipasen nachzuweisen ist deshalb der Einsatz von emulgiertem Triolein (C18) im Medium. Das Hydrolyseprodukt Ölsäure ist nicht wasserlöslich, so dass Fluoreszenzfarbstoffe, wie Rhodamin B, die freiwerdenden langkettigen Fettsäuren sichtbar machen können (Kouker *et al.*, 1987).

Der Zusatz von Farbstoffen, welche auf pH- Änderungen reagieren (Alford und Steinle, 1967), oder die Zugabe von chromogenen Substanzen auf der Basis von  $\alpha$ -Naphthol- oder *p*-Nitrophenolestern ist auch möglich (Yeoh *et al.*, 1986).

Kulturüberstände werden meist mittels chromogener Substanzen, wie *p*- Nitrophenyl-Palmitat (C16) oder *p*- Nitrophenyl-Propionat (C3), spektrophotometrisch getestet (Jäger *et al.*, 1999).

Die meistgenutzte Methode ist die Titrimetrie. Dabei werden in einem Emulsionssystem Triglyzeride mit Lipasen umgesetzt. Die freiwerdenden Fettsäuren senken den pH-Wert. Üblicherweise findet eine kontinuierliche über den Reaktionszeitraum laufende oder einmalige Gegentitration nach Abschluss der Reaktion, mit Hydroxidionen statt. Anhand der titrierten Hydroxidionen kann auf die äquimolare Menge an freien Fettsäuren, welche durch lipolytische Umsetzung entstanden sind, geschlossen werden. Vorteile der Titrimetrie sind I) ein Emulsionssystem, welches Lipaseaktivität an der Grenzfläche bestimmt, II) dass verschiedene Triglyzeride, variierend in ihrer Kettenlänge, in dem System eingesetzt werden können. Nachteile sind I) die Inhibierung der Lipase bei wasserunlöslichen Produkten, II) der pH Wert-abhängige Ionisierungsstatus der freien Fettsäuren, III) eine Zunahme des Volumens bei kontinuierlicher Titration sowie Veränderung des pH-Wertes über den Reaktionszeitraum bei einer Endpunkt-Titration (Gupta *et al.*, 2003). Mit diesem Lipase-Nachweissystem kann die Aktivität sowie die Substratspezifität gegenüber Triglyzeriden mit variablen Kettenlängen untersucht werden. Temperatureigenschaften und der Einfluss von positiven und negativen Effektoren können ermittelt werden. Allerdings ist jeder einzelne Durchgang sehr zeitaufwendig.

Für die Titrimetrie und die meisten quantitativen Lipase-Nachweisverfahren wird erfahrenes Personal und ein gut ausgestattetes Labor benötigt. „Screening“ Methoden in 96-well Mikrotiter-Platten für Lipasen sind bekannt, aber werden meist genutzt, um spezielle Eigenschaften, wie Enantio- und Stereoselektivität bei Muteinen oder Naturisolaten zu testen (Reetz, 2002).

Methoden, welche Phasengrenzen beinhalten und so „wahre“ Lipaseaktivität detektieren und quantifizieren sowie gleichzeitig hohe Probenaufkommen bewältigen können, sind bisher nicht bekannt. Eine Möglichkeit, eine Charakterisierung in Hinblick auf pH Optimum oder den Einfluss von positiven sowie negativen Effektoren, wie z.B. Gallensalze oder Ionen, durchzuführen, wäre vorteilhaft.

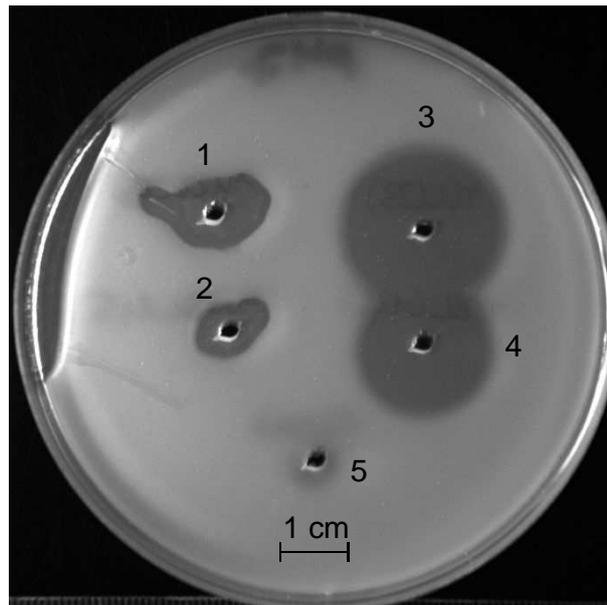
Aus diesem Anspruch heraus ergab sich das Ziel, aufbauend auf den bestehenden Petri-Platten-Nachweissystemen, die emulgiertes Tributyrin enthalten, eine weithin einsetzbare und einfach zu handhabende Methode zur quantitativen Lipaseaktivitätsbestimmung zu entwickeln. Bestehende Systeme sind meist semi-quantitativ einsetzbar, so dass wesentliche Veränderungen vorgenommen werden müssen. Eine Anpassung in den Mikrotiter-Maßstab sollte erfolgen. In den folgenden Untersuchungen sollte gezeigt werden, dass das neu entwickelte Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem auf Grundlage einer Tributyrinemulsion zur quantitativen Bestimmung von Lipaseaktivität einsetzbar ist. Weiterhin war es das Ziel, eine Charakterisierung der physikalischen Eigenschaften des Mikrotiter-Lipase-Nachweissystems durchzuführen. Neben der Etablierung des Nachweissystems auf das Modellenzym *Thermomyces lanuginosus* Lipase (TLL) sollte die Anwendbarkeit auf weitere Lipasen verschiedensten Ursprunges getestet werden.

## **5.2 Entwicklung und Charakterisierung eines quantitativen turbidimetrischen Mikrotiter-Lipase-Nachweissystems**

Ein gängiges und anerkanntes Lipase- und Esterasesubstrat stellt Tributyrin (C<sub>4</sub>) dar. Es ist bis 0,8 mM wasserlöslich und bildet bei höherer Konzentration eine Emulsion (Berg *et al.*, 1998). Bei der Kultivierung unbekannter oder gentechnisch veränderter Mikroorganismen, die auf extrazelluläre Lipasen getestet werden, wird Tributyrin in Petri-Platten-Nachweissystemen in einer Konzentration von 1% (v/v) standardmäßig zugegeben (Hess *et al.*, 2008). Des Weiteren werden damit Kulturüberstände nach Abtrennung der Zellen auf Lipaseaktivität getestet (Smeltzer *et al.*, 1992). Die einfache und schnelle Analyse im Petri-Platten-Nachweissystem mittels Klärhofbildung bei der Umsetzung von Tributyrin erlaubt eine qualitative Aussage über die enthaltene Lipaseaktivität. Es gibt mehrere Ansätze, bei denen eine quantitative Bestimmung der Lipaseaktivität in einem Emulsionssystem möglich ist (Smeltzer *et al.*, 1992; Jette und Ziomek, 1994).

Abbildung 5.2 stellt das Prinzip eines solchen klärhofbildenden Lipase-Nachweissystems im Petri-Platten-Maßstab bei pH 7 dar. Zwei verschiedene Enzympräparate, die *T. lanuginosus* Lipase (TLL) und die freigesetzten Lipasen von *P. curvatum* AW02, wurden in vorgestanzte Löcher appliziert. Die Proteine in allen vier Proben diffundieren durch das mit Agar stabilisierte Zwei-Schicht System, bestehend aus einer unteren Schicht ohne und einer oberen mit emulgiertem Tributyrin.

Vergleicht man die Klärhofbildung der TLL sowie der *P. curvatum* AW02 Lipasen untereinander, erkennt man, dass es bei der halben eingesetzten Aktivitätsmenge auch zu einem kleineren Klärhof nach 24 h Inkubation kommt. Werden aber gleiche Aktivitäten, die mittels *p*-Nitrophenyl-Palmitat Assay ermittelt wurden, von TLL und *P. curvatum* AW02 Lipasen miteinander verglichen, zeigen sich unterschiedliche Klärhofdurchmesser. Dies könnte auf eine unterschiedliche Substratspezifität gegenüber Tributyrin, aber auch gegenüber pNPPalm zurückzuführen sein.



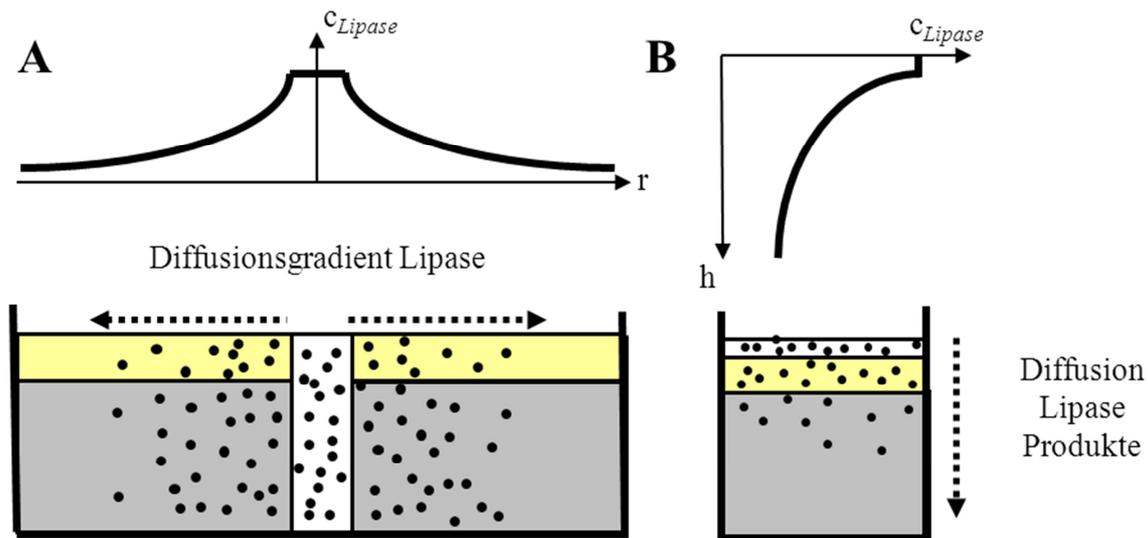
**Abbildung 5.2: Zwei Schicht Lipase-Nachweissystem im Petri-Platten-Maßstab.** Das Plattensystem besteht aus einer unteren Schicht mit einem 0,1 M Na-P-Puffersystem (pH 7) und 2 % (w/v) stabilisierendem Agar sowie aus einer oberen Schicht, welche zusätzlich 1 % (v/v) emulgiertes Tributyrin enthält. 20 µl der Probe wurden in vorgestanzte Löcher pipettiert und 24 h bei 30 °C inkubiert. Lipasepräparate zeigen in allen Fällen eine Klärhofbildung. 1 *Phialemonium curvatum* AW02 (23 mU), 2 *P. curvatum* AW02 (11,5 mU), 3 *Thermomyces lanuginosus* Lipase (23 mU), 4 *T. lanuginosus* Lipase (11,5 mU), 5 Puffer ohne Lipase.

Mit dem System, das in Abbildung 5.2 vorgeschlüsselt wurde, kann eine Aussage getroffen werden, ob Hydrolyse stattfindet. Die Hydrolyse bedingt eine totale Klärung. Abhängig vom Klärhofdurchmesser kann eine Aussage getroffen werden, wie viel Aktivität in den Proben enthalten ist. Zu beachten ist, dass der Klärhofdurchmesser nicht allein von der Lipaseaktivität bestimmt wird, sondern auch von der Proteinkonzentration, die sich radial verdünnt. Hohe Proteinkonzentrationen werden verhältnismäßig einen größeren Klärhof bedingen als niedrige Proteinkonzentrationen, da radial über eine längere Wegstrecke höhere Proteinkonzentrationen vorhanden sind, die eine Klärung bewirken. Weitere Faktoren, welche eine mögliche quantitative Aussage mit dem bestehenden Lipase-Nachweissystem im Petri-Platten-Maßstab beeinflussen können sind: I) die Diffusion der Lipase und der Hydrolyseprodukte sowie II) die Produktdesorption von der Oberfläche.

Aus diesem Grund wurden Änderungen des bestehenden Lipase-Nachweissystems im Petri-Platten-Maßstab mit emulgiertem Tributyrin als Substrat vorgenommen. Abbildung 5.3 stellt schematisch die wichtigsten veränderten Teilpunkte dar, welche die genannten kritischen Größen minimieren sollen. Abbildung 5.3A stellt schematisch das Prinzip bestehender Plattenemulsionssysteme dar. Meist enthalten sie aber im Gegensatz zum im Bild aufgezeigten System nur eine Schicht mit emulgiertem Tributyrin in einem geeigneten Puffer- oder Mediumsystem, das mit Agar stabilisiert ist (Hess *et al.*, 2008; Smeltzer *et al.*, 1992; Jette und Ziomek, 1994). Das Enzym wird in vorgefertigte Ausstanzungen gegeben, so dass eine Diffusion durch das Medium möglich ist. Durch die Hydrolyse kommt es zu einer radialen Klärung der Tributyrinemulsion. Der Klärhofdurchmesser kann in Relation zur Enzymaktivität gestellt werden. Höhere eingesetzte Enzymaktivitäten führen zu einem größeren Klärhofdurchmesser. Radial nimmt die Enzymkonzentration bei der Diffusion durch das Medium ab. Durch die Verdünnung des Enzyms und die Bestimmung des Durchmessers, welcher durch eine totale Klärung hervorgerufen wird, ist diese Methode eher qualitativ oder semi-quantitativ anzuwenden.

Durch die Einführung eines Zwei-Schicht-Systems, bei dem die obere Phase das emulgierte Substrat enthält und die untere ohne Substrat vorliegt, sollte ein Reservoir geschaffen und die Produktdiffusion erleichtert werden (Abbildung 5.3A und B). Durch die Minimierung des Volumens im Nachweissystem sowie die Aufbringung der Lipasemoleküle als dritte Schicht sollte eine eindimensionale Diffusion mit minimiertem Proteinkonzentrationsgradienten durch die Substratschicht ermöglicht werden (Abbildung 5.3B). Die Auswertung mittels Spektrophotometer bei 595 nm im 96-well Platten-Maßstab eröffnet zusätzlich die Möglichkeit, die Klärung über die Zeit zu analysieren. Somit wird nicht die totale Klärung aufgenommen, vielmehr wird die Analyse der partiellen Klärung im Verlauf der Hydrolyse möglich.

Ein weiterer Punkt ist, dass im Gegensatz zu gängigen colorimetrischen Verfahren zur Lipaseaktivitätsbestimmung keine Detergenzien zugesetzt werden müssen. Es wurde nachgewiesen, dass Detergenzien einen Einfluss auf die Lipaseaktivität haben (Delorme *et al.*, 2011).

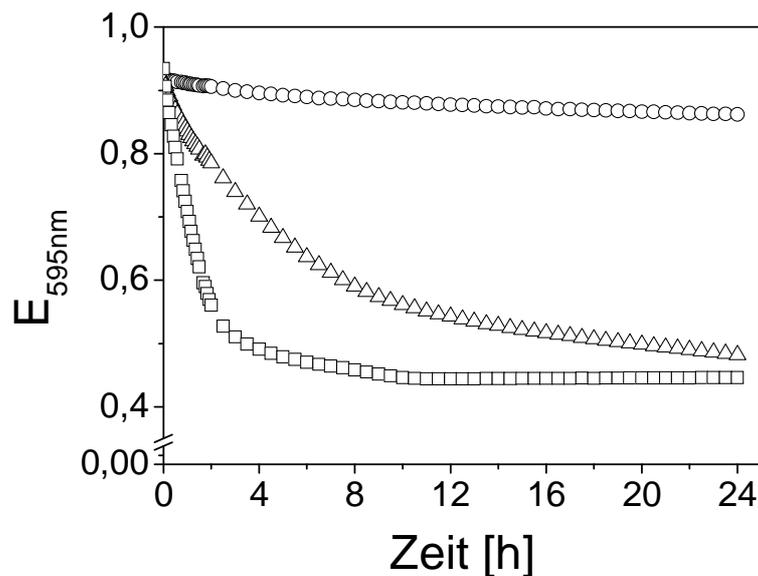


**Abbildung 5.3: Lateral versus Vertikal-Diffusion der Lipase bei Trübungsklärung einer in Agar immobilisierten Tributyrinemulsion.** **A:** Das Zwei-Schicht Lipase-Nachweissystem dargestellt im Petri-Platten-Maßstab. Die untere Schicht enthält ein Puffersystem mit 2 % Agar, die obere zusätzlich 1 % Tributyrin. Lipase wird in vorgefertigte Ausstanzungen gegeben und der Klärhof nach 24 h Inkubation bei 30 °C ausgemessen. Die radiale Diffusion führt zu einer Konzentrationsabnahme der Lipasemoleküle (•) über einen Gesamtdurchmesser von 10 cm. **B:** Im kleineren Mikrotiter-Platten-Maßstab erfolgt die Zugabe einer dritten Schicht, welche die Lipasemoleküle enthält. Die Diffusion der Lipase sowie der Produkte nach Hydrolyse erfolgen in eine Richtung über eine Länge von circa 0,6 cm, Verdünnungseffekte werden somit minimiert.

### 5.2.1 Das Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem zur Quantifizierung von Enzymaktivität

Als Modellenzym zur Entwicklung und Charakterisierung des Mikrotiter-Lipase-Nachweissystems wurde die *Thermomyces lanuginosus* Lipase (TLL) genutzt. Um die Eignung des Systems zur quantitativen Analyse von Lipaseaktivität zu bestimmen, wurde I) eine variable Enzymkonzentration in dem System angewandt und II) die Substratsättigung getestet.

Die Zugabe der TLL Lösung zeigt eine Abnahme der Extinktion bei 595 nm im Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem (Abbildung 5.4). Gezeigt werden konnte, dass die Extinktionsabnahme und somit die Hydrolyse des Tributyrin zunächst linear verläuft, wodurch die Daten zur weiteren Quantifizierung genutzt werden können. Nach einigen Stunden verhält sich die Abnahme der Extinktion hyperbolisch und nähert sich dem Hintergrundsignal aus Puffer und Agar von  $E_{595\text{nm}}=0,522\pm 0,136$  an.



**Abbildung 5.4: Zeitabhängige Änderung der Extinktion aufgrund der Hydrolyse der Tributyrinemulsion durch *T. lanuginosus* Lipase.** Zugabe von: 200 ng Enzym pro Kavität ( $\square$ ), 20 ng Enzym pro Kavität ( $\Delta$ ), kein Enzym pro Kavität ( $\circ$ ). Die Zugabe der Proben entspricht dem Nullpunkt auf der Zeitskala.

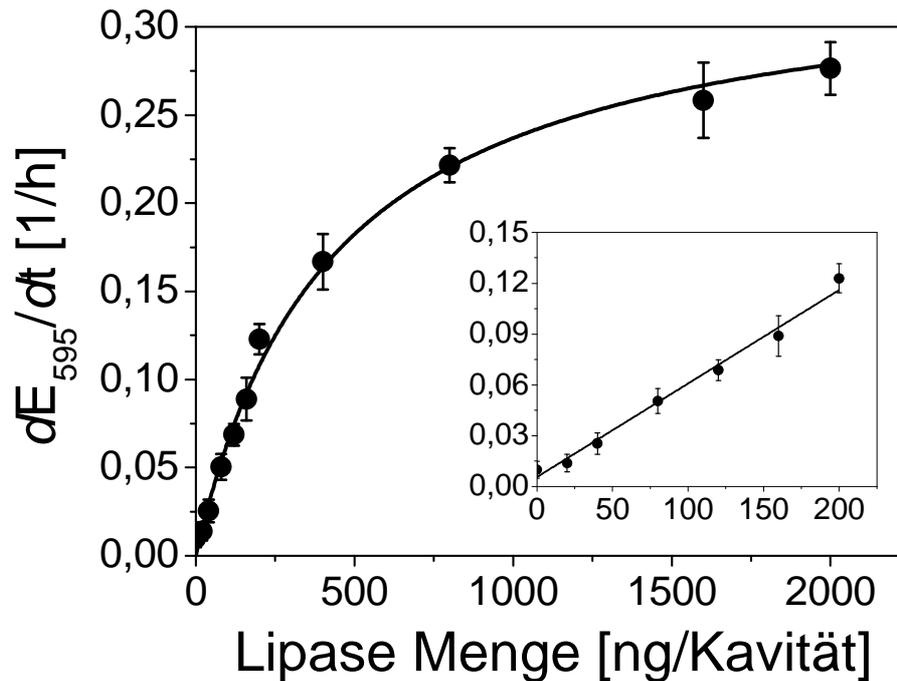
Unterschiedliche Lipasekonzentrationen haben eine Auswirkung auf die Abnahme des Extinktionssignals pro Zeiteinheit, wie in Abbildung 5.4 gezeigt. Werden nur die ersten zwei Stunden betrachtet, erkennt man eine lineare Abnahme der Extinktion pro Zeiteinheit. Eine Serie von unterschiedlichen Konzentrationen TLL pro Kavität wurde getestet (Abbildung 5.5). Deutlich wird, dass im Bereich zwischen 20 bis 200 ng TLL pro Kavität eine lineare Abhängigkeit zwischen Enzymmenge und Extinktionsänderung pro Zeiteinheit vorliegt. Dies entspricht einer Lipaseaktivität von 30 bis 300  $\mu\text{U}$  pro Kavität, welche mit dem *p*-Nitrophenyl-Palmitat Assay als Referenzsystem bestimmt wurde. Über 200 ng pro Kavität nimmt die Kurve eine hyperbolische Funktion an, die durch folgende Gleichung (1) ausgedrückt werden kann:

$$\frac{dE_{595}}{dt} = \frac{0,4 c}{27 \mu\text{g/ml} + c} \quad (1)$$

Diese Beziehung entspricht der Langmuir-Adsorptions-Isotherme, aus welcher eine Aussage über die Langmuir-Adsorption-Konstante getroffen werden kann, die im vorliegenden Modell einer Konzentration von  $1/27 \mu\text{g/mL}$  entspricht. Die Adsorptionskonstante kann einen Hinweis auf die Affinität des Enzyms gegenüber der Substratoberfläche in organisierter Form, d.h. in kompakter Struktur wie bei einem Öltropfen, geben.

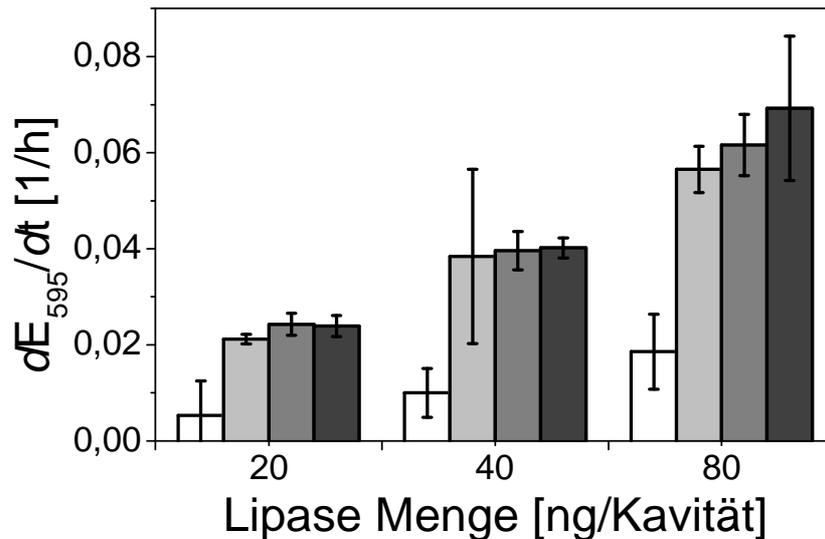
Die Hälfte der Oberfläche müsste bei dieser Konzentration mit Lipase bedeckt sein. Da die Adsorption ein entscheidender Schritt bei der Umsetzung von Lipiden durch Lipasen ist, könnte diese oberhalb von 200 ng TLL pro Kavität nicht mehr gewährleistet sein. Ein Grund dafür wäre, dass eine Limitierung des Substrates vorliegt.

Das vorliegende Ergebnis zeigt, dass eine Quantifizierung von Lipaseaktivität in dem neu entwickelten Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem möglich ist.



**Abbildung 5.5: Abhängigkeit der Extinktionsänderung pro Zeiteinheit von der Menge an aufgetragener Lipase.** Die erhaltenen Ergebnisse wurden mittels der hyperbolischen Funktion  $dE_{595}/dt = 0,4c/(27\mu\text{g/ml} + c)$  verbunden. Einbettung: linearer Teil der Konzentrationsabhängigkeit. Acht Parallelversuche führten zu den Standardabweichungen angezeigt durch die Fehlerbalken.

Standardmäßig wurde 1 % (v/v) Tributyrin, welches einer Konzentration von 34 mM entspricht, der oberen Schicht zugesetzt und emulgiert. Um eine Substratlimitierung auszuschließen, wurden, wie in Abbildung 5.6 dargestellt, vier verschiedene Konzentrationen (0,25 %, 0,5 %, 0,75 %, und 1 % (v/v)) an Tributyrin im Nachweissystem analysiert. Drei verschiedene Mengen TLL (20 ng, 40 ng und 80 ng) wurden in die jeweilige Kavität pipettiert. Klar erkennbar ist eine Abhängigkeit von der Enzymmenge bis zu einer Volumenkonzentration von 0,5 % Tributyrin. Bei einer Volumenkonzentration von 0,25 % Tributyrin ist jede der drei eingesetzten Lipasemengen substratabhängig. Die standardmäßig verwendete Volumenkonzentration von 1 % Tributyrin liegt in der Substratsättigung.



**Abbildung 5.6:** Einfluss der Tributyrinkonzentration auf die Änderung der Extinktion pro Zeiteinheit ( $dE_{595}/dt$ ) während der Hydrolyse im Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem. Die obere Substrat-enhaltende Schicht bestand aus 0,25 % (weiß), 0,5 % (hellgrau), 0,75 % (grau) oder 1 % (dunkelgrau) (v/v) Tributyrin.

### 5.2.2 Charakterisierung des quantitativen Mikrotiter-Lipase-Nachweissystems

In den ersten Versuchen wurde 2 % Agar (w/v) als stabilisierendes Polymer zur Tributyrinemulsion dazu gegeben. Ob Agar, welcher zu 70 % aus gelierender Agarose und zu 30 % aus nicht-gelierendem Agaropektin besteht (Produktinformation Juli 2013, Sigma-Aldrich, Deutschland), einen Einfluss auf die Tributyrinröpfchen-Größe sowie deren Verteilung aber auch auf die Diffusion der Moleküle durch das Netzwerk hat, wurden zwei weitere polymerbildende Moleküle vergleichend getestet.

Zum einen wurde die gelierende Komponente des Agars, die Agarose, zu einem vergleichbaren Anteil von 1,4 % (w/v) in dem Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem eingesetzt. Mittels Fluoreszenzfärbung der Tributyrinröpfchen im Polymer-Netzwerk und nachfolgender VideoScan® Analyse, welche Fluoreszenz-Mikroskopie mit einer automatischen Datenerfassung verknüpft, konnte die Größe ermittelt werden. In beiden Polymer-Netzwerken, Agar sowie Agarose, konnte eine Tributyrinröpfchen-Größe von  $1,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$  erfasst werden. Der mittlere Abstand zwischen zwei Tröpfchen betrug  $20 \mu\text{m}$  (Daten ohne Abbildung).

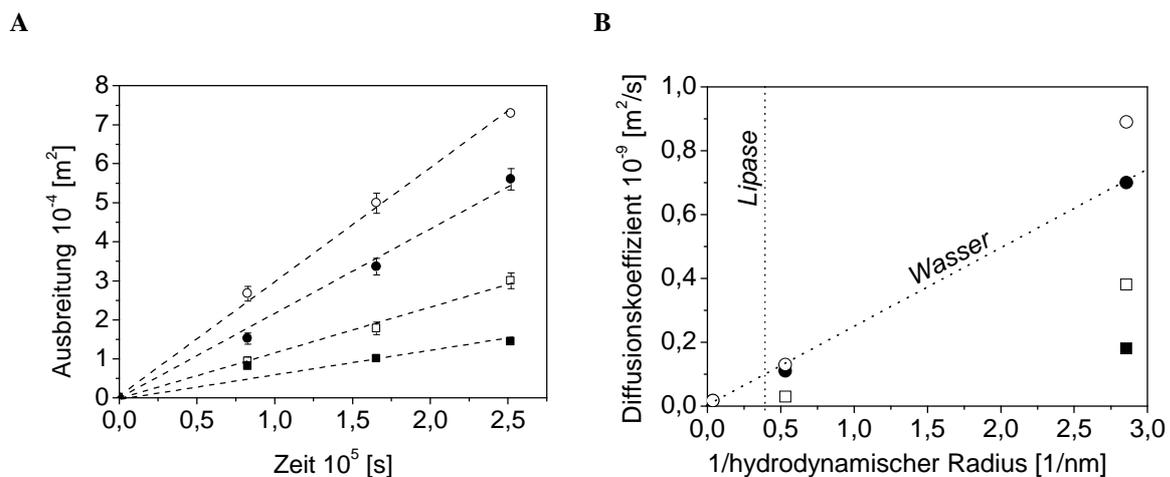
Agar und Agarose wurden vergleichend mit einer dritten gelierenden Substanz, dem Acrylamid/Bisacrylamid Polymer (Polyacrylamid) im Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem eingesetzt, um die Diffusionsgeschwindigkeit von drei Standardmolekülen zu bestimmen. Das Ziel war zu ermitteln, ob die zufällige Bewegung der Teilchen, die zur Diffusion führt, durch die Netzstruktur der gelierenden Substanzen gestört ist. Obwohl die Viskosität des Substrates durch die Polymerisation der Moleküle in allen drei Substanzen zunimmt, könnte die Mikroviskosität nicht beeinträchtigt sein. Aus diesem Grund wurde das Diffusionsverhalten von drei verschiedenen Molekülen untersucht (Tabelle 5.1)

**Tabelle 5.1: Standardmoleküle, welche auf ihr Diffusionsverhalten untersucht wurden und deren molekulare Masse.**

Standardmoleküle	Molekulare Masse [g/mol]
Neutralrot	389
Cytochrom c	12.400
Dextran Blau	2.000.000

Dabei wurden Glasröhrchen mit dem Wasser/Polymergemisch gefüllt und die ausgewählten Moleküle platziert. Die Diffusion der farbigen Moleküle wurde durch das Zurücklegen einer Wegstrecke pro Zeiteinheit analysiert. Exemplarisch ist die Diffusion von Neutralrot in allen drei Polymer-netzwerkausbildenden Substanzen als Laufstrecke im Verhältnis zur Zeit in Abbildung 5.7A dargestellt. Polyacrylamid wurde dabei in zwei verschiedenen Konzentration, 8 % und 15 % (w/v), eingesetzt. Erkennbar ist, dass Neutralrot in Agarose am schnellsten eine definierte Strecke zurücklegt, wobei das Laufverhalten im 15 % (v/v) Polyacrylamid am langsamsten ist. Aus den erhaltenen Werten konnte der Diffusionskoeffizient ermittelt werden. Wird der ermittelte Diffusionskoeffizient der einzelnen Moleküle in allen drei Polymer-Netzwerken gegen den errechneten hydrodynamischen Radius der einzelnen Moleküle aufgetragen, kann eine Aussage über die Mikroviskosität im strukturierten Netzwerk getroffen werden (Abbildung 5.7B). Die gelformenden Polymere Agar und Agarose scheinen keinen Einfluss auf die Mikroviskosität zu haben, vielmehr stabilisieren sie durch ihre erhöhte Viskosität nach Polymerisation die Tributyrinröpfchen, beeinflussen aber nicht die Diffusionsgeschwindigkeit kleinerer Moleküle, wie Neutralrot, Cytochrom c und Dextran Blau. Die TLL, welche mit ihrer molekularen Masse bei 34.000 g/mol liegt, sollte somit in ihrer Diffusion nicht behindert werden (Barig *et al.*, 2014).

Wird das Netzwerk aus Acrylamid/Bisacrylamid betrachtet, erhöht sich nicht nur die Viskosität, sondern auch die Mikroviskosität, denn die ausgewählten Moleküle sind in ihrer Diffusion beeinträchtigt. Abbildung 5.7B zeigt, dass nur Neutralrot in beiden Polyacrylamid-Gelen diffundiert, wobei die Diffusionskoeffizienten unter der Mikroviskosität in Wasser liegen. Cytochrom c, welches mit seiner molekularen Masse am nächsten zur TLL liegt, zeigt Diffusion nur im 8 % (v/v) Polyacrylamid-Gel. Somit sind die Polyacrylamid-Gele für das Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem ungeeignet, da sie eine Diffusionsbarriere für Lipasen schaffen.



**Abbildung 5.7: Diffusionsverhalten verschiedener Standardmoleküle im Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem stabilisiert durch verschiedene gelformende Polymere.** Glasröhrchen wurden mit dem Substrat/Puffer Gemisch des Lipase-Nachweissystems gefüllt, welche mit Agar (2%, (w/v),  $\bullet$ ), Agarose (1,4 % (w/v),  $\circ$ ) oder Polyacrylamide (8 % (v/v),  $\square$  und 15 % (v/v),  $\blacksquare$ ) stabilisiert wurden. **A:** Diffusionsverhalten von Neutralrot. **B:** Diffusionskoeffizienten im Verhältnis zum berechneten hydrodynamischen Radius der untersuchten Standardmoleküle (Neutralrot, Cytochrom c und Dextran Blau). Die vertikale Linie entspricht dem berechneten hydrodynamischen Radius aus der molekularen Masse der *Thermomyces lanuginosus* Lipase. Die ansteigende Linie entspricht der Mikroviskosität in Wasser.

Um die Extinktionsabnahme in den Kavitäten nach Lipasezugabe eindeutig mit der Hydrolyse von Tributyrin in Verbindung zu bringen, wurde die Endkonzentration von Glycerin nach Trübungsklärung in den Kavitäten ermittelt. Erstaunlicherweise wurde nur eine Massenkonzentration von 4 % des zu erwartenden Glyzeringehaltes ermittelt. Das lässt darauf schließen, dass die Hydrolyse nicht vollständig abläuft. Wahrscheinlich sind die Hydrolyseprodukte wasserlöslich und somit in geringerem Umfang als Substrat für die TLL zugänglich. Jurado *et al.* (2008) zeigten zum Beispiel, dass eine vollständige Umsetzung von Tributyrin durch die TLL nicht erreicht wird, da das Monoglyzerid wasserlöslich ist.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die TLL 1,3 positionsspezifisch an Triglyzeriden arbeitet und eine vollständige Umsetzung nur in wenigen Fällen stattfindet (Omar *et al.*, 1987; Jurado *et al.*, 2008). Weitere Details und eine ausführliche Diskussion finden sich in der Publikation Barig *et al.* (2013).

### 5.3 Anwendungen des quantitativen Mikrotiter-Lipase-Nachweissystems

Das Anwendungspotential des neuen quantitativen Mikrotiter-Lipase-Nachweissystems wurde untersucht, indem Lipasen pilzlichen, bakteriellen und tierischen Ursprungs auf das System angewandt wurden. Sechs lipolytische Enzyme, die Lipasen aus *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium viscosum* (Typ XII), *Pseudomonas fluorescense* sowie aus dem Schweinepankreas (Typ II) wurden in verschiedenen Mengen zugegeben. Dabei lag das Detektionslimit bei allen unter 100 ng pro Kavität und der lineare Bereich reichte bis 180 ng pro Kavität. Somit konnte gezeigt werden, dass dieses quantitative Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem für verschiedenste Lipasen anwendbar ist.

Die Möglichkeit, auch unbekannte Lipasen vergleichend zu einer Kalibriergerade der TLL zu analysieren, liegt nahe. Somit könnte dieses Nachweissystem zur Analyse unbekannter Proben, aber auch für durch „Protein Engineering“ synthetisierter Lipasen eingesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Charakterisierung von Enzymen mit dem entwickelten quantitativen Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem. Eine einfache Einstellung des pH-Wertes durch entsprechende Puffersysteme bietet die Möglichkeit, die Aktivität abhängig vom pH-Wert zu ermitteln. Ein zu beachtendes Kriterium ist dabei den zu untersuchenden pH Wert Bereich oberhalb der Dissoziationskonstante von Buttersäure von  $pK_a=4,88$  festzulegen, da sonst die Diffusion der Produkte und damit die Trübungsklärung beeinträchtigt ist (Zigova *et al.*, 1999).

Eine Zugabe verschiedener Metall-Ionen, welche bekannt sind, Lipaseaktivität zu stimulieren oder zu reprimieren, ist denkbar.  $Ca^{2+}$  ist zum Beispiel eines dieser Ionen, welche einen stabilisierenden Effekt auf Lipasen haben und so die Temperaturstabilität erhöhen (Sangeetha *et al.*, 2011). Die Toleranz gegenüber weiteren positiven oder negativen Effektoren, wie z.B. Gallensalze oder Detergenzien, ist ein weiteres Kriterium, um zum Beispiel Lipasen für die Substitutionstherapie bei pankreasinsuffizienten Patienten einzusetzen (Aloulou *et al.*, 2007). Die Zugabe zu dem System könnte innerhalb weniger Stunden Aufschluss über dieses Kriterium geben.

## 5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Es wurde erfolgreich ein Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem entwickelt, das mit emulgiertem Tributyrin als Substrat arbeitet. Stabilisiert wird die Emulsion durch das gelformende Polymer Agar. Gegenüber herkömmlichen turbidimetrischen Lipase-Nachweissystemen wird eine eindimensionale Diffusion durch das Substrat ermöglicht. Eine Online Analyse mittels Platten Spektrophotometer wurde möglich, die den Hydrolyse-Verlauf durch eine graduelle Trübungsklärung über die Zeit aufnehmen kann.

Es konnte gezeigt werden, dass die Änderung der Extinktion bei 595 nm abhängig von der Enzymkonzentration ist und bei der standardmäßig genutzten Tributyrinkonzentration von 1 % (v/v) keine Substratlimitierung vorliegt.

Eine eingehende Charakterisierung des Systems in Bezug auf verschiedene stabilisierende Polymer-Netzwerke, deren Einfluss auf die Tröpfchenverteilung und -größe sowie die Diffusionsparameter konnten bestimmt werden.

Ein Vorteil ist das geringe Volumen und die Möglichkeit ein hohes Probenaufkommen in 96 Parallelversuchen schnell, das heißt innerhalb einer Stunde, durchzuführen.

Die Anwendbarkeit auf Lipasen verschiedenen Ursprungs konnte gezeigt werden. Somit ist es möglich, dieses neu entwickelte Lipase Nachweissystem in verschiedensten Bereichen einzusetzen. Mögliche Anwendungsgebiete sind eine schnelle quantitative Lipaseaktivitätsbestimmung sowie die teilweise Charakterisierung von Lipasen.

Einige Ansatzpunkte zur Verbesserung des Systems könnten in Folgeprojekten bearbeitet werden. Da Tributyrin bis zu 0,8 mM in Wasser löslich ist und somit gleichzeitig ein Esterase Substrat ist, ist die Unterscheidung zwischen Esterase und Lipase nicht eindeutig zu treffen (Berg *et al.*, 1998). Eine Möglichkeit ist es, langkettige Triglyceride (>C10) als emulgiertes Substrat einzusetzen. Der Abtransport der Produkte von der Oberfläche stellt in diesem Fall ein Problem dar (Reis *et al.*, 2008). Möglichkeiten sind, die entstandenen freien Fettsäuren durch Fällung mit Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Na}^+$  sichtbar zu machen oder Fluoreszenz-Farbstoffe, wie Rhodamin, zu nutzen, welche das erhöhte Aufkommen freier Fettsäuren mit einem intensiveren Signal anzeigen (Smeltzer *et al.*, 1992; Kouker und Jäger, 1987).

Eine weitere Möglichkeit, welche den Abtransport von freien Fettsäuren von der Oberfläche begünstigt, ist der Einsatz von Detergenzien oder Cyclodextrinen (Ivanova *et al.*, 1997). Die Oberfläche ist damit für die Lipasen besser zugänglich und die Tröpfchen werden kleiner, was eine Klärung begünstigen kann. Diese Möglichkeiten würden das Spektrum des Nachweissystems erweitern. So könnte die Substratspezifität auf lang- oder kurzkettige Triglyzeride getestet werden sowie unbekannte Enzyme als Esterasen oder Lipasen klassifiziert werden.

Ein weiteres mögliches Anwendungsgebiet ist neben dem Screening und der Charakterisierung von Lipasen die Nutzung des Lipase Nachweissystems in der klinischen Diagnostik. Die Sensitivität des Testsystems mit einem komplexen Material wie Blut, müsste in verschiedenen Testreihen untersucht werden.

Weiterhin stellt sich die Frage, wie die Trübungsklärung zustande kommt. Da nur ein geringer Prozentsatz des zu erwartenden Glycerins nach totaler Klärung detektiert wurde, wäre ein Ansatzpunkt, die weiteren Hydrolyse-Produkte in der wässrigen aber auch organischen Phase nachzuweisen. Der einfachste Fall wäre die Hydrolyse von Tributyrin zu Dibutyryl- und Buttersäure, wobei beide Produkte wasserlöslich wären und es somit zu einer schnellen Klärung der Emulsion käme. Die Produkte wären mittels Dünnschichtchromatographie (TLC) oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) detektierbar.

Das vorgestellte Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem analysiert die relative Klärung einer Tributyrinemulsion in Abhängigkeit der eingesetzten Aktivität. Um einen Bezug zur Lipaseaktivität herzustellen, wäre ein Referenz-Lipaseaktivitätsassay anzuwenden. Dabei bietet sich die Bestimmung der Lipaseaktivität mittels Titrimetrie mit Tributyrin als Substrat an. Die Aktivität der spezifischen Proteinmengen einer Referenz-Lipase, wie zum Beispiel der TLL, sollte definiert werden. Wird diese Lipase im Mikrotiter-Lipase-Nachweissystem mitgeführt, lässt diese eine Schlussfolgerung auf die Lipaseaktivität gegenüber Tributyrin der zu analysierenden Proben zu.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Adrio J.L., Demain A.L. 2003. Fungal biotechnology. *International Microbiology*. 6:191–199.
- [2] Alford J.A., Steinle E.E. 1967. A Double Layered Plate Method for the Detection of Microbial Lipolysis. *Journal of Applied Microbiology*. 30(3):488–494.
- [3] Aloulou A., Rodriguez J.A., Puccinelli D., Mouz N., Leclaire J., Leblond Y., Carrière F. 2007. Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1771(2):228-37.
- [4] Alvarez-Vasquez F., González-Alco C., Torres N.V. 2008. Metabolism of Citric Acid Production by *Aspergillus niger*: Model Definition, Steady-State Analysis and Constrained Optimization of Citric Acid Production Rate. *Extremophiles*. 12, p.351–364.
- [5] Ansorge-Schuhmacher M., Thum O. 2011. Robuste, langzeitstabile Enzympräparate. *Biospektrum*. 3:352.
- [6] Bancercz, R., Ginalska, G., Fiedurek, J., Gromada, A. 2005. Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32(6):253-260.
- [7] Barig S., Alisch R., Nieland S., Wuttke A., Gräser Y., Huddar M., Schnitzlein K., Stahmann K.-P. 2011. Monoseptic growth of fungal lipase producers under minimized sterile conditions: Cultivation of *Phialemonium curvatum* in 350 L scale. *Engineering in Life Sciences*. 11:387–394.
- [8] Barig S., Funke A., Merseburg A., Schnitzlein K., Stahmann K.-P. 2014. Dry entrapment of enzymes by epoxy or polyester resins hardened on different solid supports. *Enzyme and Microbial Technology*. 60:47-55.
- [9] Barig S., Schiemann M., Mirsky V.M., Stahmann K.-P. 2013. Quantitative turbidity assay for lipolytic enzymes in microtiter plates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405(26):8539-47.

- [10] Basso A., Braiuca P., De Martin L., Ebert C., Gardossi L., Linda P. 2000. D-Phenylglycine and D-4-hydroxyphenylglycine methyl esters via penicillin G acylase catalysed resolution in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*. 11(8):1789–1796.
- [11] Batista-Viera F., Ovsejevi K., Manta C. 2006. Reversible Covalent Immobilization of Enzymes Via Their Thiol Groups. In: Guisan J.M. (Editor) *Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Biotechnology™*. Springer. 22:15-30.
- [12] Beisson F., Tiss A., Rivière C., Verger R. 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2000, 133–153.
- [13] Berg O.G., Cajal Y., Butterfoss G.L., Grey R.L., Alsina M.A., Yu B.-Z., Jain M.K. 1998. Interfacial Activation of Triglyceride Lipase from *Thermomyces (Humicola) lanuginosa*: Kinetic Parameters and a Basis for Control of the Lid. *Biochemistry*. 37(19):6615-6627.
- [14] Berg O.G., Gelb M.H., Ming-Daw T., Jain M.K. 2001. Interfacial Enzymology: The Secreted Phospholipase A2-Paradigm. *Chemical Reviews*. 101:2613-2653.
- [15] Brady D., Jordaan J. 2009. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters* 31:1639–1650.
- [16] Brena B.M., Batista-Viera F. 2006. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: Guisan J.M. (Editor). *Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Biotechnology™*. Springer. 22:15-30.
- [17] Brzozowski A.M., Savage H., Verma C.S., Turkenburg J.P., Lawson D.M., Svendsen A., Patkar S. 2000. Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. *Biochemistry*. 39(49):15071-82.
- [18] Boel E., Høge-Jensen I.B. 1995. Recombinant *Humicola* lipase and process for the production of recombinant *Humicola* lipase. EP:0305216B1.
- [19] Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J. 2006. *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*. Second Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KG aA.
- [20] Bornscheuer U.T., Huisman G.W., Kazlauskas R.J., Lutz S., Moore J.C., Robins K. 2012. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*. 485:185-194.

- [21] Cantone S., Ferrario V., Corici L., Ebert C., Fattor D., Spizzzoa P., Gardossi L. 2013. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. *Chemical Society Reviews*. 42(9):3847-61.
- [22] Carlsson J., Axén R., Unge T. 1975. Reversible, Covalent Immobilization of Enzymes by Thiol-Disulphide Interchange. *European Journal of Biochemistry*. 59:567-572.
- [23] Cao L., van Rantwijk F., Sheldon R.A. 2000. Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. *Organic Letters*. 2,10:1361-1364.
- [24] Cao L. 2005. *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. WILEY-VCH Verlag, Weinheim.
- [25] Chmiel H. (Hrsg.). 2011. *Bioprozesstechnik*. 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- [26] Colin V.L., Domingo Baigorí M., Pera L.M. 2011. Mycelium-bound lipase production from *Aspergillus niger* MYA 135, and its potential applications for the transesterification of ethanol. *Journal of Basic Microbiology* 51:236–242.
- [27] Delorme V., Dhouib R., Canaan S., Fotiadu F., Carrière F., Cavalier J.F. 2011. Effects of surfactants on lipase structure, activity, and inhibition. *Pharmaceutical Research* 28:1831–1842.
- [28] Derewenda U., Swenson L., Wie Y., Green R., Kobos P.M., Joerger R., Haas M.J., Derewenda Z.S. 1994. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. *Journal of Lipid Research*. 35:524-534.
- [29] Devi B.L.A.P., Zhang H., Damstrup M.L., Guo Z., Zhang L., Lue B.-M., Xu X. 2008. Enzymatic synthesis of designer lipids. *Oleagineux Corps Gras Lipides*. 15(3):189-195.
- [30] Domínguez A., Costas M., Longo M.A., Sanromán A. 2003. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*. 25:1225–1229.

- [31] Dückers N., Baer K., Simon S., Gröger H., Hummel W. 2010. Threonine aldolases - screening, properties and applications in the synthesis of non-proteinogenic  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 88:409–424.
- [32] Fakhreddine L., Kademi A., Ait-Abdelkader N., Jacques C. B. 1998. Microbial growth and lipolytic activities of moderate thermophilic bacterial strains. *Biotechnology Letters*. 20(9):879–883.
- [33] Fernandes P. 2010. Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on Strategies for Better Biocatalysts. *Enzyme Research*. 2010:1-19.
- [34] Fernandez-Lafuente R. 2010. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62: 197–212.
- [35] Fickers P.; Ongena M.; Destain J.; Weekers F.; Thonart P. 2006. Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme and Microbial Technology*. 38(6):756-759.
- [36] Gams, W. 1983. *Phialemonium*, a New Anamorph Genus Intermediate between *Phialophora* and *Acremonium*. *Mycologia*. 75(6):977-987.
- [37] Gnauck B., Fründt P. 1991. Einstieg in die Kunststoffchemie. 3.Auflage. Carl Hanser Verlag München, Wien.
- [38] Goldberg J.M., Pagast P. 1976. Evaluation of Lipase Activity in Serum by Radial Enzyme Diffusion. *Clinical Chemistry*. 22(5):633-637.
- [39] Guisán J.M. (Hrsg.) 2010. Immobilization of Enzymes and Cells. 2<sup>nd</sup> Edition. Humana Press.
- [40] Gupta R., Gupta N., Rathi P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 763–781.
- [41] Gupta R., Rathi P., Gupta N., Bradoo S. 2003. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 37:63–71.
- [42] Hanefeld U., Gardossi L., Magner E. 2009. Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* 38:453–468.

- [43] Hasan F., Shah A.A., Hameed A. 2006. Industrial application of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39(2):235–251.
- [44] Hasan F., Shah A.A., Hameed A. 2009. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* 27:782–798.
- [45] Heinsman N.W.J.T., Schroën C.G.P.H., van der Padt A., Franssen M.C.R., Boom R.M., van't Riet K. 2003. Substrate sorption into the polymer matrix of Novozym 435<sup>®</sup> and its effect on the enantiomeric ratio determination. *Tetrahedron: Asymmetry*. 14(18,19):2699–2704.
- [46] Henrik E.G.E. 1994. Verfahren zur Immobilisierung eines Proteins auf ein Polymer und so erzeugte Membran. DE68909777T2.
- [47] Hess M., Katzer M., Antranikian G. 2008. Extremely thermostable esterases from the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus*. *Extremophiles*. 12:351–364.
- [48] Ho L.-F., Li S.-Y., Lin S.-C., Hsu W.-H., 2004 Integrated enzyme purification and immobilization processes with immobilized metal affinity adsorbents. *Process Biochemistry*. 39(11):1573–158.
- [49] Houde A., Kademi A., Leblanc D. 2004. Lipases and Their Industrial Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 118:155-170.
- [50] Hudson S., Magner E., Cooney J., B. Kieran Hodnett B.K. 2005. Methodology for the Immobilization of Enzymes onto Mesoporous Materials. *Journal of Physical Chemistry B*. 109(41):19496–19506.
- [51] Inagaki M., Hiratake J., Nishioka T., Oda J. 1992. One-pot synthesis of optically active cyanohydrin acetates from aldehydes via lipase-catalyzed kinetic resolution coupled with in situ formation and racemization of cyanohydrins. *The Journal of Organic Chemistry*. 57(21):5643–5649.
- [52] Ivanova M., Verger R., Panaiotov I. 1997. Mechanisms underlying the desorption of long-chain lipolytic products by cyclodextrins: application to lipase kinetics in monolayer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 10:1-12.

- [53] Jaeger K.-E, Dijkstra B.W, Reetz M.T. 1999. Bacterial Biocatalysts: Molecular, Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annual Review of Microbiology*. 53:315–351.
- [54] Jette J.F., Ziomek E. 1994. Determination of Lipase Activity by a Rhodamine-Triglyceride-Agarose Assay. *Analytical Biochemistry*. 219(2):256–260.
- [55] Jha B. K., Svensson M., Kronberg B., Holmberg K. 1999. Titration Microcalorimetry Studies of the Interaction between *Humicola lanuginosa* Lipase and Ionic Surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol.: 213, p. 262–264.
- [56] Jurado E., Camacho F. Luzón G., Fernández-Serrano M., García-Román M. 2008. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of triglycerides in o/w emulsions Study of the initial rates and the reaction time course. *Biochemical Engineering Journal*. 40:473–484.
- [57] Klein J., Kressdorf B. 1982. Immobilization of living whole cells in an epoxy matrix. *Biotechnology Letters* 4:375-380.
- [58] Klein-Marcuschamer D., Oleskowicz-Popiel P., Simmons B.A., Blanch H.W. 2012. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*. 109(4):1083–1087.
- [59] Koizumi M., Takada T., Kawarada Y., Hirata K., Mayumi T., Yoshida M., Sekimoto M., Hirota M., Kimura Y., Takeda K., Isaji S., Otsuki , Matsuno S. 2006. JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: diagnostic criteria for acute pancreatitis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. 13:25–32.
- [60] Kouker G., Jaeger K.-J. 1987. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(1):211-213.
- [61] Lopez-Serrano P., Cao L., van Rantwijk F., Sheldon R.A. 2002. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnology Letters* 24:1379–1383.
- [62] Mahadik N.D., Puntambekar U.S., Bastawde K.B., Khire J.M., Gokhale D.V. 2002. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 38:715-721.

- [63] Murty V.R., Bhat J., Muniswaran P.K.A. 2002. Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.7: 57-66.
- [64] Martinelle M., Holmquist M., Hult K. 1995. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1258(3):272–276.
- [65] Mateo C., Fernández-Lorente G., Abian O., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M. 2000. Multifunctional Epoxy Supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules*.1(4):739-45.
- [66] Maurer K.-H., Elleuche S., Antranikian G. 2013. Enzyme. In: Sahn H., Antranikian G., Stahmann K.-P., Takors R. (Hrsg.). *Industrielle Mikrobiologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [67] Miletic N., Vukovic Z., Nastasovic A., Loos K. 2011. Effect of *Candida antarctica* Lipase B Immobilization on the Porous Structure of the Carrier. *Macromolecular Bioscience*. 11, 1537–1543.
- [68] Mogensen J.E., Sehgal P., Otzen D.E. 2005. Activation, Inhibition, and Destabilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase by Detergents. *Biochemistry*. 44:1719-1730.
- [69] Omar C.I., Mitsunori H., Nagai S. 1987. Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* No.3. *Agricultural and Biological Chemistry*. 51:37-45.
- [70] Palomo J.M., Fuentes M., Fernández-Lorente G., Mateo C., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R. 2003. General Trend of Lipase to Self-Assemble Giving Bimolecular Aggregates Greatly Modifies the Enzyme Functionality. *Biomacromolecules*. 4,1:1-6.
- [71] Pessela B.C.C., Fernández-Lafuente R., Fuentes M., Vián A., García J.L., Carrascosa A.V., Mateo C., Guisán J.M. Reversible immobilization of a thermophilic  $\beta$ -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. *Enzyme and Microbial Technology*. 32(3-4):369–374.
- [72] Peters G.H., Svendsen A., Langberg H., Vind J., Patkar S.A., Toxvaerd S., Kinnunen P. K. J. 1998. Active Serine Involved in the Stabilization of the Active Site Loop in the *Humicola lanuginosa* Lipase. *Biochemistry*. 37:12375-12383.

- [73] Pierre A.C. 2004. The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocatalysis and Biotransformation*. 22(3):145-170.
- [74] Prathumpai W., Flitter S. J., McIntyre M., Nielsen J. 2004. Lipase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* expressing a lipase-encoding gene from *Thermomyces lanuginosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65, 714–719.
- [75] Proia L.A., Hayden M.K., Kammeyer P.L., Ortiz J., Sutton D.A., Clark T., Schroers H.J., Summerbell R.C. 2004. *Phialemonium*: an emerging mold pathogen that caused 4 cases of hemodialysis-associated endovascular infection. *Clinical Infectious Diseases*. 39(3):373-9.
- [76] Rajesh E. M., Arthe R., Rajedran R., Balakumar C., Pradeepa N., Anitha S. 2010. Investigation of lipase production by *Trichoderma reesei* and optimization of production parameters. *Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry*. 9(7):1177-1189.
- [77] Reis H., Pfiffi S., Hahn M. 2005. Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*. 6:257–267.
- [78] Reis P., Holmberg K., Miller R., Krägel J., Grigoriev D.O., Leser M.E., Watzke H.J. 2008. Competition between Lipases and Monoglycerides at Interfaces. *Langmuir*. 24:7400-7407
- [79] Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M.E., Miller R. 2009. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 147–148:237–250.
- [80] Reetz M. 2002. New Methods for the High-Throughput Screening of Enantioselective Catalysts and Biocatalysts. *Angew. Angewandte Chemie International Edition*. 41(8):1335-1338.
- [81] Sangeetha R., Arulpandi I., Geetha A. 2011. Bacterial Lipases as Potential Industrial Biocatalysts: An Overview. *Research Journal of Microbiology*. 6(1):1-24.
- [82] Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W. 2012. Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 109:6241–6246.

- [83] Schoemaker H.E., Mink D., Wubbolts M.G. 2003. Dispelling the Myths - Biocatalysis in Industrial Synthesis. *SCIENCE*. 299:1694-1697.
- [84] Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 19:627–662.
- [85] Sheldon R.A. 2007. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*. 349:1289 – 1307.
- [86] Sheldon R.A. 2011. Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. *Organic Process Research & Development*. 15: 213–223.
- [87] Singh S., Madlala A.M., Prior B.A. 2003. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews*. 27:3-16.
- [88] Smeltzer M. S., Hart M.E., Iandolo J.J. 1992. Quantitative Spectrophotometric Assay for Staphylococcal Lipase. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(9):2815-2819.
- [89] Sonesson A.W., Callisen T.H., Brismar H., Elofsson U.M. 2005. Lipase Surface Diffusion Studied by Fluorescence Recovery after Photobleaching. *Langmuir*. 21:11949-11956.
- [90] Sonesson A.W., Elofsson U.M., Brismar H., Callisen T.H. 2006. Adsorption and Mobility of a Lipase at a Hydrophobic Surface in the Presence of Surfactants. *Langmuir*. 22:5810-5817.
- [91] Soumanou M.M., Pérignon M., Villeneuve P. 2013. Lipase-catalyzed interesterification reactions for human milk fat substitutes production: A review. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 115:270–285.
- [92] Spahn C., Minteer S.D. 2008. Enzyme Immobilization in Biotechnology. *Recent Patents on Engineering*. 2:195-200.
- [93] Stahmann K.-P., Nieland S., Wuttke A. 2008. Mikrobielles Verfahren zur Herstellung von Enzymen. Patent DE 10 2006 057 724 A1.
- [94] Stahmann K.-P., Hohmann H.-P. 2013. Vitamine, Nukleotide und Carotinoide. In: Sahn H., Antranikian G., Stahmann K.-H., Takors R. (Hrsg.). *Industrielle Mikrobiologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- [95] Steinreiber S., Fesko K., Reisinger C., Schurmann M., Assema F., Wolberg M., Mink D., Griengl H. 2007. Threonine aldolases - an emerging tool for organic synthesis. *Tetrahedron* 63:918–926.
- [96] Svendsen A., Skojot M., Brask J., Vind J., Patkar S.A., DeMaria L. 2007. Immobilised Enzymes. WO/2007/ 080197.
- [97] Terpe K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60(5):523-533.
- [98] Tischer W., Kasche V. 1999. Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends in Biotechnology*. 17:326-335.
- [99] Treichel H., DeOliveira D., Mazutti M.A., DiLuccio M., Oliveira J.V. 2010. A Review on Microbial Lipases Production. *Food and Bioprocess Technology*. 3:182–196.
- [100] Toida, J., Arikawa, Y., Kondou, K., Fukuzawa, M., Sekiguchi, J. 1998. Purification and Characterization of Triacylglycerol Lipase from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 62(4):759-763.
- [101] Tufvesson P., Lima-Ramos J., Nordblad M., Woodley J.M. 2011. Guidelines and Cost Analysis for Catalyst Production in Biocatalytic Processes. *Organic Process Research & Development*. 15, 266–274.
- [102] Verger R., Mieras M.C., DeHaas G.H. 1973. Action of Phospholipase A at Interfaces. *Journal of Biological Chemistry*. 248(11):4023-4034.
- [103] Watanabe Y., Shimada Y., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominaga J. 2000. Continuous Production of Biodiesel Fuel from Vegetable Oil Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 77(4):355-360.
- [104] Wilson L., Illanes A., Pessela B.C.C., Abian O., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M. 2004. Encapsulation of Crosslinked Penicillin G Acylase Aggregates in Lentikats: Evaluation of a Novel Biocatalyst in Organic Media. *Biotechnology and Bioengineering*. 86:558-562.

- [105] Wu X.Y., Jääskeläinen S., Linko Y.-Y. 1996. Purification and Partial Characterization of *Rhizomucor miehei* Lipase for Ester Synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 59:145-158.
- [106] Yapoudjian S., Ivanova M.G., Brzozowski A.M., Patkar S.A., Vind, J., Svendsen A., Verger R. 2002. Binding of *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase to the mixed micelles of cis-parinaric acid/NaTDC. *European Journal of Biochemistry*. 269:1613-21.
- [107] Yan Y, Zhang X., Chen D. 2013 Enhanced catalysis of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 immobilized on macroporous resin and its application in enrichment of polyunsaturated fatty acids *Bioresource Technology*. *Bioresource Technology*. 131:179–187.
- [108] Yeoh H.H., Wong F.M., Lim G. 1986. Screening for Fungal Lipase Using Chromogenic Lipid Substrates. *Mycologia*. 78(2):298-300.
- [109] Zígová J., Sturdík E., Vandák D., Schlosser S. 1999. Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with integrated extraction and pertraction. *Process Biochemistry*. 34:835–843.
- [110] Zhou J., Lucas J.P. 1999. Hygrothermal effects of epoxy resin. Part I: the nature of water in epoxy. *Polymer*. 40:5505–5512.

## 7. Veröffentlichungen

### Original Publikationen

- 1) Susann Barig, Romy Alisch, Susanne Nieland, Anne Wuttke, Yvonne Gräser, Mahesh Huddar, Klaus Schnitzlein, and K.-Peter Stahmann. Monoseptic Growth of fungal Lipase Producers under minimized sterile Conditions: Cultivation of *Phialemonium curvatum* in 350 Litre Scale. *Engineering in Life Sciences*. 2011, 11(4):387–394.
- 2) Susann Barig, Andreas Funke, Andrea Merseburg, Klaus Schnitzlein, and K.-Peter Stahmann. Dry entrapment of enzymes by epoxy or polyester resins hardened on different solid supports. *Enzyme and Microbial Technology*. 2014, 60:47-55.
- 3) Susann Barig, Manja Schiemann, Vladimir M. Mirsky, K.-Peter Stahmann. Quantitative turbidity assay for lipolytic enzymes in microtiter plates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, 405(26):8539-47.

## **7.1 Original Publikation**

**Monoseptic growth of fungal lipase producers  
under minimized sterile conditions:  
Cultivation of *Phialemonium curvatum* in 350 L scale**

**Reprinted from Engineering in Life Sciences Vol. 11**

**Barig S., Alisch R., Nieland S., Wuttke A., Gräser Y.,**

**Huddar M., Schnitzlein K., Stahmann K.-P.:**

**Monoseptic growth of fungal lipase producers under minimized sterile conditions:**

**Cultivation of *Phialemonium curvatum* in 350 L scale,**

**387–394 (2011)**

**with permission from Wiley and Sons.**

Susann Barig<sup>1</sup>  
Romy Alisch<sup>1\*</sup>  
Susanne Nieland<sup>1</sup>  
Anne Wuttke<sup>1\*\*</sup>  
Yvonne Gräser<sup>2</sup>  
Mahesh Huddar<sup>3</sup>  
Klaus Schnitzlein<sup>3</sup>  
Klaus-Peter Stahmann<sup>1</sup>

Research Article

## Monoseptic growth of fungal lipase producers under minimized sterile conditions: Cultivation of *Phialemonium curvatum* in 350 L scale

<sup>1</sup>Fachbereich Bio-, Chemie- und Verfahrenstechnik, Hochschule Lausitz (FH), Senftenberg, Germany

<sup>2</sup>Institute of Microbiology and Hygiene (Charité), Humboldt University, Berlin, Germany

<sup>3</sup>Lehrstuhl für Chemische Reaktionstechnik, Brandenburgische Technische Universität Cottbus, Universitätsplatz, Cottbus, Germany

A disadvantage of most microbial production processes is the need for sterile techniques. The objective of this study was the development of a robust fungal system allowing monoseptic growth with a minimum of sterile technique in plastic barrels. Selective growth conditions were achieved by mineral salts medium, known for the cultivation of *Botrytis cinerea*, but containing rapeseed oil instead of glucose as the sole source of carbon and energy. Furthermore, pH 3 was adjusted. A screening of fungi suitable for that system revealed *Phialemonium curvatum* AW02 isolated from compost. *P. curvatum* AW02 was superior in comparison with four further fungal isolates because high titers of hydrophilic spores were found in submerged production. Second, a biofilm formation on plastic segments or moving beds made harvesting of the biomass comfortable. Cultivations with volumes of 100 or 350 L showed no contaminations by bacteria when all conditions were controlled. Two independent approaches showed the dependence of growth on lipases in the cultivation system. A *B. cinerea* strain knocked out in *lip1* showed reduced growth in comparison to the wild type because the first catabolic step is the triglyceride hydrolysis. *P. curvatum* AW02 lipase activity was detected. More than 90% was found to be cell wall associated. Solid shear stress liberated two active proteins showing IEPs of 4.7 or 5.6.

**Keywords:** *Botrytis cinerea* / *Geotrichum candidum* / *Mucor circinelloides* / *Pseudozyma* sp. / *Torubiella* sp.

Received: December 9, 2010; revised: March 29, 2011; accepted: April 29, 2011

DOI: 10.1002/elsc.201000219

### 1 Introduction

The use of microorganisms for industrial production is state of the art. Although each of many processes is unique and specific a few common aspects can be found to set up the starting conditions for a possible new platform system: cultivation costs, carbon source, sterile conditions and fermenter volume.

Cultivation costs play a minor role for high-price products such as second-generation insulins, where a precursor is

generated, e.g. with *Escherichia coli* [1], and many downstream processing steps, e.g. refolding, contribute more than 90% of the costs for the whole stream. In the case of vitamin B<sub>12</sub>, produced by recombinant *Pseudomonas denitrificans* strains [2], a small market and the need for tiniest doses allow high selling prices. Impact of cultivation costs increases with reduced complexity in the structure of the product e.g. L-lysine or vitamin B<sub>2</sub>. Most interesting in the case of vitamin B<sub>2</sub> is that two independent microbial production systems, using *Ashbya gossypii* or *Bacillus subtilis*, coexist now for a decade and almost

**Correspondence:** Prof. Klaus-Peter Stahmann (klaus-peter.stahmann@hs-lausitz.de), Fachbereich Bio-, Chemie- und Verfahrenstechnik, Hochschule Lausitz (FH), Großenhainer Str. 57, 01958 Senftenberg, Germany

**Abbreviations:** MSM, mineral salts medium; pNPP, *p*-nitrophenylpalmitate

\*Current address: Romy Alisch, Departement für Infektiologie, Parasitologie, Universitätsklinikum Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 326, D-69120 Heidelberg, Germany

\*\*Current address: Anne Wuttke, Department of Medical Cell Biology, Uppsala University, Biomedical Centre, Box 571, SE-751 23 Uppsala, Sweden

**Table 1.** Five natural isolates, identified by ITS1 sequencing, were found to grow in mineral salts medium with nitrate as the sole nitrogen and plant oil as the sole carbon and energy source

Origin	Strain	ITS EMBL accession no.	Genus species	DSMZ accession no.	Optimum temperature/growth rate
Air	JS01	FN597575	<i>Pseudozyma</i> sp.	DSM 23899	23°C/n.d.
	JS02	FN597572	<i>Torrubiella</i> sp.	DSM 23900	23°C/3 mm/day
Compost	AW02	FN597571	<i>P. curvatum</i>	DSM 23903	30°C/2.5 mm/day
	JS04	FN597573	<i>G. candidum</i>	DSM 23901	26°C/6.5 mm/day
	JS05	FN597574	<i>M. circinelloides</i>	DSM 23902	28°C/17 mm/day

A further selectivity was reached by adjustment to pH 3. Radial growth was determined at different optimum temperatures. n.d. means not detectable because of weak surface growth. Strains were deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ).

completely replaced a chemical process because both are superior concerning ecological but, most important, economical reasons [3, 4]. In the case of L-lysine produced by *Corynebacterium glutamicum* the price for the substrate glucose plays an important role, forcing a German company to set up their production plants in countries where hydrolysis of starch allows the application of cheap glucose (Evonik in North America, 2009, Investor Relations). An alternative carbon source is plant oil. About 127 million tonnes were produced in 2007 [5]. An advantage in comparison to sugars is that high loads can be applied because they are not osmotically active.

These and many more processes are performed under sterile conditions. In a research laboratory sterile working is accepted and causes minor problems. In industrial scale insufficient sterility can become an insuperable hurdle. This was the case for the ethanol production with *Zymomonas mobilis* by Pfeifer and Langen in Germany, where lactic acid bacteria caused problems. Although productivity, yield and resistance against high ethanol concentrations of this bacterium are better, robustness of the *Saccharomyces cerevisiae* process was an advantage to hinder its replacement until today [6].

The minimal requirements for monoseptic applications are steel vessels causing high capital costs and limiting operation volumes below 1000 m<sup>3</sup>. For wastewater treatment or biogas production plants, running with self-selecting complex microbial communities, concrete basins with volumes in the range of 5000 m<sup>3</sup> are standard.

Although more than 90% of the heat needed to get a sterile medium can be recycled by counter-current systems this is another cost factor which plays a minor role for pharmaceutical products but might be the closing argument for microbial processes which are intended to replace petrochemistry for the generation of bulk chemicals from agricultural precursors.

The aim of the paper was the development of a possible new platform technology allowing the cultivation of fungi with a minimum of sterile technique. The first objective was the systematic analysis of selective conditions needed to run a monoseptic culture. Starting from a fungus known to grow in mineral salts medium additional selectivity was set up and natural habitats were screened for fungi that can grow under these conditions. Out of these isolates, the one with the most interesting properties was used for a scale-up from agar plates to a 350 L submerged culture performed in a rainwater barrel. Furthermore, the lipase activity of the most promising compost isolate was detected and proposed lipase proteins

were characterized concerning their subcellular localisation and isoelectric points.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Strains and cultivation conditions

*Botrytis cinerea* B05.10 wild type and its lipase deficient derivative *B. cinerea* *Δlip1* were kindly provided by Matthias Hahn [7]. Additionally five strains isolated from compost or air were used (Table 1). The strains JS04 and JS05 were isolated by suspending 5 g compost sample (Boxberg, Germany) in 40 mL 0.9% NaCl solution. Different dilutions of the suspension were streaked out on agar plates and incubated until growth was visible. Appearing colonies were further selected and cultivated. *Phialemonium curvatum* AW02 was isolated from a compost pile in Schipkau (Germany). A few particles were spread on agar plates and incubated at room temperature. The growing mixed cultures were incubated by a stepwise increase in the incubation temperature until only one microorganism was left over.

For the determination of mycelial growth of *B. cinerea* strains as well as for the isolation of the strains from compost a solid, modified mineral salts medium (MSM) with 18 mL rapeseed oil or soybean oil, 1.5 g KNO<sub>3</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.02 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.2 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> and 18 g agar per litre (pH 3) was used [8]. For submerged cultivation and isolation of microorganisms from the air only 9 g/L rapeseed oil or soybean oil were used in MSM. Cultivation of *B. cinerea* and the natural isolates was carried out at 21°C or optimal growth temperature (Table 1), respectively. Gas exchange was guaranteed by shaking at 120 rpm. Growth experiments to determine optimal temperature of the natural isolates were carried out with complex media (HA) containing 10 g yeast extract, 10 g glucose and 18 g agar per litre because MSM revealed no suitable contrast between medium surface and mycelium. Additionally for *P. curvatum* AW02 temperature optimum was determined using solid MSM containing 18 mL soybean oil per litre.

Inoculation of the plastic barrels was carried out by using a sporulated pre-culture of *P. curvatum* AW02. Therefore, fungus was cultivated in 100 mL MSM media exchanging rapeseed oil with 20 g/L glucose. Sporulation was finished after 3 days at 30°C and 120 rpm. The spores were counted with a Thoma-chamber and used as the inoculum.

## 2.2 Isolation of DNA and ITS sequencing

DNA extraction was done with the Illustra Tissue & Cells GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare).

PCR of the ITS region was performed with the primer pair LSU266 (5'-gca ttc cca aac aac tgc act c) and V9D (5'-tta cgt ccc tgc cct ttg ta). Sequence analysis was done with the internal primers ITS4 and ITS5 [9] using an automated sequencing system (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA).

The sequences of the ITS1 and ITS2 regions of the isolates were submitted to a BLASTn search (compares nucleotide similarities) by using the National Center for Biotechnology Information database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) or the database of the Centraalbureau voor Schimmelcultures ([www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl)) to find the next most closely related fungal species.

## 2.3 Determination of lipase activity by colorimetry

Lipase activity was determined by a colorimetric assay using *p*-nitrophenylpalmitate (pNPP) as the substrate. Substrate solution was freshly prepared in a ratio of solution A (30 mg pNPP dissolved in 10 mL isopropanol) to solution B (0.8 mg Triton X-100, 0.1 mg gum arabicum dissolved in 100 mL 0.1 M Tris-HCl pH 8) of 1:9. To initialise the reaction, 0.1 mL of enzyme suspension or solution was mixed with 0.9 mL of substrate solution. The release of *p*-nitrophenol ( $\epsilon = 12500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) after hydrolysis of pNPP was observed at 405 nm for 4 min using a spectrophotometer. One unit (U) was defined as the amount of enzyme needed to liberate 1  $\mu\text{mol}$  *p*-nitrophenol per minute under the previously described conditions [10].

## 2.4 Isoelectric focussing (IEF) and activity staining

IEF was carried out as described by Stahmann et al. [11]. The 5% polyacrylamide gel was completed with 0.6 mL ampholytes (SERVA, Heidelberg, Germany) per 10 mL gel ranging from pH 3–10. Subsequently, proteins were stained by Comassie brilliant blue R250 or esterase activity (caused by lipase) was visualized by incubation of the gel in a freshly prepared 1:1 mixture of solution A (20 mg  $\alpha$ -naphthyl acetate dissolved in 5 mL acetone and 45 mL 100 mM Tris/HCl, pH 7.5) and B (50 mg Fast Blue (Sigma) dissolved in 50 mL of the same buffer) until the colour of active bands changed dark brown [12, 13]. As positive control NOVAREKO (NovaBiotec<sup>®</sup> Dr. Fechter GmbH, Berlin), a *Thermomyces lanuginosus* lipase recombinantly produced by *Aspergillus oryzae* was used.

## 3 Results

### 3.1 Growth of air-borne microorganisms in open non-sterile shake flasks was delayed with rapeseed oil in comparison to glucose as the carbon source

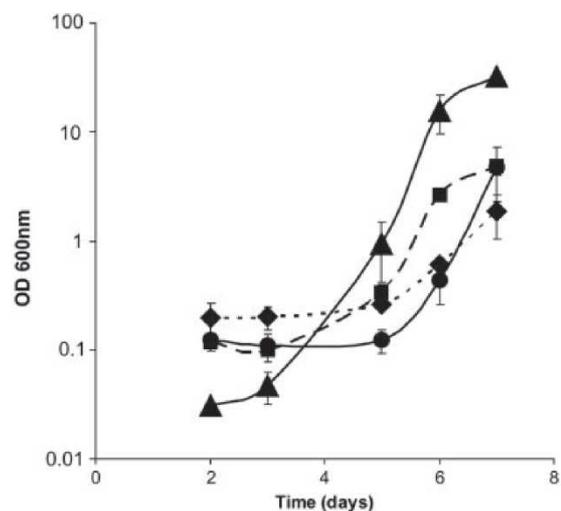
A systematic approach to develop a cheap and selective cultivation system was started with the choice of the nutrients. To

exclude a need for vitamins, only mineral salts with exception of the source of carbon and energy, were provided. Further selectivity was intended by the use of nitrate as the nitrogen source. Because aerobic catabolism is much more efficient concerning energy metabolism resulting in higher growth rates, aerobic conditions were chosen. Since only a small part of the known microorganisms produce lipases rapeseed oil was chosen as the carbon source.

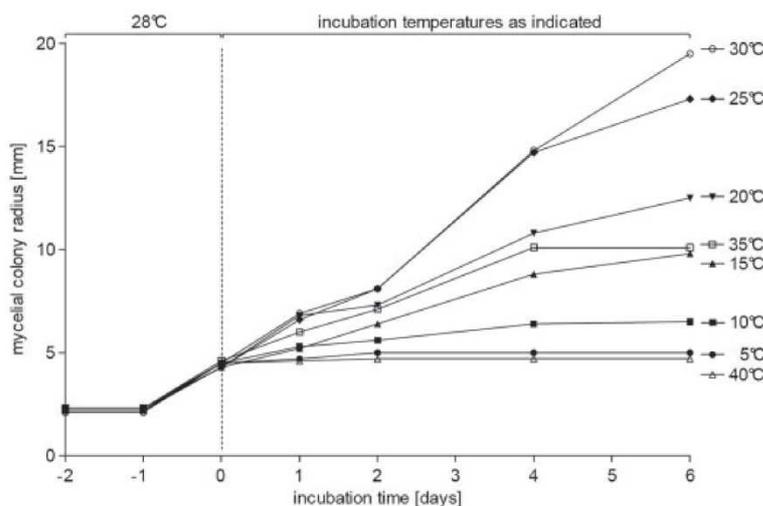
When these nutrients were dissolved in non-sterilized water and incubated in open shake flasks microbial growth, observed by an increase in extinction at 600 nm, occurred after 5 days (Fig. 1). A decrease in the pH from 7 to 3 postponed the increase in the optical density for 1 day. When the nitrate was replaced by ammonia the growth of unknown microorganisms started earlier. Fastest response and highest growth rate was observed when the rapeseed oil was replaced with glucose (Fig. 1). The air-borne microorganisms were always a mixture of bacteria and fungi. This was observed by microscopy and cultivation of dilutions on agar plates (data not shown).

### 3.2 Air-borne molds and fungal isolates from compost grew under selective conditions

The air-borne microbes which grew under full selectivity in the open shake flasks were transferred onto agar plates with the same medium. Two fungal strains, JS01 and JS02, were isolated by repeated dilution procedures. ITS sequencing identified them as *Pseudozyma* sp. and *Torrubiella* sp. (Table 1). Since both showed growth maxima at 23°C two further approaches were performed to get isolates with growth maxima at higher



**Figure 1.** Time course of air-borne microorganisms growing in open shake flasks loaded by different media without sterilisation. Response was determined at 600 nm at highest selectivity with mineral salts medium containing rapeseed oil as carbon and energy source. Furthermore, nitrate was used as the nitrogen source and pH 3 was adjusted (●). Reduced selectivity was obtained by replacing either lipid by glucose (▲) or nitrate by ammonia (■) or pH 3 by pH 7 (◆).



**Figure 2.** Increase in colony radius versus incubation time of *P. curvatum* AW02 at different temperatures on mineral salts medium agar plates containing soybean oil as the sole carbon source. *P. curvatum* AW02 was precultivated for two days at 28°C (day –2 until 0) and for six days at 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 or 40°C. Values representing incubation day –2 correspond to the radius of the applied inoculation drop. The experiment was performed with a double determination for each temperature. Values are given as mean. Scattering was <20%.

temperatures. A sample from compost was directly used to inoculate agar plates. Repeated transfer revealed two fungal strains with optima at 26 and 28°C called JS04 and JS05, respectively. ITS sequencing identified them as *Geotrichum candidum* and *Mucor circinelloides* (Table 1). Independently, a third approach was performed with a further compost sample. In this case, the agar plates with growing mixed cultures were incubated by a stepwise increase of the incubation temperature. At 34°C only AW02 was left over.

To evaluate the potential of AW02 as the human pathogen its temperature profile was investigated. The maximal radial growth rate on agar plates with minimal media containing soybean oil was 2.5 mm/day at 30°C (Fig. 2). Growth arrested after two days at 40°C. Same results concerning temperature growth optimum were obtained with complex media (data not shown).

ITS sequencing identified it as *P. curvatum*. A similarity of 100% to CBS 113274 and CBS 489.82 (accession numbers AY604837 and AY 464131, respectively) was found. The type strain of this species CBS 490.82 (AY 464127) differs by only two substitutions and a single insertion/deletion (data not shown). This result is in agreement with intra-species variation.

### 3.3 Hydrophilic spores of *P. curvatum* AW02

The preparation of a suitable inoculum for a 350 L submerged culture was much easier with *P. curvatum* AW02 than with *B. cinerea*. The first-mentioned strain was found to produce hydrophilic spores at high titres. More than  $10^8$  spores/mL were found in flask cultures with mineral salts medium using glucose as the carbon source (Table 2). *B. cinerea* is known to form microconidia but they do not germinate. The macroconidia are only formed on aerial hyphae and have a hydrophobic surface. To use them as inoculum a detergent has to be used to avoid sticking. *P. curvatum* AW02 spores did not stick

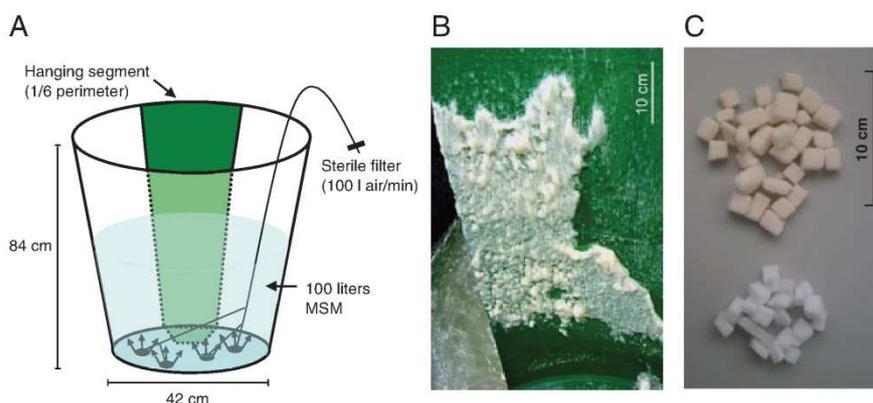
**Table 2.** *P. curvatum* AW02 produced hydrophilic spores in shaking flask culture with 100 mL minimal medium using glucose as carbon source. Means of two independent experiments were calculated.

Glucose	$\times 10^8$ spores/mL	Mean
<b>10 g/L</b>		
Experiment 1	4.6	
Experiment 2	3.3	3.9
<b>20 g/L</b>		
Experiment 1	3.4	
Experiment 2	5.1	4.2
<b>50 g/L</b>		
Experiment 1	3.4	
Experiment 2	7.7	7.6

together. After storage at –80°C in 30% glycerol about 60% germinated on agar plates with HA medium.

### 3.4 Robust growth of *P. curvatum* AW02 and lipase production in 100 or 350 L scale

To investigate feasibility in larger scale 100 or 350 L cultures were performed in 200 or 500 L plastic barrels, respectively. For gas exchange and convection of the rapeseed oil droplets 100 L air was bubbled through the culture per minute. Since AW02 was attaching to the plastic surface five wall segments cut out of a second 200 L barrel were hanged into the culture broth of the 100 L cultivation. After 5–8 days growth they were taken out to harvest the biofilm (Fig. 3). A second opportunity to harvest the biomass was to use about 1900 cubes (1 cm  $\times$  1 cm  $\times$  1 cm) made of BASOTECT™ (BASF Schwarzheide GmbH, Germany) as moving beds (Fig. 3) In 350 L scale again two support systems were used for the biofilm adherence. Either about 6000 cubes as moving beds (Fig. 3) or 12 vertical plastic boards with a rough surface were used for dividing the



**Figure 3.** Cultivation of *P. curvatum* AW02 in an open 200 L barrel. (A) For gas exchange and medium convection 100 L/min was pressed in over a sterile filter and was distributed by four frits. To harvest the biofilm six segments of a second barrel were hanged into 100 L mineral salts medium. (B) Photograph of the lower part of a segment showing adhering biofilm of *P. curvatum* AW02 after 5 days cultivation. (C) Photograph of fresh BASOTECT cubes (top) and cubes with adhering biomass (bottom).

**Table 3.** Robustness of *P. curvatum* AW02 lipase production was tested in eight cultures ran with 100 L plus five cultures ran with 350 L

Run No.	Culture volume (L)	pH titrated	Contamination	Activity (kU)	Total time
1 <sup>+</sup>	100	No	No	12	7 day
2 <sup>+</sup>	100	No	No	28	7 day
3 <sup>*/+</sup>	100	No	Yes	–	6 day
4 <sup>+</sup>	100	No	No	13	11 day
5 <sup>#</sup>	100	No	No	10	10 day
6 <sup>+</sup>	100	Yes	No	8	8 day
7 <sup>#</sup>	100	Yes	No	17	9 day
8 <sup>+</sup>	100	Yes	No	22	10 day
9 <sup>#</sup>	350	Yes	No	20	8 day
10 <sup>#</sup>	350	YES	No	8	5 day
11 <sup>#</sup>	350	Yes	No	12	7 day
12 <sup>+</sup>	350	Yes	No	6	8 day
13 <sup>+</sup>	350	Yes	No	18	11 day

The culture's pH was checked once per day. If pH 4 was reached a backtitration to pH 3 was performed by HCl. Bacterial contamination was checked by microscope. pNPP hydrolysing activity was calculated after representative samples were analysed. Cultivation was stopped when sporulation was observed by microscope. "No" contamination means clear culture filtrate and no bacterial cells visible by phase contrast microscopy.

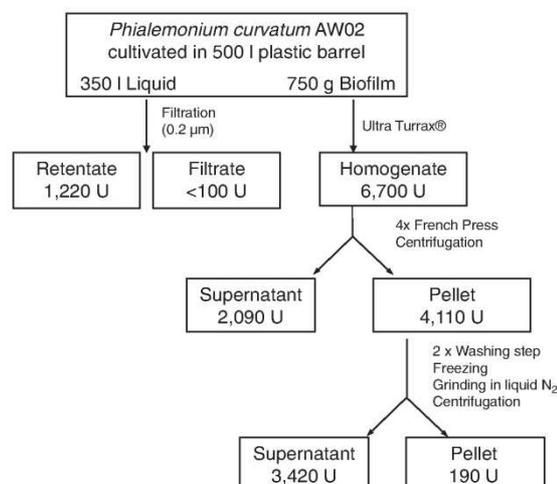
<sup>+</sup> Rough plastic segments/boards as growth support

<sup>#</sup> porous plastic cubes as growth support

\*culture medium was supplemented additionally with 1 g/L glucose.

barrel into 13 narrow compartments (not shown). Robustness became evident after running these two systems over a period of 3 years with different persons. Only one run showed a bacterial contamination because the pH was not maintained between 3 and 4 so that it increased to pH 7. In addition, 1 g/L glucose had been added to the culture broth with the idea to shorten the running time (Table 3).

Determination of biomass was not possible, when moving beds were used as the support. In the case of harvested biofilms 180–300 g/100 L were determined as dry mass. Scattering and overestimation is high because lipid droplets were adhering to the biomass.

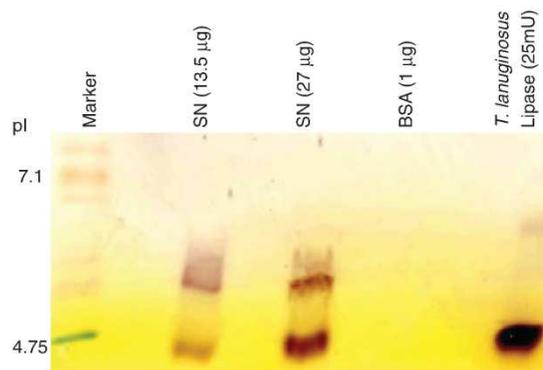


**Figure 4.** Distribution of lipase activity liberated from the *P. curvatum* AW02 cells by mechanical shear stress. The microorganism was cultivated in a 500 L plastic barrel with rapeseed oil as the carbon and energy source. A wet mass of 750 g biofilm was harvested by scratching from the hanging segments. Activity was measured by following pNPP hydrolysis with suspended cells, cell debris or supernatants.

The determined lipase activity varied between 6 kU/350 L and 28 kU/100 L. Such a high variation is often observed with wild-type strains. This was supported by the found time periods between 5 days and 11 days until sporulation was observed.

### 3.5 Shear stress liberated two lipases from *P. curvatum* AW02 cell wall

When cultivated in a plastic barrel 85% of the lipase activity was found to be associated with the biofilm, thereby more than 98% are bound to the mycelium (Fig. 4). If shaking flasks with two baffles were used 95% of the activity was liberated but



**Figure 5.** Activity staining of *Phialemonim curvatum* AW02 lipases liberated from cell wall by shear stress as shown in Fig. 4 and separated by analytical isoelectric focussing. IEF calibration standard proteins: human hemoglobin C, pI 7.5; human hemoglobin A: pI 7.1; Equine myoglobin: pI 6.8; phycocyanin: pI 4.75; (1) 13.5 µg and (2) 27 µg proteins liberated by grinding cells with liquid nitrogen; (3) 1 µg bovine serum albumin and (4) 25 mU NOVARECO lipase served as the negative or positive control, respectively.

concentration of the culture supernatant by lyophilisation or ultrafiltration led to a complete loss of activity (data not shown).

After four French press passages and grinding the cell debris with liquid nitrogen 95% of lipase activity was liberated (Fig. 4). Liberation of the lipases by washing the cell debris with NaCl, NaOH or SDS as well as with cell wall-degrading enzymes failed (data not shown). A first characterisation of the lipase proteins was performed by analytical isoelectric focussing. Two bands at pH 4.7 and pH 5.6 appeared by activity staining (Fig. 5).

### 3.6 *Botrytis cinerea* used soybean oil as the sole source of carbon and energy

To compare lipase activity and growth of the new isolates with a well-characterised fungus, two strains of *B. cinerea* were investigated. The wild type was known to grow in the used mineral salts medium but with glucose as the sole carbon source and at pH 5 [8]. Since the fungus grew on the agar plates with soybean oil at full selectivity in a way that a colony diameter was not reliably detectable submerged cultures in shake flasks were performed. The wild-type strain produced up to 0.8 g biomass/100 mL. In the culture supernatant between 0.4 and 1.5 U hydrolase activity was detectable with pNPP. A *lip1* mutant [7] showed reduced biomass formation (0.1 g/100 mL). Although lipase activity was below the detection limit (<0.1 U) significant growth was observed.

## 4 Discussion

Microbial production of many proteins, fine chemicals, antibiotics or organic acids is economically efficient but many

species applied today appear suboptimal concerning cultivation conditions. Three aspects, complex nutrients, pH and the use of suspended cells will be in the focus.

Two economically successful processes that run with complex nutrients although the products, amino acids or vitamin B<sub>2</sub>, are sold at a price where cultivation technique has a significant impact are discussed. In amino acid production by *C. glutamicum* e.g. L-glutamate excretion is initiated by a limitation in biotin, which cannot be synthesized by the bacterium. L-lysine-producing strains are auxotrophic for e.g. methionine down-regulating the wished pathway. Although needed in tiny concentration they are a cost factor. The advantage is that these compounds are qualitatively and quantitatively known. Concerning riboflavin biosynthesis using *A. gossypii* yeast extract supplementation is needed to get a suitable growth. Whether one or more compounds are needed is unknown. This fact bears the risk that the process is compromised if the quality of the complex nutritional source changes. A scattering in productivity caused by a new charge of complex nutrient cannot be explained.

*B. cinerea* was known to grow on mineral salts medium using glucose as the sole source of carbon and energy. The β-glucan production by this fungus was not brought to industrial application yet. This paper shows for the first time that *B. cinerea* can grow on mineral salts medium with rapeseed oil as the sole source of carbon and energy. Its extracellular hydrolysis can be explained by a lipase purified and characterized previously [14]. The reduced growth of the mutant deleted in its gene shows that the *lip1*-encoded enzyme is the major lipase and that at least one further isoenzyme encoded by a separate gene must exist in the genome. A first screening in the genome database gave several hits (data not shown).

The results obtained with the *B. cinerea* strains make the results obtained for the five isolates feasible. Omnipotent anabolism is not questionable but the number of elements used here is low. The water used in this study was purified by reverse osmosis and should therefore contain < 10 mg/L sodium. Since biomass productions were low in the plastic barrel, experimental series with different sodium concentrations could be a point of further investigations. The same is true for other trace elements like molybdenum. Molybdenum might be more interesting because nitrate reductase of *Aspergillus* mutants depends on molybdenum cofactor [15]. Sodium was found to play a role in flagellar motors of *Vibrio alginolyticus* [16]. But in edible mushrooms its content was three orders of magnitudes lower in comparison to potassium [17] and a function of sodium in the fungal metabolism was not described yet.

Acidic conditions are capable rather by fungi than by bacteria. Everybody knows that yoghurt or sauerkraut acidified by lactic acid bacteria to pH 3–4 is relatively safe against other bacteria. A well-known example for fungi not only tolerant to lower pH but producing e.g. citric acid is *Aspergillus niger*. Neither the mechanism of resistance nor its effect on acid production is understood although all classical and even systemic analytical approaches were tried [18]. All companies applying microbial production processes in technical scale try to get high product concentrations. In most cases this means high biomass concentrations e.g. for *E. coli* producing a

recombinant protein more than 100 g/L. For suspended cells this causes problems in gas exchange so that high stirring velocities are needed. The latter make efficient cooling systems necessary. The systems used in this study for *P. curvatum* AW02 worked with the alternative of biofilms. The formation of single-species biofilms was shown for more than 90% of investigated microorganisms interesting for industrial applications [19]. In the biofilm layer biomass density is in the maximum but the surrounding medium has low viscosity. The applied airlift system for convection kept shear stress low because that could liberate many complex compounds from disintegrated cells disturbing the selectivity of the mineral salts medium.

The selective system developed in this work led to the isolation of five fungi. Three arguments encouraged to further investigations with *P. curvatum* AW02, hydrophilic spores, generation of these spores in submerged culture at high titers and biofilm formation.

The genus *Phialemonium* was first described by Gams and McGinnis in 1983 as inhabitant of air, soil, industrial water and sewage [20]. These species rarely cause human infection and if they do, only immunocompromised patients are involved [21, 22]. In the majority of these cases the skin's natural barrier of the patient was compromised. Therefore, localized infections of the skin and the soft tissues are the most common form caused by these fungi. Antifungal treatment is possible using voriconazole and posaconazole. Not more than twenty cases have been reported in the international literature since its first description [23]. Thus, the number of these cases is smaller than that reported for *S. cerevisiae* [24]. Concerning optimal growth temperature *P. curvatum* AW02 is comparable with *S. cerevisiae* because growth was better at 25°C than at 35°C. In contrast, as growth optimum for the severe human pathogenic *Candida albicans* a temperature optimum of 33°C was reported [25].

More than 10<sup>8</sup> spores/mL were produced in submerged cultures of *P. curvatum* AW02. Since the increase in titer was weak when glucose was increased from 10 to 20 g/L but higher when 50 g/L glucose were used probably an overlapping effect e.g. of osmo stress might play a role. To find a titer maximum or optimum would be time consuming and an explanation difficult.

The lipase proteins liberated by crude shear stress from the cells of *P. curvatum* AW02 might be interesting because they are active at low pH. The type of wall-association is unclear. Many enzymes are known to stick strongly at the cell's surface [26]. A cell wall-associated lipase of *G. candidum* was characterized concerning kinetic properties but not in relation to its linkage to the cell surface [27].

The process described here will not be sufficient for a direct application in commercial lipase production. Decades of development of recombinant strains revealed high titers and high productivity. *E. coli* strains co-expressing a modified chaperone were found to produce 314 000 U/g wet biomass in short time [28]. Fungi, e.g. the yeast *Pichia pastoris* [29] or the filamentous ascomycete *A. niger* [30] are reported to secrete 12 500 kU/L or 1.6 kU/g dry biomass/h, respectively. The *P. curvatum* AW02 lipase titer of 34–170 U/L is in the range of described wild-type isolates [31]. Concerning productivity

(43–122 U/g wet biomass) an improvement of three orders of magnitude is needed to become competitive.

The process developed here can be used in two ways. Either a variant of already used strains, growing under the described selective conditions is applied, or one of the reported or another new isolate might be improved by genetic engineering. The first step for the latter approach will be a classification of *P. curvatum* concerning security classes. The open cultivation system has to be adapted to the rules for contained use of genetically modified organisms.

*This work was supported by two Zielvereinbarungen with the Government of the Land Brandenburg. The authors are grateful to Janine Schubert and Ringo Püschel for technical assistance.*

*The authors have declared no conflict of interest.*

## 5 References

- [1] Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J. L., Vázquez, E., Villaverde, A., Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb. Cell Fact.* 2009, 8, 17.
- [2] Martens, J. H., Barg, H., Warren, M. J., Jahn, D., Microbial production of vitamin B<sub>12</sub>. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 58, 275–285.
- [3] Stahmann, K. P., Revuelta, J. L., Seulberger, H., Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 53, 509–516.
- [4] Hohmann, H. P., Stahmann, K. P., Biotechnology of Riboflavin Production, in: Mander, L., Lui, H. W., (Eds) *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology, Vol 7*, Elsevier, Oxford 2010, pp. 115–139.
- [5] van Beilen, J. B., Transgenic plant factories for the production of biopolymers and platform chemicals. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 2008, 2, 215–228.
- [6] Yang, S., Land, M. L., Klingeman, D. M., Pelletier, D. A. et al., Paradigm for industrial strain improvement identifies sodium acetate tolerance loci in *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 10395–10400.
- [7] Reis, H., Pfiffi, S., Hahn, M., Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 2005, 6, 257–267.
- [8] Pielken, P., Stahmann, K. P., Sahm, H., Increase in glucan formation by *Botrytis cinerea* and analysis of the adherent glucan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990, 33, 1–6.
- [9] White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. in: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J., (Eds) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA 1996, pp. 315–322.
- [10] Winkler, U. K., Stuckmann, M., Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of

- exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 1979, 138, 663–670.
- [11] Stahmann, K. P., Böddecke, T., Sahm, H., Regulation and properties of a fungal lipase showing interfacial inactivation by gas bubbles, or droplets of lipid or fatty acid. *Eur. J. Biochem.* 1997, 244, 220–225.
- [12] Bornscheuer, U. T., Kazlauskas, R. J. (Eds) *Hydrolases in Organic Synthesis*, 2nd Edn, Wiley, Weinheim 2003.
- [13] Torossian, K., Bell, A. W., Purification and characterisation of an acid-resistant triacylglycerol lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1991, 13, 205–211.
- [14] Comménil, P., Belingheri, L., Sancholle, M., Dehorter, B., Purification and properties of an extracellular lipase from the fungus *Botrytis cinerea*. *Lipids* 1995, 30, 351–356.
- [15] Unkles, S. E., Smith, J., Kanan, G. J., Millar, L. J. et al., The *Aspergillus nidulans* cnxABC locus is a single gene encoding two catalytic domains required for synthesis of precursor Z, an intermediate in molybdenum cofactor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 28381–28390.
- [16] Fukuoka, H., Wada, T., Kojima, S., Ishijima, A. et al., Sodium-dependent dynamic assembly of membrane complexes in sodium-driven flagellar motors. *Mol. Microbiol.* 2009, 71, 825–835.
- [17] Moura, P. L. C., Maihara, V. A., de Castro, L. P., Figueira, R. C. L., Essential trace elements in edible mushrooms by neutron activation analysis. *Proceedings of the 2007 International Nuclear Atlantic Conference – INAC 2007*.
- [18] Andersen, M. R., Lehmann, L., Nielsen, J., Systemic analysis of the response of *Aspergillus niger* to ambient pH. *Genome Biol.* 2009, 10, R47.
- [19] Li, X. Z., Hauer, B., Rosche, B., Single-species microbial biofilm screening for industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 76, 1255–1262.
- [20] Gams, W., McGinnis, M. R., *Phialemonium*, a New Anamorph genus intermediate between *Phialophora* and *Acremonium*. *Mycologia* 1983, 75, 977–987.
- [21] Heins-Vaccari, E. M., Machado, C. M., Saboya, R. S., Silva, R. L. et al., *Phialemonium curvatum* infection after bone marrow transplantation. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2001, 43, 163–166.
- [22] Proia, L. A., Hayden, M. K., Kammeyer, P. L., Ortiz, J. et al., *Phialemonium*: an emerging mold pathogen that caused 4 cases of hemodialysis-associated endovascular infection. *Clin. Infect. Dis.* 2004, 39, 373–379.
- [23] Rivero, M., Hidalgo, A., Alastruey-Izquierdo, A., Cía, M. et al., Infections due to *Phialemonium* species: case report and review. *Med. Mycol.* 2009, 47, 766–774.
- [24] Enache-Angoulvant, A., Hennequin, C., Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clin. Infect. Dis.* 2005, 41, 1559–1568.
- [25] Lemos-Carolino, M., Madeira-Lopes, A., van Uden, N., The temperature profile of the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Z. Allg. Mikrobiol.* 1982, 22, 705–709.
- [26] Rast, D. M., Baumgartner, D., Mayer, C., Hollenstein, G. O., Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry*. 2003, 64, 339–366.
- [27] Hlavsová, K., Zarevúcka, M., Wimmer, Z., Macková, M. et al., *Geotrichum candidum* 4013: extracellular lipase versus cell-bound lipase from the single strain. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2009, 61, 188–193.
- [28] Quyen, D. T., Schmidt-Dannert, C., Schmid, R. D., High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid *in vitro* refolding. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65/2, 787–794.
- [29] Yu, M., Lange, S., Richter, S., Tan, T. et al., High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Protein Expr. Purif.* 2007, 53, 255–263.
- [30] Prathumpai, W., Flitter, S. J., McIntyre, M., Nielsen, J., Lipase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* expressing a lipase-encoding gene from *Thermomyces lanuginosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 65, 714–719.
- [31] Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stöcklein, W., Menge, U., Schmid, R. D., Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1994, 1214, 43–53.

## **7.2 Original Publikation:**

### **Dry entrapment of enzymes by epoxy or polyester resins hardened on different solid supports**

**Reprinted from Enzyme and Microbial Technology Vol. 60  
Barig S., Funke A., Merseburg A., Schnitzlein K., Stahmann K.-P.**

**Dry entrapment of enzymes by epoxy or polyester resins  
hardened on different solid supports,  
47-55 (2014)**

**with permission from Elsevier.**



## Dry entrapment of enzymes by epoxy or polyester resins hardened on different solid supports



Susann Barig<sup>a,\*</sup>, Andreas Funke<sup>a,1</sup>, Andrea Merseburg<sup>a,2</sup>, Klaus Schnitzlein<sup>b</sup>, K.-Peter Stahmann<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Brandenburg University of Technology Cottbus – Senftenberg, Fakultät 6, Großenhainer Str. 57, D-01958 Senftenberg, Germany

<sup>b</sup> Brandenburg University of Technology Cottbus – Senftenberg, Fakultät 4, Universitätsplatz 3-4, D-03046 Cottbus, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 November 2013

Received in revised form 6 March 2014

Accepted 29 March 2014

#### Keywords:

Immobilization

Epoxy resin

Polyester resin

*Thermomyces lanuginosus* lipase

*Ashbya gossypii* threonine aldolase

Cross linked enzyme aggregates

### ABSTRACT

Embedding of enzymes was performed with epoxy or polyester resin by mixing in a dried enzyme preparation before polymerization was started. This fast and low-cost immobilization method produced enzymatically active layers on different solid supports.

As model enzymes the well-characterized *Thermomyces lanuginosus* lipase and a new threonine aldolase from *Ashbya gossypii* were used. It was shown that *T. lanuginosus* lipase recombinantly expressed in *Aspergillus oryzae* is a monomeric enzyme with a molecular mass of 34 kDa, while *A. gossypii* threonine aldolase expressed in *Escherichia coli* is a pyridoxal-5'-phosphate binding homotetramer with a mass of 180 kDa.

The enzymes were used freeze dried, in four different preparations: freely diffusing, adsorbed on octyl sepharose, as well as cross-linked enzyme aggregates or as suspensions in organic solvent. They were mixed with standard two-component resins and prepared as layers on solid supports made of different materials e.g. metal, glass, polyester. Polymerization led to encapsulated enzyme preparations showing activities comparable to literature values.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Immobilization is an opportunity to increase the half-life of enzymes, to re-use the biocatalyst and furthermore to enable a long-term processing. Additionally, fixed biocatalysts show improved long-term performance under optimal chemical synthesis conditions, e.g. in organic solvents, at higher temperature or extreme ionic strength. Therefore, immobilization can lower the costs for enzymes in industrial application [1–5].

In the last decades new immobilization methods were established as well as new matrices were applied to modify enzyme characteristics and optimize immobilization yield. Combining for example the geometry, as well as physical and chemical

properties of a support of a resin can change the properties of an enzyme in the desired way. Meso- and macroporous resins based on polystyrene [6], methacryl [7], or epoxide [8], can be functionalized by different groups to introduce ionic, hydrophobic or absorptive interactions. Furthermore, covalent immobilization can be realized using glyoxyl- [9], epoxy- [7] or glutaraldehyde [10] groups. In general, these resins are used in a porous bead-based form where pore size can be altered appropriate to the molecular size of the enzyme and the substrate/product as well as providing a hydrophilic and protective environment inside pores or fissures [3,11]. Concerning the method of entrapment, such inorganic or organic polymeric substances have also been used for enzyme [12] and cell [8] immobilization too.

Approximately 80% of industrial processes using immobilized enzymes make use of hydrolases [13]. In particular, lipases are used in the detergent, food, leather, textile, oil and fat, cosmetic, paper, and pharmaceutical industries [14]. Lipases are hydrolytic enzymes cleaving or synthesizing ester-bonds preferentially at an interface of long-chain ( $\geq 10$  carbon atoms) triacylglycerols. The high interest level of industry depends on the wide range of properties of lipases such as positional specificity, fatty acid specificity, thermal stability, and activity in organic solvents [15]. One prominent representative

\* Corresponding author at: Fakultät 6, BTU Cottbus – Senftenberg, Großenhainer Str. 57, 01958 Senftenberg, Germany. Tel.: +49 3573 85 935 801; fax: +49 3573 85 809.

E-mail addresses: [susann.barig@hs-lausitz.de](mailto:susann.barig@hs-lausitz.de), [sbarig@hs-lausitz.de](mailto:sbarig@hs-lausitz.de) (S. Barig).

<sup>1</sup> Present address: IDT Biologika GmbH, Am Pharmapark, 06861 Dessau-Rosslau, Germany.

<sup>2</sup> Present address: DZNE Research Team, Experimental Neurophysiology (ENP), University Cologne, Joseph-Stelzmann-Str. 20, 50931 Cologne, Germany.

with a broad application spectrum is the *Thermomyces lanuginosus* Lipase (TLL), recombinantly produced in *Aspergillus oryzae*. Due to its robustness, well-studied structure and kinetics it is already industrially applied as a soluble as well as immobilized enzyme [16].

Beside hydrolases, oxidoreductases and lyases are found in industry [17]. In the production of  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acids (L-threonine, L-serine and 3-hydroxyproline), which are precursors for active substances in the pharmaceutical (e.g. anti-cancer drugs, antibiotics and immunosuppressors) and agrochemical industries, L-threonine aldolase (TA) using pyridoxal-5'-phosphate (PLP) as a cofactor is of interest. The enzyme catalyzes L-threonine cleavage into glycine and acetaldehyde as well as the reverse that means CC coupling reactions [18,19]. Overexpression of TA in the filamentous fungus *Ashbya gossypii* leads to an increase in glycine production, which in turn increases riboflavin production [20]. Immobilization of TA has already been achieved on several carriers such as Eupergit CM [21].

The potential of enzyme immobilization is under-utilized due to several drawbacks such as the time-intensive laborious development of an appropriate immobilization method, cost-intensive materials and limited enzyme load. In the present study an enzyme entrapment method was developed for immobilizing water-free enzyme preparations, either lyophilized or suspended in an organic solvent. The water dry enzyme molecules were mixed with standard polymeric glue based on either polyester or epoxy. Supports differing in chemical composition and geometry were coated with the enzyme/polymer mix. After polymerization these enzyme reaction units could be used for activity assays. Two very different enzymes were applied, namely the recombinant TLL and the TA from *A. gossypii* expressed in *E. coli*. Enzyme characterization showed their differences in structure and size as well as cofactor dependence. TLL was used as a model to compare different immobilization methods including the new dry entrapment. The immobilisates were analyzed with respect to enzyme activity recovery and their activity towards different substrates. With respect to show broader prospective application, TA was applied to the dry entrapment method analyzing both enzyme activity and recovery.

The received results confirm the development of a new immobilization method that is easy to apply to very different enzymes on varying supports. The dry entrapment needs no specific design of support material or enzyme and is therefore time- and cost-saving.

## 2. Methods

### 2.1. Enzymes

As models for the newly developed immobilization method, two very different enzymes were used and characterized: the NOVAREKO (NovaBiotec® Dr. Fechter GmbH, Berlin) preparation, a *T. lanuginosus* lipase (TLL) recombinantly produced by *A. oryzae*, and *A. gossypii* threonine aldolase (TA) recombinantly produced in *Escherichia coli*.

#### 2.1.1. Threonine aldolase overexpression and purification

The *GLY1* (gene accession number: AJ005442) gene encoding the TA was amplified using the matrix Yep352GB07-1, a *Saccharomyces cerevisiae*/*E. coli* shuttle vector including parts of the genomic library of *A. gossypii*. Primers were constructed according to Monschau et al. [20] with some changes to introduce additional restriction sites for *BsaI* to ensure easy cloning into pASK-IBA43 (IBA, Germany), a commercial expression vector for *E. coli*. The amplicon was purified and inserted into this vector following manufacturer instructions. The integration into *E. coli* BL21 was carried out by heat shock generating the *E. coli* BL21 pAF *Gly1* strain. The expression of TA fused C-terminal to a Strep-tag was induced by the addition of anhydrotetracycline as described in the customer instructions of IBA (Germany). After French Pressing the cell pellet the cleared supernatant was applied to a Strep-Tactin column for purification (IBA, Germany).

#### 2.1.2. Determination of molecular mass

The molecular mass of the enzyme preparations was determined by denaturing sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE).

#### 2.1.3. Chromatographic methods

Purification of TLL was carried out by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) using Q-Sepharose. The main elution fractions bearing lipase activity were pooled and applied to size exclusion chromatography. For this purpose Sepharose G-100 beads (Pharmacia, Sweden) were used in a 0.05 M Tris-acetate buffer, pH 7.5, containing 0.1 M NaCl with a flow rate of 18 ml/h. Fractions of 2.3 ml were collected and analyzed by UV spectroscopy and lipase activity determination. Bovine serum albumin (69 kDa), carbonic anhydrase (28.8 kDa), and cytochrome c (12.4 kDa) were applied as standard molecules in a separate run on the column.

For size determination and analysis of the quaternary structure of TA from *A. gossypii*, a sepharose G-100 bead column in 0.05 K/Na-Phosphate buffer pH 7.0 and 0.3 M NaCl at a flow rate of 10 ml/h was used. Fractions of 2 ml were collected and analyzed by UV spectroscopy at 280 nm; additionally, enzyme activity was determined. Standard molecules were mixed with the TA preparation and run in the same performance (alkoholdehydrogenase (150 kDa); albumin from chicken egg (45 kDa); cytochrome c (12.4 kDa)).

#### 2.1.4. Pyridoxal-5'-phosphate dependence

An important co-factor in amino acid synthesis and degradation is pyridoxal-5'-phosphate (PLP). To analyze if the TA of *A. gossypii* is dependent on PLP an absorption spectrum of the enzyme solution between 300 nm and 650 nm was carried out. Enzyme activity was measured in the presence and absence of PLP.

#### 2.1.5. Isoelectric focusing (IEF) and activity staining

To determine the isoelectric point of recombinant TLL, IEF was carried out as described by Stahmann et al. [22]. The 5% (v/v) polyacrylamide gel was completed with 6% (v/v) ampholytes ranging from pH 3 to 5 (Serva, Germany). Subsequently, the proteins were either stained with Coomassie brilliant blue R250 or esterase activity was visualized as described by Barig et al. [23].

#### 2.1.6. Enzyme activity and concentration

For each experiment a minimum of two separate trials was carried out, determining the mean value for presentation. If more than two individual experiments were done the standard deviation is indicated.

Lipase activity was determined by colorimetric assay using *para*-nitrophenyl palmitate (pNPPalm) as substrate as previously described by Barig et al. [23]. To show hydrolytic activity on short chain molecules, *p*-nitrophenyl propionate (pNPPProp) was applied. To this end, 10  $\mu$ l of solution A (7.8 mg pNPPProp in 1 ml 100% ethanol) and 990  $\mu$ l of solution B (0.1 M Na-Phosphate buffer pH 7.4) were mixed with 100  $\mu$ l of enzyme solution and the released *p*-nitrophenol was analyzed spectrophotometrically at 405 nm for 4 min at 30 °C. One unit (U) was defined as the amount of enzyme needed to liberate 1  $\mu$ mol *p*-nitrophenol ( $\epsilon = 12,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) per minute under the previously described conditions.

Lipase activity on natural substrates was determined by titrimetry using the autotitrator TIM 854 Titration Manager (Radiometer Analytical S.A., France). For this purpose, the substrate solution (0.5 g gum arabicum, 20 ml 0.9% NaCl solution, 3 ml H<sub>2</sub>O, 400  $\mu$ l substrate, e.g. rape seed oil, triolein, tributyrin) was dispersed with Ultraturax® for 30 s at 12,500 rpm and the pH was set at 7. The solution was stirred at 400 rpm and reaction was initiated by the addition of 1 ml of enzyme solution. Free fatty acids were continuously titrated by 10 mM NaOH. One unit (U) was determined as the amount of enzyme needed to liberate 1  $\mu$ mol of free fatty acid per minute.

TA activity was determined either spectrophotometrically using the substrate analogue phenylserine or by high-performance liquid chromatography (HPLC) determining the amount of released glycine from threonine as described by Monschau et al. [24]. For spectrophotometric detection the substrate solution was composed of 0.9% DL-threo- $\beta$ -phenylserine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) and 0.05 mM pyridoxal-5'-phosphate (PLP) (Sigma, Germany) in 250 mM HEPES/NaOH buffer pH7. Reaction was performed by mixing 980  $\mu$ l of pre-heated (28 °C) substrate solution intensively with 20  $\mu$ l enzyme solution. The release of benzaldehyde ( $\epsilon = 1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) was detected by spectrophotometric measurement at 279 nm for a period of 15 min at 28 °C. One unit (U) was defined as the amount of enzyme needed to liberate 1  $\mu$ mol of benzaldehyde per minute [25].

Protein concentration was determined by the method of Bradford [26].

### 2.2. Immobilization

Different immobilization methods were carried out to compare or combine them with the newly developed dry entrapment method.

#### 2.2.1. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)

The TLL was immobilized by forming enzyme aggregates and subsequent cross-linking with glutaraldehyde as described by Lopez-Serrano et al. with some variations [27]. For a single preparation of cross-linked TLL, 0.5 ml lipase solution was mixed with 0.875 ml 0.1 M Na-Phosphate buffer pH 7, 0.125 ml of a 50 mg/ml SDS solution and 1 ml of 55% ammonium sulfate in the same buffer system. These components were stirred for 2 h at room temperature to ensure precipitation. To cross-link the aggregated lipase, 4  $\mu$ l of 50% glutaraldehyde were added and stirred overnight at 4 °C. Three washing steps using ddH<sub>2</sub>O ensured removal of the reacting agents. The CLEAs were suspended in 5 ml ddH<sub>2</sub>O and stored at 4 °C.

### 2.2.2. Octyl sepharose

Lipase was immobilized using octyl sepharose CL 4B (GE Healthcare, Great Britain) according to Bastida et al. [28].

### 2.2.3. Dry entrapment

TLL was applied to this method as a dry dispersible lyophilized material previously adsorbed on octyl sepharose, either immobilized by formation of cross linked enzyme aggregates (CLEAs) or not immobilized as single molecules. A second way to apply the lipase in this method was dispersion in acetone; the aggregated enzymes were finely distributed in the organic solvent. Application of TA to the dry entrapment method was carried out using lyophilized enzyme molecules.

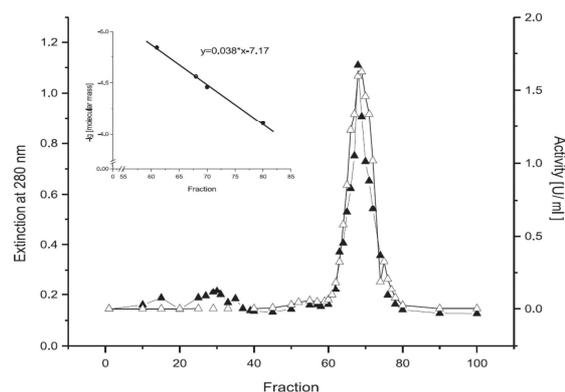
The dry or acetone dispersed enzyme material was mixed with two different standard polymeric glues, first with epoxide resin (Firma Martin Pauck, Germany) and second with polyester resin (Nigrin, Germany). The polymerization component was added and the mixture was either sprayed or spread on the support material, e.g. metal or polyester mesh. Polymerization was allowed to proceed for two days and enzyme units were analyzed. A mechanical post-processing was also realized by grinding with abrasive paper.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Recombinant *Thermomyces lanuginosus* Lipase – a monomeric enzyme

Because of its published in-depth characterization and robustness, *T. lanuginosus* Lipase (TLL) was chosen as the first model enzyme for immobilization. The purchased TLL showed a molecular mass of 34 kDa in denaturing SDS PAGE. The purity was estimated to be 90% (data not shown). Isoelectric focusing was applied to TLL to identify active protein species. Several bands between *pI* 4.2 and 4.8 were determined for TLL, which showed a main band at *pI* 4.2. In parallel, a second gel was prepared and stained by esterase activity staining. Thereby, two major activity bands were determined at *pI* 4.2 and 4.4 (see Figure I in supplement data). Comparing these results to literature data it was already clear that there are several differences between native and recombinant TLL. Native TLL was shown to have a molecular mass of 39 kDa and a *pI* of 6.6 [29]. According to the polypeptide sequence derived from the gene the molecular mass was calculated to be 31.7 kDa [30]. Differences in molecular mass between native and recombinant TLL, despite having identical DNA sequences, had already been observed by Boel and Høge-Jensen, who first carried out heterologous expression of TLL. The distinctions are explained by the extent of glycosylation and different sugar residues using different host microorganisms. Furthermore, *A. oryzae* prefers N-glycosylation; therefore, a loss of potential positively charged amino acid residues is initiated, changing, in turn, the overall charge, as mentioned by Boel and Høge-Jensen [31].

To purify the enzyme a Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) was performed. The fractions of the main elution peaks obtained by FPLC were pooled and applied to size exclusion chromatography. The goal was to analyze the quaternary structure of the lipase. Fig. 1 shows the eluted fractions analyzed by measuring the extinction at 280 nm and the lipase activity by pNPP assay. The main elution peak corresponds to the main activity. Calibration with the standard molecules revealed a molecular mass of 36 kDa for TLL. A single elution peak indicates a monomeric enzyme under the chosen conditions. Omar et al., who investigated native TLL, revealed similar results [29]. In contrast, Palomo et al. showed by size exclusion chromatography that recombinant TLL has a strong tendency to form dimers. Low concentrations of TLL (44 µg/ml) and the addition of detergents finally produced a monomeric molecule [32]. Enzymes are known to be dependent on the nature of the ions in their environment and the ionic strength. One major difference between the experiments of Palomo et al. and the presented results, as well as the results from Omar et al., is the chosen buffer system. The latter used a Tris system whereas the first used a phosphate buffer system [29,32]. Increasing phosphate salts were shown to have a positive effect on lyophilized TLL by analyzing esterification



**Fig. 1.** Active superstructure of *T. lanuginosus* Lipase analyzed by size exclusion chromatography. The fractions obtained by size exclusion chromatography of *T. lanuginosus* Lipase (TLL) were analyzed by UV spectroscopy at 280 nm (▲). The lipase activity (Δ) peak using a *p*-nitrophenyl palmitate assay corresponds to the main protein peak. Inset: Calibration of the column by standard molecules (●) in a separate run allowed calculation of 36 kDa as the molecular mass of the TLL (○). Standards: albumin from bovine serum (69 kDa), carbonic anhydrase (28.8 kDa), and cytochrome *c* (12.4 kDa).

of an alcohol and a fatty acid in organic solvents. It could be that the phosphate acts as an immobilization scaffold or supports the open conformation of TLL [33]. The latter would agree with the findings of Palomo et al., who hypothesized that lipases dimerize face to face with their active sides due to hydrophobic interactions [29]. Therefore, dimerization of lipases has to be evaluated in the context of the experimental background.

### 3.2. Characterization of *Ashbya gossypii* threonine aldolase as pyridoxal phosphate depending homotetramer

As a second test enzyme a C–C-bond breaking enzyme, the *A. gossypii* threonine aldolase (TA), possessing a more complex superstructure, was chosen.

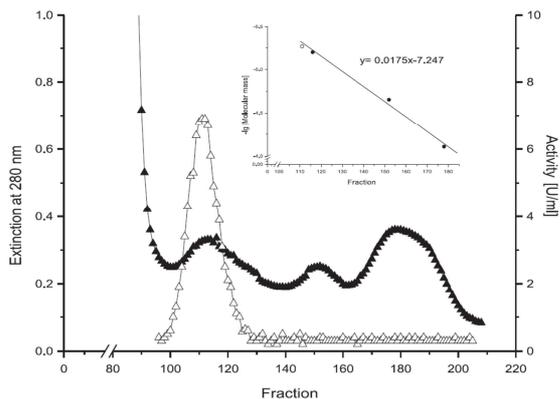
An *E. coli* expression vector bearing the *GLY1* gene encoding TA was generated and named *pAFGLY1*. The molecular mass of the purified TA was estimated to be 43 kDa (see Figure II in supplement data). Size exclusion chromatography was carried out to analyze the quaternary structure of TA. The main elution peak appeared at 184 kDa, corresponding to the major peak of TA activity as shown in Fig. 2. An SDS PAGE of the predicted TA fractions confirmed a single protein at 43 kDa, indicating that the enzyme assembles into a homotetramer under native conditions (data not shown). Comparing the TA amino acid sequences of *A. gossypii* and *S. cerevisiae* identified a similarity of 88% [20]. The characterized *S. cerevisiae* enzyme showed similarity to the TA of *A. gossypii*, with a molecular mass of 41 kDa and a homotetrameric superstructure as well [34].

The pyridoxal phosphate (PLP) dependence of TAs has been generally recognized in recent decades [18]. The TA of *A. gossypii* was found to be pyridoxal phosphate (PLP) dependent as depicted in Fig. 3. An adsorption spectrum of the purified enzyme solution was carried out showing a maximum at 416 nm corresponding to free PLP at 403 nm (Fig. 3A). The absence or presence of PLP led to enzyme activities of  $0.63 \pm 0.06$  U/ml or  $1.1 \pm 0.1$  U/ml, respectively (Fig. 3B). While one subunit of TA binds one PLP in the *A. gossypii* enzyme, a one to two molar ratio of co-factor to monomeric enzyme was found for the *S. cerevisiae* TA [34].

Kinetic analysis was carried out using the substrate analogue *DL*-threo-β-phenylserine or the substrate *L*-threonine. The conversion of different concentrations of *DL*-threo-β-phenylserine to benzaldehyde was followed and linear regression by the method of

50

S. Barig et al. / Enzyme and Microbial Technology 60 (2014) 47–55



**Fig. 2.** Active superstructure of recombinant *A. gossypii* threonine aldolase analyzed by size exclusion chromatography. The fractions of threonine aldolase from *A. gossypii* eluted by size exclusion chromatography were analyzed by UV spectroscopy at 280 nm (▲). Enzymatic activity (△) was determined by spectrophotometric detection of benzaldehyde after cleavage of phenylserine. The main activity peak corresponds to the main protein peak. Only the last data points for the blue dextran (2000 kDa; excluded) peak are shown. Standard molecules were applied in the same run: alcoholdehydrogenase (150 kDa); albumin from chicken egg (45 kDa); cytochrome c (12.4 kDa). Insert: Calibration of the column with standard molecules (●) allowed calculation of 180 kDa as the molecular mass for a tetrameric superstructure of threonine aldolase (○).

Lineweaver–Burk gave a  $K_m$ -value of 18 mM. A series of systematic L-threonine concentrations in a test where conversion to glycine was detected by HPLC resulted in a  $K_m$  value of 6 mM (see Figure III in supplement data).

### 3.3. Octyl sepharose bead-adsorbed TLL results in enzymatically active particles

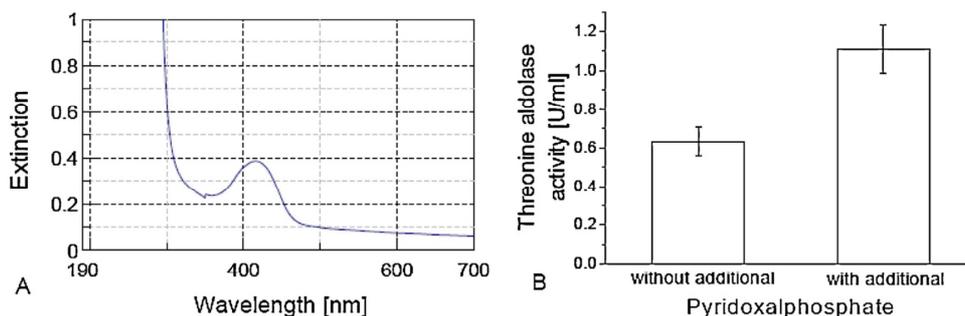
Adsorption of lipases by hydrophobic interaction is a fast and common method, especially for reactions in organic solvents where lipases are fully precipitated. Purification from crude extract and simultaneous immobilization is also possible so as to support specific characteristics of lipases, e.g. stability, selectivity, increased activities [35]. Octyl sepharose beads were used as a support for the immobilization of TLL. Three different amounts of lipase were applied, namely 0.4 mg, 0.8 mg and 4 mg. Immobilization was followed by measuring the pNPPalm activity of the initial enzyme solution applied to the beads, of the flow through and washing fractions as well as of the octyl sepharose beads after immobilization. Adsorption was successfully carried out. The expected final

activity was set in relation to the experimentally determined lipase activity, showing activity retention towards pNPPalm in the three batches of 70%, 50% and 70%, respectively. Furthermore, the activity of TLL immobilized on octyl sepharose towards other lipase substrates such as triolein and rapeseed oil was analyzed. The adsorbed lipase showed activity towards the emulsified substrates but with a decrease in activity (data not shown). Freely diffusing lipases show moderate activity towards small water soluble esters. Bastida et al. described how different lipases, especially TLL, when adsorbed on octyl-agarose resulted in a 20-fold increase in activity towards *p*-nitrophenyl propionate (pNPPProp). This is called hyperactivation [28]. Following the described method, hyperactivation was found neither for fully soluble *p*-nitrophenyl palmitate (pNPalm) nor for substrates forming an interface such as triolein or rapeseed oil. Fernandez-Lafuente and co-workers have already suggested that immobilization on octyl agarose promotes activity towards fully soluble substrates [35]. In biphasic systems, steric hindrances due to the strong adsorption will lead to a decrease in activity [28,35]. The presented data support the hypothesis for octyl-sepharose immobilized lipases active in biphasic systems of oil/water. The activity of immobilized TLL decreased dramatically towards triolein and rapeseed oil. Furthermore, the hypothesis that the activity of octyl agarose immobilized lipase strongly prefers fully soluble substrates will be expanded that only short esters are preferred.

### 3.4. Formation of lipase CLEAs changes substrate specificity

The formation of CLEAs was carried out and lipase activities for different substrates differing in solubility in water as well as chain length were analyzed. Table 1 shows the variation in substrate specificity before and after cross linking. Using pNPPalm an activity recovery of 10% was determined. Comparing all four substrates, freely diffusing TLL showed the best activity towards rapeseed oil. Setting all other substrates in relation to the substrate with the best activity, short chain esters such as pNPPProp showed the lowest activity.

Comparing the activities of freely diffusing TLL and CLEA towards pNPPalm and pNPPProp indicated a shift in substrate specificity from long to short chain substrates. Therefore, this effect was analyzed by adding different amounts of glutaraldehyde during cross linking (Fig. 4). The activity towards pNPPProp increased with increasing concentrations of glutaraldehyde. However, Table 1 shows that this effect was not the same for substrates forming an emulsion, either short chains such as triacetin (C2) or a natural substrate (16:0 up to 18:3). Using triacetin instead of the complex rapeseed oil the enzyme recovery was of the same order of magnitude and hyperactivation of TLL was not seen. During the first step of CLEA formation, the physical aggregation of enzyme molecules in

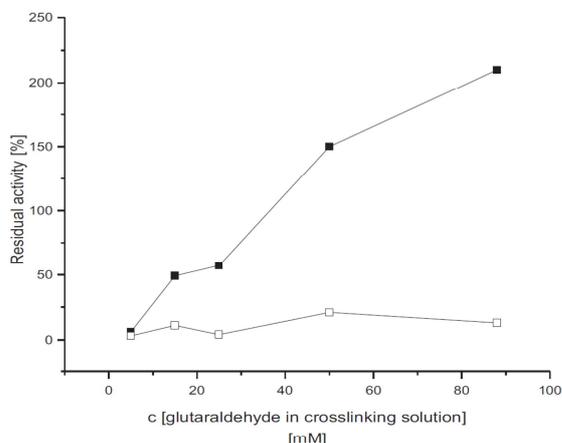


**Fig. 3.** Dependency of *A. gossypii* threonine aldolase on pyridoxal phosphate. (A) Purified threonine aldolase was analyzed by taking an absorption spectrum between 300 nm and 650 nm. The main absorption peak occurred at 416 nm, corresponding to pyridoxal phosphate. (B) Threonine aldolase activity was determined either as purified from the *E. coli* crude extract or after the addition of pyridoxal phosphate to a final concentration of 0.05 mM.

**Table 1**

*T. lanuginosus* Lipase (TLL) specific activities determined with freely diffusing enzyme or cross-linked aggregates (CLEAs) and four different substrates. Highest enzyme activity of 17 U/mg was determined with freely diffusing lipase on rapeseed oil. The value was set 100% and each of the following substrates for freely diffusing enzymes and CLEAs were set in relation. Finally the retention of enzyme activity was calculated.

Substrate	Rapeseed oil	Triacetin	pNPPalm	pNPPProp
Freely diffusing TLL [%]	100	42	5.3	0.2
CLEAs [%]	2.4	3.5	0.6	2.2
Retention of activity [CLEAs/free TLL]	0.02	0.08	0.1	9.2



**Fig. 4.** Residual activity of cross-linked *T. lanuginosus* Lipase on long chain or short chain fatty acid phenyl esters. Cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of *T. lanuginosus* Lipase were generated using different concentrations of glutaraldehyde. Either *p*-nitrophenyl propionate (pNPPProp; ■) or *p*-nitrophenyl palmitate (pNPPalm; □) was applied as a substrate to determine the CLEAs' enzymatic activity. The activity with non-treated (freely diffusing monomeric) lipase was set at 100%. In the case of pNPPalm, 100% was 11 U per mg protein. In the case of pNPPProp, 100% was 15 mU per mg protein.

supermolecular structures, the three-dimensional structure is not disturbed [36]. It is well known that CLEA technology for lipases can introduce a greater volumetric activity compared to single molecules. Due to aggregation in the presence of additives such as surfactants or crown ethers, which will introduce a conformational change, activity will be increased [37]. In the presented case the physical change and rigid stabilization of the protein favours the hydrolysis of short chain esters, which was already shown by Lopez-Serrano et al. for TLL [27]. It was shown that the activity towards pNPPProp increased 10-fold comparing freely diffusing TLL and TLL CLEAs. Additionally, more glutaraldehyde leads to higher activity towards pNPPProp. This interesting phenomenon can be explained by the fact that higher amounts of glutaraldehyde introduce a more rigid and dense structure of cross linked enzymes. Side effects such as diffusion limitation and steric hindrance for larger molecules can be a reason for a low activity towards pNPPalm. Furthermore, a stabilized open conformation of the lipase molecules can enhance activity towards unusual short chain substrates. Soluble long chain substrates such as pNPPalm were hydrolyzed better with freely diffusing enzymes than with CLEAs; therefore, an activity recovery of 10% was typical. In contrast, Gupta et al. showed an increase in activity towards pNPPalm under similar CLEA formation conditions as those used in the presented study. Additionally, they used olive oil hydrolysis to show the stability of the formed CLEAs [38]. The received data show that rapeseed oil is still hydrolyzed by TLL CLEAs but, comparing the activity with freely diffusing lipase, a 97% loss of activity occurred. These effects could be explained by the rigid structure of CLEAs, difficulties in interacting with the oil/water interface as well as the faster diffusion of smaller molecules.

### 3.5. Dry entrapment of TA and different TLL preparations with epoxy and polyester resin applied on different supports

Embedding cells or proteins in polymeric resins has already been studied multiple times. Instead of adding enzymes or cells previous to polymerization, most studies use already polymerized resins to adsorb or covalently link to proteins [11]. These meso- and macroporous supports are very attractive for enzyme immobilization due to their ordered structure, narrow pore size, and high surface area [39]. Not only single molecules but also pre-immobilized enzymes are further treated with polymerizing agents. Experiments showed that non-covalently immobilized or cross linked enzymes can be mechanically and chemically stabilized by polymerizing silicone precursors as a coating [40] or by embedding them in lens-shaped polyvinyl alcohol hydrogel particles [41].

The immobilization potential of two different polymer resins was analyzed and compared for TLL and TA. Fig. 5 shows the principle of the dry entrapment method. The enzyme preparations, either freely diffusing or fixed in a first immobilization step on octyl sepharose or by cross linking (CLEAs), were lyophilized, mixed with a two component polymer resin and placed on a surface. The two different glues, epoxy and polyester resin, were then tested on either metal or polyester mesh.

(a) Different lyophilized TLL preparations showed varying catalytic activity

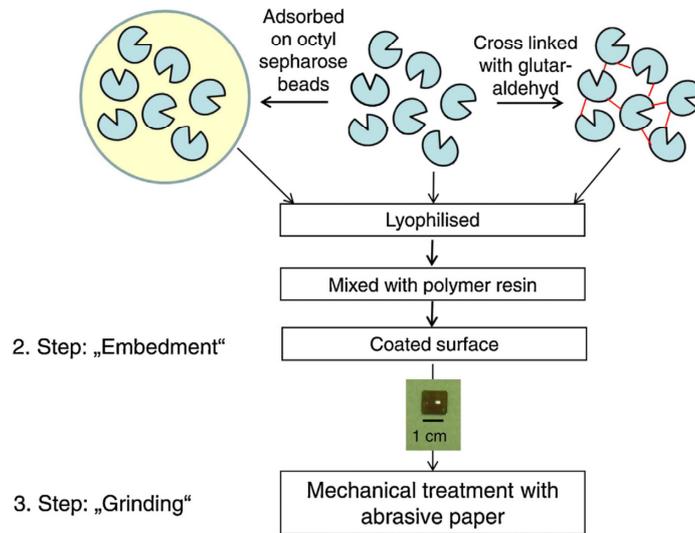
Three different lyophilized TLL preparations were generated for the embedment into a polymeric network. The idea was to prepare different samples varying in size to avoid leaching into the substrate solution. Freeze-dried freely diffusing TLL showed best catalytic activity towards pNPPalm of 1–2.5 U/mg protein. Lyophilized CLEAs shown to have a size of 370–950 nm in diameter revealed 0.1–0.23 U/mg protein aggregates [38]. Using TLL immobilized on octyl-sepharose beads to determine the enzymatic activity revealed 0.01 U/mg protein. The diameter of the octyl sepharose CL-4B beads is stated by the manufacturer to be 45–165  $\mu\text{m}$  in diameter. Reasons for the difference in activity between freely diffusing enzymes and immobilized samples are given in the previous sections. An option to improve the activity of freeze-dried enzymes is to add additives prior to lyophilization such as salts, sorbitol, polyethyleneglycol (PEG) [42].

(b) Polyester mesh is suitable as a carrier

TLL adsorbed on octyl sepharose beads and CLEAs were placed on a polyester mesh previously coated with epoxy resin. Table 2 shows the results in comparison with a standard immobilization method. It can be seen that the area related activity in mU/cm<sup>2</sup> was one order of magnitude higher compared to adsorptive immobilization on polyester mesh.

(c) Enzyme-resin layers on defined steel platelets revealed lipolytic active units

## 1. Step: Enzyme preparation



**Fig. 5.** Schematic overview of dry enzyme entrapment procedure. The enzyme was used either in a freely diffusing form, adsorbed on octyl sepharose beads, or as a cross linked enzyme aggregate (CLEAs) preparation. The enzyme preparation was further lyophilised, mixed with an appropriate polymer resin and placed on the surface generating the preparation "embedment". Further mechanical treatment with abrasive paper was called "grinding".

**Table 2**

Two-step immobilisation of *T. lanuginosus* Lipase on polyester mesh. Adsorption on octyl sepharose beads or cross linked *T. lanuginosus* Lipase (TLL) was fixed in a second step on a polyester mesh by dry entrapment with epoxide resin. Specific activities per immobilised enzyme amount and activities per area were determined using *p*-nitrophenyl palmitate assay. For comparison TLL adsorbed on polyester mesh by incubation of the water-dissolved enzyme was analysed. n.d. – not determined.

1 <sup>st</sup> Step immobilisation method	Specific activity after 1 <sup>st</sup> step of immob. [mU/mg]	Specific activity after 2 <sup>nd</sup> step of immob. [mU/mg] [mU/cm <sup>2</sup> ]
Octyl sepharose	10.8 –	5.8 5.5
CLEAs	110 –	33.8 6.8
Adsorbition on polyester mesh		n.d. 0.9

**Table 3**

Substrate specificity of different *T. lanuginosus* lipase immobilisates gained by dry entrapment. Freeze dried, free, or cross linked *T. lanuginosus* lipase (TLL) immobilized by dry entrapment with either epoxy or polyester resin were prepared with two preparations of dry entrapment called "embedment" and "grinding". Immobilization efficiency was 140 mg per g polymeric support. Two different lipase assay systems were applied, a colorimetric assay using either *p*-nitrophenyl propionate (pNPPProp) or *p*-nitrophenyl palmitate (pNPPalm) as substrate and a titrimetric assay using rapeseed oil as substrate.

Substrate	Preparation of the enzyme in resin	Free <i>T. lanuginosus</i> lipase [mU/mg protein]		Cross linked <i>T. lanuginosus</i> lipase [mU/mg protein]	
		Epoxy resin	Polyester resin	Epoxy resin	Polyester resin
pNPPalm	Embedment	26	163	4	4
	Grinding	185	170	11	4
pNPPProp	Embedment	3	12	<0.1	3
	Grinding	5	18	2	2
Rapeseed oil	Embedment	8	120	<1	1
	Grinding	4	16	<1	1

**Table 4**

Lipase activities of *T. lanuginosus* Lipase immobilised by dry entrapment "spraying" method. Different amounts of acetone precipitated *T. lanuginosus* Lipase (TLL) were mixed with epoxy resin and sprayed on a metal surface. Activities towards *p*-nitrophenol palmitate (pNPPalm) were determined per area and per mg enzyme.

Calculated mass of TLL on metal slide (1 cm × 1 cm) [mg]	Activity pNPPalm [mU/cm <sup>2</sup> ]	Activity pNPPalm [mU/mg TLL]
0.04	21	500
0.16	120	781
0.22	103	466

**Table 5**

Comparison of *T. lanuginosus* Lipase (TLL) immobilized by dry entrapment with standard immobilization protocols. Five immobilization protocols from literature using TLL as model enzyme are summarized according to immobilization efficiency and recovery of activity. Comparatively the data of dry entrapment of free TLL in epoxy resin using the methods "embedment", "grinding" and "spraying" are presented.

Immobilization method	Immobilization efficiency	Recovery of activity [%]	Substrate	Reference
<i>(1) Covalent attachment</i>				
Chemical amination and multipoint attachment to glyoxyl-agarose	10 mg enzyme/g support	70	According to <i>p</i> -nitrophenyl butyrate:	[43]
Immobilization on	Immobilized activities according to tributyrin			[45]
(a) Eudragit	1300 U/g support	5	According to tributyrin	
b) Carboxymethyl cellulose	1280 U/g support	400	According to olive oil	
<i>(2) Non-covalent attachment</i>				
Adsorption on hydrophobic supports	10 mg enzyme/g support			[48]
(a) Octyl-agarose		750	<i>p</i> -Nitrophenyl butyrate	
(b) Butyl-toyopearl		60		
Sol-gel entrapment	0.5 mg enzyme/g support	31,800	Esterification efficiency of caproic	[42]
Freeze-dried	125 mg/g total material	440	acid and 1-phenylethanol in hexane	
<b>Dry entrapment</b>				
"Embedment"	140 mg/g support	1		
"Grinding"	140 mg/g support	5	<i>p</i> -Nitrophenyl palmitate	
"Spraying"	120 mg/g support	20		

The cross linked TLL as well as the free enzyme were lyophilized, mixed with either epoxy or polyester resin and placed on a metal surface of 1 cm × 1 cm. This preparation was called "embedment" (Fig. 5). Protein load was 140 mg per g polymeric support. A further mechanical treatment by roughening the hardened surface of the glue-enzyme mix was called "grinding". Table 3 shows the lipase activity towards different substrates. All preparations showed activities towards pNPPalm whereby the free enzyme preparations were more active than the cross linked ones. Actually, the activity of the free enzyme preparations was up to three orders of magnitude higher. However, comparing the specific activity for pNPPalm of the freely diffusing enzyme (2480 mU/mg) with the free enzyme embedded in epoxy resin (23.8 mU/mg), an enzyme activity recovery of 1% towards pNPPalm was obtained (also shown in Table 5). TLL is one of the best characterized lipases and was used multiple times as model enzyme for newly evolved immobilization techniques, e.g. multipoint attachment to glyoxyl-agarose or phyllosilicate sol-gel matrix entrapment [43,44]. Therefore, a lot of data exist as a comparative basis. Different immobilization protocols from literature were chosen and compared with the new immobilization technique based on dry entrapment in polymeric resins. The data is summarized in Table 5 according to immobilization efficiency and recovery of activity. The protein load in the presented method is comparable with the freeze-dried method of Persson et al. [42]. Activity recoveries for "embedment" and "grinding" are comparable with the covalent binding of TLL on Eudragit [45]. One reason is that not all enzymes are located on the surface meaning that the main part of protein is located inside the resin which in turn lowers the specific activity. Furthermore, the resin seems to build up a diffusion barrier for the substrate.

The embedded sample was characterized using three different activity assays as shown in Table 3 (each in duplicate). Using the soluble substrates pNPPalm and pNPPprop the activity increased after a mechanical treatment with abrasive paper ("grinding"). In contrary the activity towards rapeseed oil was lower using the preparation method "grinding" in comparison to "embedment". The mechanical treatment visible roughened the surface of the immobilisates. This in turn expands the "real" area which comes in contact with the substrate. Furthermore, the small substrates can invade the rough surface which seems not to be the case for complex substrate such as plant oil.

An interesting point is the area related activity towards plant oil, usable e.g. for the enzymatic fat splitting. In the presented study area related activity towards rape seed oil was determined with 170 mU/cm<sup>2</sup> using "embedment" of free lyophilized enzyme in epoxy resin. Grinding revealed an even higher activity of 260 mU/cm<sup>2</sup>. These results are comparable with literature values of TLL used in glass-fibre membrane reactors for fat splitting of tallow generated an activity of 400–990 mU/cm<sup>2</sup> depending on the oil flux [46].

Storing the samples for one week at 4 °C revealed a residual activity towards pNPPalm of 6 mU/mg. This means that 75% of the enzyme activity was lost. Following the development of activity while in storage at 4 °C, similar values were obtained for "embedment" of free freeze dried enzyme after 32 days (data not shown). This can be explained by a leakage of the enzyme through the pores of the resin which is finished after storage after the mentioned time period.

On the contrary, CLEAs of TLL applied to an epoxide resin by "embedment" started with 0.5 mU/mg on day 1 and showed a final activity of 1 mU/mg after 32 days. In comparison to the free enzyme no leakage seems to occur. The enzyme activity was measured under continuous stirring which applies mechanical stress to the samples. This shearing has an effect to the surface of the epoxy resin. Further enzyme moieties become free at the surface and have the chance to come touch with the substrate. To support this hypothesis an active site titration would be a suitable method analyzing active enzyme in the immobilized sample [33]. Furthermore, epoxy resins are known to swell during incubation in water which can provide the lipase a micro-hydrophilic environment inside the polymeric complex introducing a positive effect on enzyme activity [47].

As a first step to generalize the method, a second example, the TA of *A. gossypii*, was immobilized using the preparation types "embedment" and "grinding" with epoxy resin. A protein load of 140 mg per g polymeric support was generated. The "embedment" method revealed comparable activity values in two independent experiments of 1.7 mU/mg and 1.8 mU/mg, while the "grinding" preparations, with 0.4 mU/mg and 2.8 mU/mg, was scattered over an order of magnitude. In this case, immobilization of TA by "embedment" revealed an activity recovery of 4.1%. Using the polyester resin in the "embedment" preparation in two independent experiments revealed a mean activity of 4.2 mU/mg.

Fu et al. immobilized a recombinant TA on different supports. The covalent immobilization on Eupergit revealed activity retention of 52.2% with a protein load of 8.64 mg protein per g carrier. Therefore, the enzyme recovery by “embedding” and “grinding” is relatively low. Furthermore, Fu and his colleagues generated a specific enzyme activity of 98 mU/mg immobilized enzyme which is one order of magnitude higher [21].

(d) “Spraying” revealed a thin coating with active TLL

With respect to thin coatings and rapid preparation of large support areas, dried enzyme was suspended in acetone and mixed directly with the epoxy resin to obtain a finely dispersed suspension that was sprayed on a surface. Different dispersion methods were tested, namely vortexing, sonication, and ball mill as well as Ultraturrax® treatment. Of these, the last demonstrated the best results. The suspension was sprayed on the steel surface so the applied material had a mean mass of  $5.2 \pm 1.1$  mg/cm<sup>2</sup> with a protein load of 120 mg per g epoxy resin. In comparison, the mean mass of applied material using the “embedding” method was determined to be  $72 \pm 13$  mg/cm<sup>2</sup>. Table 4 shows the results of varying the applied amount of enzyme in the spraying solution. An increase in TLL mass from 0.04 to 0.16 mg/cm<sup>2</sup> revealed an increase in enzyme activity towards pNPPalm. Further increasing the amount of applied enzyme did not lead to a further increase in activity. A comparison of all three preparations (spraying, embedding and grinding) concerning their activity towards pNPPalm per area gave values within the same order of magnitude. However, if the “spraying” and “embedding” preparation types were compared regarding their specific activity towards pNPPalm per unit of enzyme, the “spraying” method displayed 500 mU/mg, a 22-fold increase over the other. The specific activity towards pNPPalm of freely diffusing TLL was determined to be 2480 mU/mg, revealing an enzyme recovery of 20% by the “spraying” method (Table 4). Comparing the enzyme recovery with literature values as presented in Table 5 it is difficult for the dry entrapment to compete with them. Enzyme recovery is not only depending on the immobilization method, e.g. entrapment, covalent immobilization, there are much more influences which need to consider. One would be the substrate. As shown for the immobilization of TLL on Eudragit or carboxymethyl cellulose the enzyme recovery for tributyrin as substrate was very low thereby the hydrolysis of olive oil was four-fold increased [45]. Another point which influences the enzyme recovery would be the chemical properties of the support. It was shown that the immobilization on hydrophobic supports and the residual activity of TLL is dependent on the acyl chain length connected to the supporting material [48]. The abundant research about TLL generated a variety of immobilized preparations which are already used in industry [16]. In the presented case TLL was used as a model enzyme but it was shown that dry entrapment is also applicable for the more complex enzyme TA from *A. gossypii*. That opens the chance to adapt the method to a variety of different enzyme systems. Especially the application in organic phases is conceivable. A further positive aspect is the possibility to attach the enzyme/polymer complex to different support materials such as polyester or metal. Polymerization after enzyme addition enables an adaptation to varying materials with different geometries. Different coating methods enable the operator to either apply a thick film of enzyme/polymer complex forming an enzyme reservoir or a thin sprayed layer coating the surface.

To apply this system to further biocatalysts different aspects need to be analyzed in detail. In the literature, use of lyophilized yeast cells or *E. coli* overexpressing a single enzyme in an organic solvent has already been carried out [49,50]. Lyophilized enzymes for chemical conversions are mostly used in an immobilized form, e.g. in xero-gels or as CLEAs to stabilize the structure, keeping

the enzyme active in organic solvents [51]. Thermogravimetry was used to show that lyophilized or often termed “dry” enzyme materials such as CLEAs were not totally water-free. Furthermore, residual water bound to free enzymes or CLEAs can have a positive effect during reactions in organic solvents [52]. The residual water in the enzyme preparations for dry embedding and its impact on activity needs to be investigated in further experiments.

It is assumed that the enzyme preparations are embedded inside the polymeric network. To determine how the enzyme is integrated in the polymeric network further experiments are necessary. Miltec et al. used mercury intrusion porosimetry to determine pore volumes and pore radii of an epoxy functionalized support [11]. The specific values will change with the immobilized enzyme. The results can be confirmed by different methods such as transmission electron microscopy (TEM) [39]. Additionally, these methods are important to determine the “real” surface area of the supporting resins.

It is possible that in the case of epoxy resin, amino, thiol, or phenolic amino acid residues could covalently react with the monomeric epoxy building blocks of the resin. If the epoxy material is not further functionalized, e.g. with ionic groups or metal-chelators that support physical adsorption, a spontaneous reaction in aqueous media would be unlikely. Under conditions in organic solvents a spontaneous reaction between amino acid residues and epoxy groups could be possible [9]. Approaches to distinguishing between the major immobilization paths of entrapment, covalent bonding or a mixture of both would be valuable for epoxy compounds. The removal of epoxy resins used to embed tissue for electron microscopy is a standard procedure. Specific organic solvents such as a mixture of sodium methoxide, benzene and methyl alcohol will help to dissolve the resin [53]. In the case of embedded enzyme the proteins can be easily removed and analyzed, for example by SDS PAGE.

#### Acknowledgments

The work was supported by the Brandenburg ministry for science and culture under the topic “ZIELVEREINBARUNGSMITTEL 2010-2013 STAERKUNG DER FORSCHUNGSKOMPETENZ”. We are grateful to Janine Schubert and Susanne Nieland for technical assistance and support. Additionally, we are grateful to Prof. Dr. Mirsky, Dr. R. Schmid and Ph.D. students S. Schröter and M. Muth for fruitful discussions.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.03.013>.

#### References

- [1] Hanefeld U, Gardossi L, Magner E. Understanding enzyme immobilization. *Chem Soc Rev* 2009;38:453–68.
- [2] Sheldon RA. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Adv Synth Catal* 2007;349:1289–307.
- [3] Brady D, Jordaan J. Advances in enzyme immobilization. *Biotechnol Lett* 2009;31:1639–50.
- [4] Spahn C, Minteer SD. Enzyme immobilization in biotechnology. *Recent Patents Chem Eng* 2008;2:195–200.
- [5] Brena BM, Batista-Viera F. Immobilization of enzymes: a literature survey. *Immobilization of enzymes and cells, Methods in Biotechnology™*, vol. 22. Springer; 2006. p. 15–30.
- [6] Yan Y, Zhang X, Chen D. Enhanced catalysis of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 immobilized on macroporous resin and its application in enrichment of polyunsaturated fatty acids. *Bioresour Technol* 2013;131:179–87.
- [7] Mateo C, Fernández-Lorente G, Abian O, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Multifunctional Epoxy Supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules* 2000;1(4):739–45.

- [8] Klein J, Kressdorf B. Immobilization of living whole cells in an epoxy matrix. *Biotechnol Lett* 1982;4:375–80.
- [9] Mateo C, Palomo JM, Fuentes M, Betancor L, Grazu V, López-Gallego F, et al. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb Technol* 2006;39(2):274–80.
- [10] Betancor L, López-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Dellamora-Ortiz G, Mateo C, et al. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme Microb Technol* 2006;39(4):877–82.
- [11] Miletic N, Vukovic Z, Nastasovic A, Loos K. Effect of *Candida antarctica* Lipase B immobilization on the porous structure of the carrier. *Macromol Biosci* 2011;11:1537–43.
- [12] Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 1998;16(9):396–403.
- [13] End N, Schoening K-U. Immobilized biocatalysts in industrial research and production. *Top Curr Chem* 2004;242:273–317.
- [14] Houde A, Kademi A, Leblanc D. Lipases and their industrial applications. *Appl Biochem Biotechnol* 2004;118:155–70.
- [15] Jaeger K-E, Dijkstra BW, Reetz MT. Bacterial biocatalysts: molecular, biology three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 1999;53:315–51.
- [16] Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J Mol Catal B: Enzym* 2010;88:409–21.
- [17] Straathof AJJ, Panke S, Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:548–56.
- [18] Dückers N, Baer K, Simon S, Gröger H, Hummel W. Threonine aldolases – screening, properties and applications in the synthesis of non-proteinogenic beta-hydroxy-alpha-amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;88:409–24.
- [19] Steinerer S, Fesko K, Reisinger C, Schurmann M, Assema F, Wolberg M, et al. Threonine aldolases – an emerging tool for organic synthesis. *Tetrahedron* 2007;63:918–26.
- [20] Monschau N, Sahn H, Stahmann K-P. Threonine aldolase overexpression plus threonine supplementation enhanced riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998;64(11):4283–90.
- [21] Fu H, Dencic I, Tibbe J, Sanchez Pedraza CA, Wang Q, Noel T, et al. Threonine aldolase immobilization on different supports for engineering of productive, cost-efficient enzymatic microreactors. *Chem Eng J* 2012;207–208:564–76.
- [22] Stahmann KP, Bodecker T, Sahn H. Regulation and properties of a fungal lipase showing interfacial inactivation by gas bubbles, or droplets of lipid or fatty acid. *Eur J Biochem* 1997;244:220–5.
- [23] Barig S, Alich R, Nieland S, Wuttke A, Gräser Y, Huddar M, et al. Monoseptic growth of fungal lipase producers under minimized sterile conditions: cultivation of *Phialemonium curvatum* in 350 L scale. *Eng Life Sci* 2011;11:387–94.
- [24] Monschau N, Stahmann K-P, Sahn H, McNeil JB, Bogner AL. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* GLY1 as a threonine aldolase: a key enzyme in glycine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* 1997;150:55–60.
- [25] Ulevitchz RJ, Kallen RG. Studies of the reactions of substituted D,L-erythro-P-phenylserines with lamb liver serine hydroxymethylase. Effects of substituents upon the dealdolization step. *Biochemistry* 1977;16(24):5355–63.
- [26] Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [27] Lopez-Serrano P, Cao L, van Rantwijk F, Sheldon RA. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnol Lett* 2002;24:1379–83.
- [28] Bastida A, Sabuquillo P, Armissen P, Fernández-Lafuente R, Hugué J, Guisán JM. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioenergy* 1998;58:486–93.
- [29] Omar CI, Mitsunori H, Nagai S. Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* No. 3. *Agric Biol Chem* 1987;51:37–45.
- [30] Jha BK, Svensson M, Kronberg B, Holmberg K. Titration microcalorimetry studies of the interaction between *Humicola lanuginosa* lipase and ionic surfactants. *J Colloid Interface Sci* 1999;213:262–4.
- [31] Boel E, Høge-Jensen IB. Recombinant *Humicola* lipase and process for the production of recombinant *Humicola* lipase. EP:0305216B1; 1995.
- [32] Palomo JM, Fuentes M, Fernández-Lorente G, Mateo C, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* 2003;4(1):1–6.
- [33] Persson M, Wehtje E, Adlercreutz P. Factors governing the activity of lyophilized and immobilized lipase preparations in organic solvents. *Chem Bio Chem* 2002;3:566–71.
- [34] Liu J-Q, Nagata S, Dairi T, Misono H, Shimizu S, Yamada H. The *GLY1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a low-specific L-threonine aldolase that catalyzes cleavage of L-allo-threonine and L-threonine to glycine. Expression of the gene in *Escherichia coli* and purification and characterization of the enzyme. *Eur J Biochem* 1997;245:289–93.
- [35] Fernandez-Lafuente R, Armissen P, Sabuquillo P, Fernández-Lorente G, Guisán JM. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem Phys Lipids* 1998;93:185–97.
- [36] Cao L, van Rantwijk F, Sheldon RA. Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Org Lett* 2000;2(10):1361–4.
- [37] Sheldon RA. Immobilization of enzymes as cross-linked enzyme aggregates: a simple method for improving performance. In: Patel RN, editor. *Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries*. CRC Press Inc.; 2006.
- [38] Gupta P, Dutt K, Misra S, Raghuvanshi S, Saxena RK. Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. *Bioresour Technol* 2009;100:4074–6.
- [39] Magner E. Immobilization of enzymes on mesoporous silicate materials. *Advanced article, Chem Soc Rev* 2013;42:6213–22.
- [40] Wiemann LO, Weisshaupt P, Nieguth R, Thum O, Ansoerge-Schumacher MB. Enzyme stabilization by deposition of silicone coatings. *Org Process Res Dev* 2009;13:617–20.
- [41] Wilson L, Illanes A, Pessela BCC, Abian O, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: evaluation of a novel biocatalyst in organic media. *Biotechnol Bioenergy* 2004;86:558–62.
- [42] Persson M, Mladenoska I, Wehtje E, Adlercreutz P. Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme Microb Technol* 2002;31:833–41.
- [43] Rodrigues RC, Godoy CA, Volpato G, Ayub MAZ, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM. Immobilization-stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: critical role of chemical amination. *Process Biochem* 2009;44:963–8.
- [44] Hsu A-F, Jones KC, Foglia TA, Marmer WN. Transesterification activity of lipases immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix. *Biotechnol Lett* 2004;26:917–21.
- [45] Charusheela A, Arvind L. Enzyme catalyzed hydrolysis of esters using reversibly soluble polymer conjugated lipases. *Enzyme Microb Technol* 2002;30:19–25.
- [46] Taylor F, Craig CJ. Scale-up of flat-plate reactors for enzymatic hydrolysis of fats and oils. *Enzyme Microb Technol* 1991;13:956–9.
- [47] Zhou J, Lucas JP. Hygrothermal effects of epoxy resin. Part I: The nature of water in epoxy. *Polymer* 1999;40:5505–12.
- [48] Fernandez-Lorente G, Cabrera Z, Godoy C, Fernandez-Lafuente R, Palomo JM, Guisán JM. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalytic properties. *Process Biochem* 2008;43:1061–7.
- [49] Hoyos P, Sansottera G, Fernández M, Molinari F, Sinisterra JV, Alcántara AR. Enantioselective monoreduction of different 1,2-diaryl-1,2-diketones catalysed by lyophilized whole cells from *Pichia glucozyma*. *Tetrahedron* 2008;64(34):7929–36.
- [50] Jakoblinert A, Mladenov R, Paul A, Sibilla F, Schwaneberg U, Ansoerge-Schumacher MB, et al. Asymmetric reduction of ketones with recombinant *E. coli* whole cells in neat substrates. *Chem Commun* 2011;47:12230–2.
- [51] Hara P, Hanefeld U, Kanerva LT. Sol-gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. *J Mol Catal B: Enzym* 2008;50(2–4):80–6.
- [52] Paravidino M, Sorgedraeger MJ, Orru RVA, Hanefeld U. Activity and enantioselectivity of the hydroxynitrile lyase MeHNL in dry organic solvents. *Chem Eur J* 2010;16:7596–604.
- [53] Mayor HD, Hampton JC, Rosario B. A simple method for removing the resin from epoxy-embedded tissue. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;9:909–10.

## **7.3 Original Publikation**

### **Quantitative turbidity assay for lipolytic enzymes in microtiter plates**

**With kind permission from Springer Science and Business Media:**

**Analytical and Bioanalytical Chemistry,**

**Quantitative turbidity assay**

**for lipolytic enzymes in microtiter plates,**

**405(26), 2013, 8539-47.**

**Barig S., Schiemann M.,**

**Mirsky V. M., Stahmann, K.-P.**

Anal Bioanal Chem (2013) 405:8539–8547  
DOI 10.1007/s00216-013-7283-5

RESEARCH PAPER

## Quantitative turbidity assay for lipolytic enzymes in microtiter plates

Susann Barig · Manja Schiemann · Vladimir M. Mirsky · K. Peter Stahmann

Received: 28 June 2013 / Revised: 25 July 2013 / Accepted: 29 July 2013 / Published online: 29 August 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** A clearing assay for lipolytic enzymes has been realized in 96-well microtiter plates. A thin layer containing emulsified tributyrin as turbidity-generating substrate was placed on a thicker supporting aqueous layer. Both layers were stabilized by a gel-forming agent. Enzyme addition leads to clearing of the emulsion detected with a standard microtiter plate reader as a decrease of extinction. Dependencies of the signal kinetics on the substrate and enzyme concentrations were studied. For 0.5–1 % tributyrin content the reaction rate is not substrate-limited. An initial slope of the signal kinetics is proportional to the lipase activity. A detailed characterization of the assay was performed. Lipolysis of tributyrin was confirmed by glycerol detection. Various gel-forming agents were compared and diffusion conditions in these gels were analyzed. Agar and agarose were found to be the most suitable gel-forming agents, which do not affect enzyme diffusion whereas polyacrylamide gels block lipase diffusion and therefore are not suitable for the assay. The optimized assay prepared from 1 % tributyrin emulsion in 2 % agar gel was tested with six microbial lipases and porcine pancreatic lipase. The detection limit is 20–60 ng/well which is equivalent to 30  $\mu$ U/well for *T. lanuginosus* lipase.

**Keywords** Lipase assay · Lipolytic enzymes · Microtiter plates · Turbidity · Tributyrin

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00216-013-7283-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Barig · M. Schiemann · V. M. Mirsky (✉) · K. P. Stahmann  
Department of Biotechnology, Brandenburg University of  
Technology Cottbus - Senftenberg, 01968 Senftenberg, Germany  
e-mail: vmirsky@hs-lausitz.de

### Introduction

Lipase assays are used in different industrial fields, for example production of detergents, food, or fine chemicals [1]. Another important application is clinical diagnostics; for example, lipolytic activity in blood, which is a marker of acute pancreatitis [2, 3] and lipolytic activity of *Staphylococcus aureus* correlates with its pathogenic activity [4, 5].

Numerous assays for the determination of lipolytic activity have been suggested [6–8]. They include physicochemical methods based on the disappearance of substrate or on the appearance of hydrolytic reaction products (for example fatty acids, glycerol, or pH changes) and immunological methods [7]. The most frequently used procedure for determination of lipolytic activity and specificity is pH titration of the released fatty acids [7, 8]. However, such measurements are complicated by weak dissociation and poor water solubility of fatty acids and by permanently increasing liquid volume during the assay. Lipase assays based on oil-drop tensiometry, lipid monomolecular layers, or bilayer lipid membranes have been reported. Oil drop tensiometry measures a formation of surface-active lipolysis products at the substrate–buffer interface [9]. Hydrolysis of substrate in the form of monomolecular layer at the air–water interface can be detected as a decrease of the monolayer area at fixed surface pressure [9–11]. A similar principle was realised on a hydrophobized metallic electrode coated with phospholipids; in this case desorption of hydrolysed products was monitored as changes of the electrical capacitance [12, 13]. Product desorption from supported lipid bilayers of acylglycerols and/or phospholipids has also been observed with atomic force microscopy [14]. Formation of lipolytic products in planar lipid bilayers can be detected as changes of boundary potential [15, 16]. These techniques are very useful for scientific applications but high sensitivity to surface-active impurities complicates their application for real samples. Fourier transform infrared spectroscopy enables one to detect hydrolysis of triacylglycerols

in reverse micelles [17]. Various chromatographic procedures, for example thin-layer chromatography, gas liquid chromatography, or high performance liquid chromatography can also be applied to quantitative determination of the released fatty acids but are not convenient for routine lipase analysis and enable only a low throughput.

Colorimetric lipase assays are based either on artificial chromogenic substrates, for example esters of  $\beta$ -naphthol or *p*-nitrophenol with fatty acids [18–20], or on the formation of chromogenic products by conversion of fatty acids to the copper soaps by reaction with chromogenic compounds [21]. Another colorimetric approach is based on specific catalytic oxidation of linoleic acid by lipooxygenase resulting in formation of a hydroperoxide which forms a red complex with thiocyanate [22]. Luciferase from *Beneckeia harveyi* develops bioluminescence in the presence of long-chain fatty acids, especially myristic acid [23]. Immunological methods based on ELISA have also been applied, but they measure only enzyme concentration and not enzymatic activity [24].

The first turbidity assay for detection of lipolytic activity was suggested by Lawrence et al. [25], and was further modified in numerous publications [26, 27]. Tributyrin was emulsified in agar and poured into Petri dishes. Stabilization by the agar enabled simple handling of the prepared assay. Lipase was injected into pre-cut wells (Fig. 1a). Hydrolysis of the tributyrin emulsion was observed by formation of a zone of clearance around the well. However, its application for quantitative analysis of lipases is complicated by the radial geometry of the system leading to a nonlinear concentration profile in the radial direction. Alternatively, mixing of a lipase sample with a hot agar suspension containing emulsified tributyrin has been suggested [5], but this may lead to the thermal inactivation of the enzyme and requires fast and highly

reproducible cooling to the assay temperature and preparation of assay media just before measurements of lipase activity. Additional problems may occur because of the effect of the hydrolysis products on the reaction rate [11]. These are probably the reasons why this approach, being very convenient and widely used for lipase screening and qualitative analysis in microbiology, is not used practically for quantitative measurements. This point of view is supported by Owusu et al. [28], who used two lipase assays in their work: a very approximate lipase estimation in chromatographic fractions was performed using tributyrin turbidity assay whereas a quantitative analysis of lipolytic activity for determination of enzyme damage was performed using *p*-nitrophenol assay.

We suggest here a new clearing assay enabling these problems to be overcome. The system (Fig. 1b) is also stabilized by agar (or agarose) but has two layers: a thin reaction layer containing emulsified tributyrin and a thicker supporting layer operating as a reservoir for lipolytic products. Lipase is added as the third (upper) layer, this leads to the fast and homogeneous lateral distribution of the enzyme. The new assay geometry has three advantages:

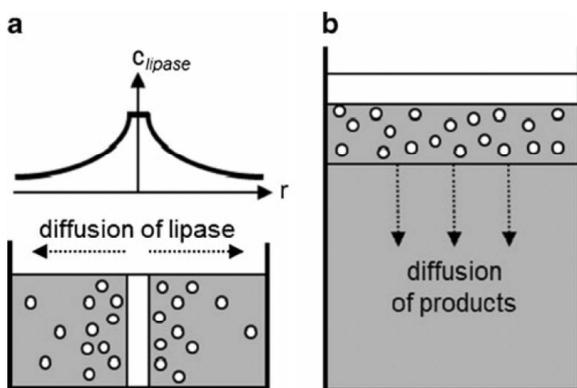
1. the concentration of the added lipase is constant within the field of optical measurement during the whole assay time;
2. the diffusion processes are mono-dimensional; and
3. the lipolytic products formed can leave the reaction layer, thus minimizing a possible effect on the enzymatic reaction.

As the result, the assay enables quantitative analysis of lipolytic activity. An additional important advantage is that it can be implemented as a high-throughput technique using standard microtiter plates and microtiter plate readers. The microtiter plates filled with assay media can be stored for a few weeks and posted; therefore it does not require any time-consuming assay preparation before measurements. Note that in contrast to *p*-nitrophenol and other currently used assays for lipase activity, the suggested assay does not need addition of surfactants which can strongly affect enzyme activity [29–32].

The assay was optimized using the lipase of *Thermomyces lanuginosus* (formerly named *Humicola lanuginosa*) and then tested with six other lipases.

#### Materials and methods

Commercially available enzyme Novareko (NovaBiotec Dr Fechter, Berlin, Germany), a *Thermomyces lanuginosus* lipase (31.7 kDa [33]) recombinantly produced by *Aspergillus oryzae*, was used as a model for assay development. In this paper it is referred to as *T. lanuginosus* lipase. The manufacturer specified its specific activity towards tributyrin as 250 U mg<sup>-1</sup>. Other lipolytic enzymes were purchased from Sigma–Aldrich



**Fig. 1** Comparison of the Petri plate lipase activity assay (a) with the suggested bilayer assay in a microtiter plate well (b). Radial diffusion of the enzyme in the Petri plate assay leads to inhomogeneous lipolysis conditions around the cavity with the injected enzyme. The bilayer assay enables homogeneous lipase distribution over the upper (reaction) layer. Lipid droplets are neither to scale nor represented in realistic numbers

(München, Germany): lipases from *Burkholderia cepacia*, *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum* type XII, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizomucor miehei*, and porcine pancreatic lipase type II. The *T. lanuginosus* lipase, stabilised by high concentrations of ethylene glycol, was precipitated with ice-cold acetone (50 %, v/v) overnight at 4 °C. The precipitate was centrifuged (15,090 g for 30 min at 4 °C) and washed twice with 100 % ice-cold acetone. The final precipitate was dissolved in distilled water. Undissolved material was removed by centrifugation. Other lipases were used without additional purification.

Lipase activity was estimated by colorimetric assay using *p*-nitrophenyl palmitate as substrate according to Barig et al. [34]. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of protein releasing 1 µmol *p*-nitrophenol per minute. Protein concentration was determined by colorimetric assay according to Bradford using a calibration curve obtained with bovine serum albumin [35].

The assay was prepared in 96-well microtiter plates as a two-layer system. The lower (supporting) layer consisted of 150 µL 2 % (w/v) agar dissolved in 500 mmol L<sup>-1</sup> sodium phosphate buffer pH 7.0. The upper (reaction) layer was prepared by mechanical dispersion of 1 % (v/v) tributyrin (this corresponds to 34 mmol L<sup>-1</sup>) in 40 µL of the above mentioned medium at 60 °C using an UltraTurrax stirrer (IKA-Werke, Staufen, Germany) at 13,500 rpm for 1 min. Each layer was allowed to solidify for 1 h. The effect of substrate concentration was analysed by emulsifying 0.25 %, 0.5 %, or 0.75 % instead of 1 % (v/v) tributyrin. Hydrolysis of tributyrin was initialised by injection of 20 µL aqueous lipase solution. The clearing process at 25 °C was observed via spectrophotometric measurement at 595 nm every 5 min for 1 h.

Droplet size distribution of the tributyrin emulsion was visualized using fluorescent staining with Nile red (Sigma–Aldrich) and analyzed by VideoScan system described elsewhere [36]. Tributyrin was mixed with Nile red stock solution (1 mg mL<sup>-1</sup> in acetone) to final concentration of 10 % (v/v) and mechanically dispersed. Subsequently, 20 µL of the tributyrin emulsion was deposited on to the glass slide and covered with a cover slip. Droplet diameter was measured within the range 1.0–20 µm. Optical spectra of microtiter plates were analysed before and after a long (7 h) hydrolysis with 2 µg/well *T. lanuginosus* lipase.

Agar (2 %, w/v) was compared with agarose (1.4 %, w/v) and polyacrylamide (8 % or 15 %, v/v). Agarose was treated using the same procedure as described for agar. In the case of polyacrylamide, both layers have a final volume of 100 µL whereby the upper layer contained 1 % (v/v) tributyrin (this corresponds to 85 mmol L<sup>-1</sup>). The polyacrylamide gels were prepared by mixing either 26 % or 50 % (v/v) Rotiphorese Gel 30 (37.5:1), an acryl-bisacrylamide mix (Carl-Roth, Karlsruhe, Germany) with 500 mmol L<sup>-1</sup> sodium

phosphate buffer pH 7.0. Polymerization was initiated by addition of 1 % (v/v) ammonium persulfate (VWR, Darmstadt, Germany) and 0.2 % (v/v) tetramethylethylenediamine (Merck, Darmstadt, Germany).

Diffusion was observed in glass tubes with an inner diameter of 0.6 cm and length of 4.5 cm filled with 1 mL of either agar (2 %, w/v), agarose (1.4 %, w/v), or polyacrylamide (8 % or 15 %, v/v) dissolved in 500 mmol L<sup>-1</sup> sodium phosphate buffer at pH 7.0. A small amount (250 µL) of a coloured marker with molecular size either smaller or larger than the *T. lanuginosus* lipase was injected into the end of the glass tube which was free from the gel. The following markers were used (all from Sigma–Aldrich): 50 mg mL<sup>-1</sup> neutral red (289 g mol<sup>-1</sup>), 2 mg mL<sup>-1</sup> cytochrome c from equine heart (12.4 kDa), and 50 mg mL<sup>-1</sup> blue dextran (2000 kDa). The tubes were sealed with parafilm and incubated at 25 °C in the horizontal position. Diffusion was studied by movement of the dye front and calculated from the equation:

$$D = \frac{l^2}{\pi t}, \quad (1)$$

where  $D$  is the diffusion coefficient and  $l$  is the displacement of the dye front during the time  $t$ .

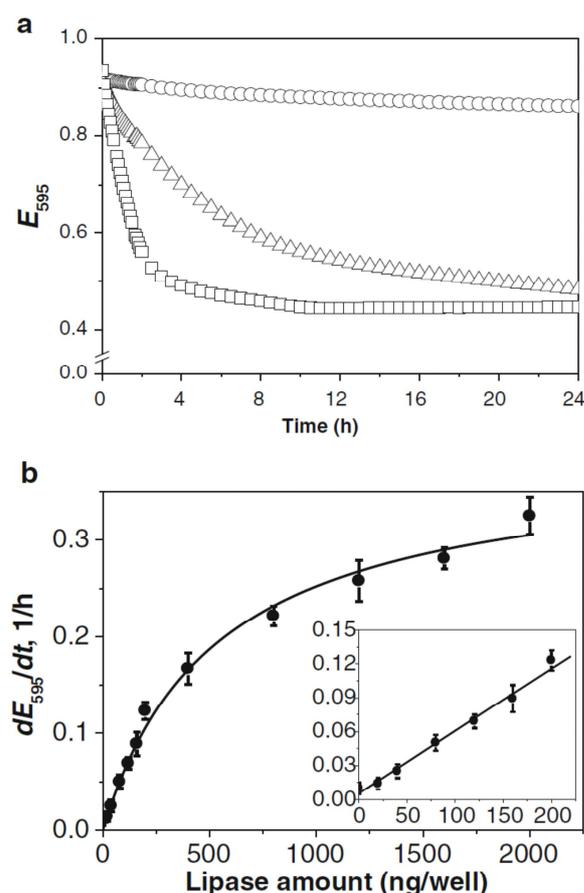
To quantify the released glycerol the content of one well was centrifuged (16,060 g for 10 min), then the supernatant was analysed with a glycerol UV method reaction kit (Boehringer Mannheim/r-biopharm, Darmstadt, Germany). Four independent experiments were performed after hydrolysis of tributyrin by *T. lanuginosus* lipase (2 µg/well for 2 h). Control experiments without lipase showed no glycerol detection.

Stability of the 1 % (v/v) tributyrin emulsion in the bilayer system was analysed. Microtiter plates were sealed with self-sticking aluminium foil and polyethylene cling film and stored at room temperature in the dark. Changes of the extinction at 595 nm and of the mass during the storage were studied.

## Results and discussion

### Development of the turbidity assay

An addition of an aqueous lipase solution to the substrate layer leads to clearing of the emulsion and a corresponding decrease of its extinction (Fig. 2a). The process starts immediately after enzyme addition and has a trend to saturation within a few hours. Addition of water instead of lipase solution leads to a very small variation of extinction. The initial slope of signal kinetic depends on the amount of the enzyme injected into the microtiter plate cavity (Fig. 2b). This dependence was linear at



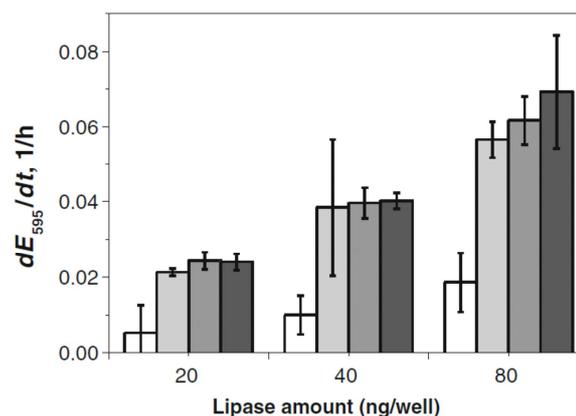
**Fig. 2** (a) Kinetics of the extinction changes because of hydrolysis of tributyrin by *T. lanuginosus* lipase. Addition: 200 ng enzyme per well (squares), 20 ng enzyme per well (triangles), zero amount of enzyme (circles). The moment of addition corresponds to the zero point of the time scale. The measurements were performed at  $\lambda=595$  nm in a bilayer system formed in the wells of the microtiter plate. (b) Dependence of the rate of change of extinction ( $\frac{dE_{595}}{dt}$ ) on the amount of *T. lanuginosus* lipase injected. The experimental points were fitted by hyperbolic function  $\frac{dE_{595}}{dt} = \frac{0.4}{530 \text{ ng/well} + c}$ . The linear part of the curve corresponding to low concentrations of lipase is shown in the *inset*. The presented data are the mean values; the *error bars* correspond to standard deviations calculated from the data for eight wells

small enzyme concentrations, an increase leads to saturation. For the *T. lanuginosus* lipase a deviation from linearity is observed at over 200 ng enzyme per well. This concentration corresponds to an enzyme activity of 0.3 mU/well based on measurements using the *p*-nitrophenyl palmitate assay. The concentration dependence can be described by hyperbolic dependence:

$$\frac{dE_{595}}{dt} = \frac{0.4c}{27\mu\text{g/ml} + c}, \quad (2)$$

where  $\frac{dE_{595}}{dt}$  is the change of extinction at 595 nm per hour and  $c$  is the lipase concentration in  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . This dependence formally corresponds to the Langmuir adsorption isotherm and the value of  $1/27 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $1.2 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ ) can be regarded as an appeared Langmuir adsorption constant characterizing the affinity of the enzyme to the surface of substrate droplet. From the data of Pinholt et al. [37] studying adsorption of the same type of lipase on hydrophobic surfaces and from the data of Sugiura and Isobe [38] studying adsorptive properties of lipase from *Chromobacterium* we can obtain the values of the adsorption constant  $1.8 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$  (calculated from Fig. 4 in Ref. [37]) and  $1.7 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$  (calculated from Fig. 4 in Ref. [38]) which are very close to our experimental data. Therefore we suggest that empirical Eq. (2) relates to physical adsorption of lipase onto the surface of tributyrin droplets. According to the concept of lipase activation on the substrate surface [39, 40], this is the key step in the kinetics of lipolysis.

Implementation of a new system as a kinetic assay for enzyme activity requires proof that the reaction rate is not limited by substrate concentration. Application of different amounts of substrate showed that the initial extinction values increased with increasing tributyrin concentration as  $0.79 \pm 0.07$ ,  $0.84 \pm 0.05$ ,  $0.97 \pm 0.03$ , and  $0.98 \pm 0.05$  for tributyrin content of 0.25 %, 0.5 %, 0.75 %, and 1 % (v/v), respectively. However, for substrate concentrations  $\geq 0.5$  % an increase of the values  $\frac{dE_{595}}{dt}$  for increasing substrate content was within statistical deviation (Fig. 3). For example, doubling the substrate content (from 0.5 % to 1 %) led to just a 1.14–1.20-fold increase of the enzymatic activity. For the normalized values  $\frac{dE_{595}}{dt} \frac{1}{E_0 - E_1}$  (where  $E_0$  and  $E_1$  are initial extinctions of the system with and without substrate, respectively) no dependence on substrate



**Fig. 3** Effect of substrate concentration on the initial kinetics of lipolysis measured as the rate of change of extinction ( $\frac{dE_{595}}{dt}$ ). The substrate layer contained 0.25 % (white), 0.5 % (light grey), 0.75 % (grey) or 1 % (dark grey) (v/v) tributyrin. The presented data are the mean values; the *error bars* correspond to standard deviations for four experiments

concentration for tributyrin contents of 0.5 % or higher was observed (Electronic Supplementary Material, Fig. S1). Therefore, we conclude that the lipase activity in the suggested system and in the studied concentration range is not limited by the substrate. Only at lower substrate concentration (below 0.5 %) the reaction rate is affected by the substrate. The dependence of the reaction rate on substrate concentration for the concentration range below 0.5 % (corresponding to 17 mmol L<sup>-1</sup>) was also observed by Smeltzer et al. [5], however they suggested working at a substrate concentration of 0.25 % (8.5 mmol L<sup>-1</sup>). We selected a higher substrate concentration of 1 % (34 mmol L<sup>-1</sup>). This enabled us to realize conditions under which the reaction rate is not affected by substrate even at much higher lipase concentrations.

The measured signal dependence on enzyme concentration can be used as a calibration for quantitative determination of lipolytic activity. The absolute values can be obtained by comparison with another technique. However, one has to take into account that some compounds used in these assays (dyes, detergents) and possible organization of substrate molecules into micelles or other aggregates can affect the measured lipase activity.

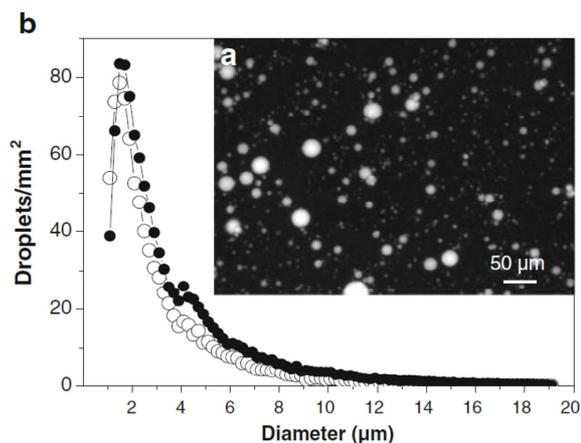
#### Droplet-size distribution and optical extinction spectra

The distribution of the droplet size of tributyrin in the substrate layer was determined by using an automated system (VideoScan) providing optical microscopy and image analysis. Therefore, 1 % tributyrin emulsion in either agar (2 %, w/v) or agarose (1.4 %, w/v) was used. The droplet size distribution obtained is presented in Fig. 4. For both gel-forming agents the droplet diameter measured in the range between 1.0 and 20 μm had a peak at 1.5 μm and the mean distance between droplets was approximately 20 μm.

The optical extinction spectra of the system before and after hydrolysis are presented in the Fig. 5a. The spectra were fitted by the function:

$$E_{\lambda} = \frac{a}{\lambda^n} + b, \quad (3)$$

where  $a$ ,  $b$ , and  $n$  are fitting constants. The fitting demonstrated that the hydrolysis leads to a strong decrease of the wavelength-independent component  $b$  and to an increase of the exponential factor  $n$ . The light scattering by an emulsion with a droplet size much below the light wavelength can be described by Rayleigh scattering with a wavelength dependence  $\sim \frac{1}{\lambda^4}$ , therefore  $n$  is equal to 4. If the size of the emulsion particles is comparable with the wavelength, a Mie scattering mode with wavelength dependence of approximately  $\frac{1}{\lambda}$  is expected ( $n=1$ ). For the large droplets in the emulsion geometrical, wavelength-independent light scattering is expected



**Fig. 4** Droplets of tributyrin in agar (2 %, w/v) visualized with Nile red staining (**a**) and droplet size distribution (**b**) of 1 % tributyrin emulsion in agar (filled circles) or in agarose (empty circles). The number of droplets was measured in the optically selected layer with thickness of 60 μm

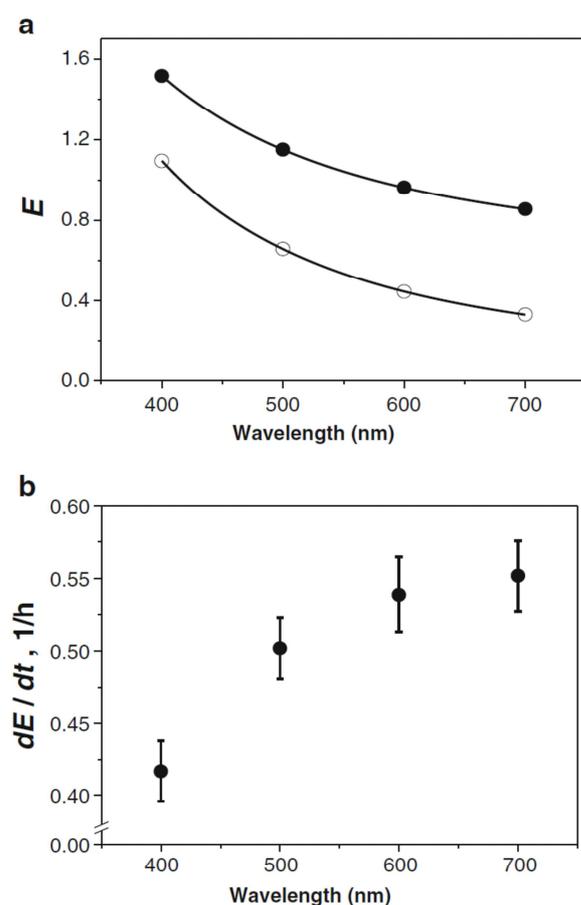
( $n=0$ ). Our results (caption to Fig. 5) demonstrate that the light scattering by the system before hydrolysis was somewhere between the Mie and geometrical scattering modes:  $b=0.604 \pm 0.001$ ,  $n=2.291 \pm 0.004$ . The hydrolysis of tributyrin led to a strong decrease of the wavelength-independent component  $b$  and to an increase of the exponential factor  $n$ :  $b=0.091 \pm 0.09$ ,  $n=2.56 \pm 0.04$ . Therefore, the hydrolysis results in the change of the scattering mode from the wavelength-independent geometric scattering toward the Mie mode with  $\frac{1}{\lambda}$  wavelength dependence. This indicates a decrease of the droplet size during the hydrolysis. This effect was also described by Jurado et al. [41]. It should be noted that the larger droplets contribute much more to the measured signal. The decrease of the droplet size during hydrolysis leads to greater sensitivity at longer wavelength (Fig. 5b). For this reason, the wavelength of 595 nm was selected for the assay.

#### Influence of gel-forming agent on extinction

The usual approach for stabilization of aqueous emulsions of hydrophobic compounds by surfactants is not suitable for development of a lipase assay: an effect of surfactants on lipolysis rate is well documented [29–32]. Therefore, stabilization of the tributyrin emulsion was performed by using gel-forming agents preventing diffusion of tributyrin droplets. A possible effect of these agents on the turbidity assay was studied. Agar, agarose, and polyacrylamide were compared. Agar is a complex mixture of polysaccharides of the same backbone structure partially substituted by anionic groups. Agarose has the same backbone structure but no charged substituents and provides a higher gelling ability [42]. Taking into account that agar contains approximately 70 %

8544

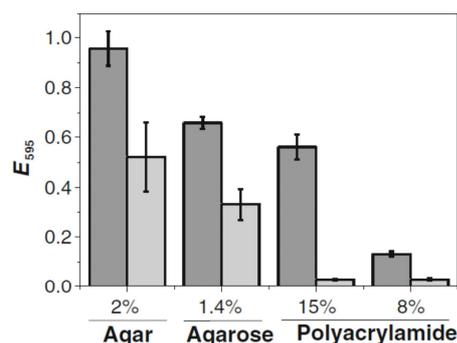
S. Barig et al.



**Fig. 5** Extinction spectra of the bilayer system before (filled circles) and after (empty circles) hydrolysis of tributyrin by *T. lanuginosus* lipase (a) and the dependence of the rate of change of extinction on the wavelength during the initial stage of hydrolysis (b). The spectra were fitted by the function  $E_{\lambda} = \frac{a}{\lambda^n} + b$  with the following values: before hydrolysis:  $a = 8.4 \times 10^5 \pm 2.2 \times 10^4$ ,  $b = 0.604 \pm 0.001$ ,  $n = 2.291 \pm 0.004$ ; after hydrolysis:  $a = 4.7 \times 10^7 \pm 1.1 \times 10^7$ ,  $b = 0.091 \pm 0.009$ ,  $n = 2.564 \pm 0.041$ . The presented data are the mean values; the error bars correspond to standard deviations calculated for four wells

agarose, 1.4 % (w/v) agarose was compared with 2 % (w/v) agar. Although the extinction of the layer of agarose gel is lower, the extinction increase due to tributyrin emulsion is the same as for agar (Fig. 6). Lipase concentration dependence for the agarose-stabilized assay is also the same as for the agar-stabilized assay (data not shown). Taking into account that the droplet size distribution in both experimental systems was also almost identical, one can conclude that the behaviour of the assay systems with agar and agarose is about the same. Agarose is a better defined compound whereas agar is essentially less expensive.

Polyacrylamide as the third gel-forming agent was studied because of its lower background extinction (Fig. 6) and higher temperature stability. Difficulties in polymerization



**Fig. 6** Effect of the gel-forming agents on the extinction of the bilayer system with (dark grey) or without (light grey) 1 % emulsified tributyrin prepared in microtiter plates. The presented data are the mean values; the error bars correspond to standard deviations for 20 wells

of acrylamide in thin layers required an increase of the substrate layer from 1.0 mm to 2.6 mm. This led to the corresponding increase of the amount of substrate in the well.

Gels with 8 % or 15 % (v/v) acrylamide and 0.2 % or 0.4 % (v/v) bisacrylamide, respectively, were studied. The difference between extinction of the assay systems with and without tributyrin was very small for 8 % gels, but for 15 % gels this value is similar to that for the agar assay system. However, a normalization to the amount of tributyrin leads to a smaller value. Addition of lipase to both polyacrylamide-based systems resulted in changes of extinction approximately a factor of ten lower during tributyrin hydrolysis. The reason for the decrease is most probably an effect of the gel-forming agent on diffusion of the enzyme (see below for details). Therefore, these polyacrylamide gels are not suitable for the turbidity assay.

#### Analysis of diffusion conditions

All studied bilayer systems resembled typical gels with very high viscosity; literature data on polyacrylamide gel give a value of over seven orders of magnitude of viscosity increase during polymerization [43]. However, it may not correlate with microviscosity, which determines diffusion of molecules. To investigate diffusion conditions of lipase in the substrate layers containing gel-forming agents, diffusion coefficients for three test molecules (neutral red, cytochrome c, and blue dextran) of size smaller or larger than the enzyme were measured by observation of movement kinetics of the dye front injected into tubes filled with different gels (Electronic Supplementary Material, Fig. S2a). Linear dependence between diffusion time  $t$  and square of the mean diffusion displacement  $l$  demonstrated that the diffusion obeys the classical rule without anomalies observed for some liquids containing a macromolecular matrix. The values of the diffusion coefficients obtained are shown in

**Table 1** Diffusion coefficients of three molecules of different size in buffer (500 mmol L<sup>-1</sup> phosphate, pH 7.0) containing various gel-forming agents

Compound		Diffusion coefficients (m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ) in gels of:			
Name	Molecular mass (g mol <sup>-1</sup> )	Agar 2 %	Agarose 1.4 %	Polyacrylamide	
				8 %	15 %
Neutral red	389	1.1 × 10 <sup>-9</sup>	1.4 × 10 <sup>-9</sup>	5.9 × 10 <sup>-10</sup>	2.9 × 10 <sup>-10</sup>
Cytochrome c	12400	1.8 × 10 <sup>-10</sup>	2.1 × 10 <sup>-10</sup>	4.5 × 10 <sup>-11</sup>	No diffusion observed
Blue dextran	2000000	2.7 × 10 <sup>-11</sup>	2.7 × 10 <sup>-11</sup>	No diffusion observed	No diffusion observed

Table 1. The results were analysed by use of the Stokes–Einstein equation (Electronic Supplementary Material, Fig. S2a). For all test molecules the values of microviscosity in agar and agarose were found to be very similar to the viscosity of water (Electronic Supplementary Material, Fig. S2b). This means that these polymer networks have almost no effect on diffusion of the test molecules. Taking into account that the size of lipase is within the size range of the selected test molecules, one can conclude that lipase diffusion in these gels also is not affected by these gel forming agents and has about the same rate as in aqueous solutions without polymeric compounds.

The effect of the polyacrylamide gel on the microviscosity is significantly higher (Electronic Supplementary Material, Fig. S2 and Table 1). For the biggest molecule (blue dextran) no diffusion is observed during three days. Even for the smallest molecule (neutral red) the value of microviscosity is higher than the viscosity of water. The microviscosity of 15 % gel is twice that of 8 % gel. The observed higher microviscosity of polyacrylamide gels indicates a more densely organized polymer network. This is most probably the reason for the much lower lipase activity in this medium. Therefore, such gel-forming agents are not suitable for turbidity assays.

The data on the diffusion conditions enable us to discuss the kinetic mechanism of lipolysis. The system is mechanically stabilized by a polymeric network of gel-forming agent which prevents movement of substrate droplets but does not affect the diffusion of enzyme molecules. The mean distance between the substrate droplets is approximately 20 μm. An enzyme with a diffusion coefficient of ~10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> (Table 1) would need approximately 1 s for this distance. The turnover time of *T. lanuginosus* lipase estimated from the value of its specific activity is 7 ms. Therefore, hopping to another substrate droplet during lipolysis is a relatively rare event, and a lipase molecule adsorbed on the interface of substrate droplets should stay on its surface. Such behaviour is highly compatible with the scooting mode of lipolysis, and a hopping mode seems unlikely [44]. A conclusion on the scooting mode was previously made during investigation of lipid hydrolysis by

phospholipase A<sub>2</sub> [16]; strong adsorption of that enzyme was explained on the basis of electrostatic interactions [11].

#### Glycerol release

Complete hydrolysis should lead to the formation of fatty acids and glycerol. However, analysis of glycerol content after 2 h hydrolysis (this time corresponds to saturation of the extinction changes) resulted in a reaction yield of only 4 %. This can be explained within the model of Jurado et al. postulating that the lipolysis proceeds in two partially overlapping stages [45]. During the first reaction stage one of the outer ester groups of tributyrin is hydrolysed, and the interface becomes saturated with dibutyryl. The hydrolysis of the second ester bond is considerably slower, therefore the reaction is inhibited at this stage. However, the surface activity of dibutyryl is also relatively low, and the low glycerol yield can be also explained by high solubility of mono and dibutyryls released into the water phase, thus becoming less accessible to the interfacially active *T. lanuginosus* lipase. Therefore, the hydrolysis of monobutyryl and formation of glycerol is a very slow process which occurs much later than the clearance of the suspension. The solubility issue makes impossible an application of natural long chain substrates in this assay—in this case the solubility of products is too small, and the hydrolysis does not lead to the clearance of the substrate suspension.

**Table 2** Detection limit and linear range for different lipases

Lipase	Limit of detection (ng/well)	Linear range (ng/well)
Fungal <i>Candida rugosa</i>	60	180
<i>Rhizomucor miehei</i>	20	200
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	20	200
Bacterial <i>Burkholderia cepacia</i>	20	140
<i>Chromobacterium viscosum</i> , type XII	20	200
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	20	200
Animal Porcine pancreatic lipase, type II	40	200

### Storage stability

Long-term stability of tributyrin emulsion entrapped in the gels is complicated by two factors. The first is water evaporation. This problem can be overcome by sealing the prepared microtiter plates or by storage at high humidity. For example, storage of microtiter plates, prepared for the lipase assay and sealed with self-sticking aluminium foil and polyethylene cling film leads to loss of less than 1 % of mass during ten weeks of storage at room temperature.

The second factor is a consequence of thermodynamics: fusion of micro-droplets is energetically favourable. This effect is known as Ostwald ripening. Estimation of the kinetics of this effect can be achieved by use of the widely accepted Lifshitz–Slyozov model [46]. With the physical properties of the tributyrin suspension used in the lipase assay (droplet diameter 1.5  $\mu\text{m}$ , critical micelle concentration of tributyrin 0.5  $\text{mmol L}^{-1}$  [47], interfacial tension of tributyrin in the measurement buffer of 15  $\text{mN m}^{-1}$  (our measurements with an oil-drop tensiometer)) and with a calculation of the diffusion coefficient of tributyrin molecules using the Stokes–Einstein equation for a molecular radius of 0.35 nm, a doubling time for the mean droplet size of  $\sim 5000$  s was calculated. In the experiment the temporal stability of the tributyrin micro-droplets was much better. The time until extinction decreased to about 50 % of the original value was approximately ten weeks at room temperature. This large difference from the Lifshitz–Slyozov model might be a result of the gel-forming agent: interaction of growing droplets inside the polymeric network probably leads to distortion of their spherical shape and therefore to a much higher energy.

Poor stability of tributyrin emulsions has been discussed in the literature. Li et al. improved emulsion stability by incorporation of  $\geq 15$ –25 % corn oil [48]. Another possible approach is based on addition of a well characterized non-ionic surfactant, for example Triton-X100 [49]. However, because of a possible effect of surfactants on the enzyme this approach is not suitable for a quantitative lipase assay. Therefore, the storage of the prepared microtiter plates for more than two weeks cannot be recommended, because it leads to loss of assay sensitivity.

### Application of the turbidity assay

The assay developed and optimized using *T. lanuginosus* lipase was tested with six other lipolytic enzymes (Table 2): lipases from *Burkholderia cepacia*, *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum* type XII, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizomucor miehei*, and porcine pancreas type II. The initial slope of the kinetic signal was analysed for different amounts of lipase. The results indicate that for all the lipases studied the limit of detection is below 100 ng/well. For *T. lanuginosus* lipase the limit of detection is 20 ng/well which is equivalent to the activity of 30  $\mu\text{U}$ /well determined by

*p*-nitrophenol assay. One can expect that realization of this assay on 384-well or 1536-well microtiter plates with correspondingly smaller well size is a simple way to reduce the minimum amount of enzyme. A calibration curve for quantitative determination of lipolytic activity can be obtained by use of a standard, well characterized, and stable lipase. The lipase from *T. lanuginosus* is a good candidate for this purpose [50].

### Conclusion

A rapid and simple quantitative assay for determination of the activity of lipolytic enzymes has been developed. The optimized assay was prepared from 1 % tributyrin emulsion in 2 % agar gel. The assay provides high throughput and requires only a small sample volume. It can be realized in each clinical or industrial laboratory using standard readers for microtiter plates. The assay can be easily adapted to different lipases favouring specific pH, temperature, or requiring different ions or cofactors for their activity. Furthermore, realization of the assay in the format of microtiter plates offers a simple possibility to study variations of these conditions. Zero enzyme concentration leads to zero value of the measurement signal ( $dE/dt$ ) of the turbidity assay. This enables one to combine this assay with a technique of standard additions which can be useful for lipase analysis in a complex matrix.

**Acknowledgement** The work was supported by Brandenburg ministry for science and culture. The authors are grateful to Professor Dr-Ing. K. Schnitzlein, Dr R. Schmid and Ph.D. students S. Schröter and M. Muth for fruitful discussions.

### References

1. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC (2001) Production, purification, characterization, and application of lipases. *Biotechnol Adv* 19:627–662
2. Koizumi M, Takada T, Kawarada Y, Hirata K, Mayumi T, Yoshida M, Sekimoto M, Hirota M, Kimura Y, Takeda K, Isaji S, Otsuki M, Matsuno S (2006) JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: diagnostic criteria for acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 13:25–32
3. Matull WR, Pereira SP, O'Donohue JW (2006) Biochemical marker of acute pancreatitis. *J Clin Pathol* 59:340–344
4. Roloff J, Hedström SA, Nilsson-Ehle P (1984) A simple turbidimetric method for specific measurement of *Staphylococcus aureus* lipase activity. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect B* 92:155–158
5. Smeltzer MS, Hart ME, Iandolo JJ (1992) Quantitative spectrophotometric assay for staphylococcal lipase. *Appl Environ Microbiol* 58:2815–2819
6. Jensen RG (1983) Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids* 18:650–657
7. Beisson F, Tiss A, Rivière C, Verger R (2000) Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur J Lipid Sci Technol* 102:133–153

8. Gupta R, Rathi P, Gupta N, Bradoo S (2003) Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol Appl Biochem* 37:63–71
9. Nury S, Piéroni G, Rivière C, Gargouri Y, Bois A, Verger R (1987) Lipase kinetics at the triacylglycerol-water interface using surface tension measurements. *Chem Phys Lipids* 45:27–37
10. Colacicco G, Rapport MM (1966) Lipid monolayers: action of phospholipase A of *Crotalus atrox* and *Naja naja* venoms on phosphatidyl choline and phosphatidyl choline. *J Lipid Res* 7:258–263
11. Mirsky VM (1994) Effect of the lipid hydrolysis products on the phospholipase A<sub>2</sub> action towards lipid monolayer. *Chem Phys Lipids* 70:75–81
12. Mirsky VM, Krause C, Heckmann KD (1996) Capacitive sensor for lipolytic enzymes. *Thin Solid Films* 284(285):939–941
13. Mirsky VM, Mass M, Krause C, Wolfbeis OS (1998) Capacitive approach to determine phospholipase A<sub>2</sub> activity towards artificial and natural substrates. *Anal Chem* 70:3674–3678
14. El Kirat K, Morandat S, Dufrière YF (2010) Nanoscale analysis of supported lipid bilayers using atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1798:750–765
15. Mirsky VM, Cherny VV, Sokolov VS, Markin VS (1990) Electrostatic assay of phospholipase A activity: an application of the second harmonic method of monitoring membrane boundary potentials. *J Biochem Biophys Meth* 21:277–284
16. Cherny VV, Sikhuralidze MG, Mirsky VM, Sokolov VS (1993) Potential distribution on the lipid bilayer membrane due to phospholipase A<sub>2</sub> activity. *Biol Mem* 6:971–982 (translation of (1992) *Biologicheskie Membrany* 9:733–740)
17. Walde P, Luisi PL (1989) A continuous assay for lipase in reverse micelles based on fourier transform infrared spectroscopy. *Biochem* 28:3353–3360
18. Bronscheuer UT, Kazlauskas RJ (2006) *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations*. Wiley-VCH, Weinheim
19. Winkler UK, Stuckmann M (1979) Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 138:663–670
20. Helistö P, Korpela T (1998) Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanolate esters method. *Enzyme Microb Technol* 23:113–117
21. Schmidt-Dannert C, Sztajer H, Stöcklein W, Menge U, Schmid RD (1994) Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. *Biochim Biophys Acta* 1214:43–53
22. Proelss HF, Wright BW (1977) Lipogenic micromethod for specific determination of lipase activity in serum and duodenal fluid. *Clin Chem* 23:522–531
23. Ulitzur S (1979) A sensitive bioassay for lipase using bacterial bioluminescence. *Biochim Biophys Acta* 572:211–217
24. Aoubala M, Ivanova M, Douchet I, De Caro A, Verger R (1995) Interfacial binding of human gastric lipase to lipid monolayers, measured with an ELISA. *Biochem* 34:10786–10793
25. Lawrence RC, Fryer TF, Reiter B (1967) Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. *Nature* 213:1264–1265
26. Lima N, Teixeira JA, Mota M (1991) Deep agar-diffusion test for preliminary screening of lipolytic activity of fungi. *J Microbiol Methods* 14:193–200
27. Samad MYA, Razak CNA, Bakar Salleh A, Wan Yunus WMZ, Ampon K, Basri M (1989) A plate assay for primary screening of lipase activity. *J Microbiol Methods* 9:51–56
28. Owusu RK, Makhzoum A, Knapp JS (1992) Heat inactivation of lipase from psychrotrophic *Pseudomonas fluorescens* P38: activation parameters and enzymes stability at low or ultra-high temperatures. *Food Chem* 44:261–268
29. Delorme V, Dhoubib R, Canaan S, Fotiadu F, Carrière F, Cavalier JF (2011) Effects of surfactants on lipase structure, activity, and inhibition. *Pharm Res* 28:1831–1842
30. Aloulou A, Puccinelli D, Caro AD, Leblond Y, Carrière F (2007) A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity. *Biochim Biophys Acta* 1771:1446–1456
31. Sonesson AW, Elofsson UM, Brismar H, Callisen TH (2006) Adsorption and mobility of a lipase at a hydrophobic surface in the presence of surfactants. *Langmuir* 22:5810–5817
32. Morgensen JE, Sehgal P, Otzen DE (2005) Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. *Biochem* 44:1719–1730
33. Jha BK, Svensson M, Kronberg B, Holmberg K (1999) Titration microcalorimetry studies of the interaction between *Humicola lanuginosa* lipase and ionic surfactants. *J Coll Interf Sci* 213:262–264
34. Barig S, Alisch R, Nieland S, Wuttke A, Gräser Y, Huddar M, Schnitzlein K, Stahmann KP (2011) Monoseptic growth of fungal lipase producers under minimized sterile conditions: cultivation of *Phialemonium curvatum* in 350 L scale. *Eng Life Sci* 11:387–394
35. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
36. Grossmann K, Roggenbuck D, Schröder C, Conrad K, Schierack P, Sack U (2011) Multiplex assessment of non-organ-specific autoantibodies with novel microbead-based immunoassay. *Cytometry A* 79A:118–125
37. Pinholt C, Fano M, Wiberg C, Hostrup S, Thostrup Bukrinsky J, Frokjaer S, Norde W, Jorgensen L (2010) Influence of glycosylation on the adsorption of *Thermomyces lanuginosus* lipase to hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Eur J Pharm Sci* 40:273–281
38. Sugiura M, Isobe M (1975) Studies on the mechanism of the lipase reaction II. Comparative studies on the adsorption of lipase and various proteins at the air-water interface. *Biochim Biophys Acta* 397:412–417
39. Brockerhoff H (1974) In: Whitaker JR (ed) *Food related enzymes*. American Chemical Society, Washington, DC
40. Ali YB, Verger R, Abousalham A (2012) In: Sandoval G (ed) *Lipases and phospholipases: methods and protocols*. Springer, New York
41. Jurado E, Camacho F, Luzón G, Fernández-Serrano M, García-Román M (2006) Kinetic model for the enzymatic hydrolysis of tributyrin in o/w emulsions. *Chem Eng Sci* 61:5010–5020
42. Duckworth M, Yaphe W (1971) The structure of agar: part 1. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr Res* 16:189–197
43. Savart T, Dove C, Love BJ (2010) In situ dynamic rheological study of polyacrylamide during gelation coupled with mathematical models of viscosity advancement. *Macromol Mater Eng* 295:146–152
44. Jain MK, Berg OG (1989) The kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A<sub>2</sub> and regulation of interfacial activation: hopping versus scooting. *Biochim Biophys Acta* 1002:127–156
45. Jurado E, Camacho F, Luzón G, Fernández-Serrano M, García-Román M (2008) Kinetics of the enzymatic hydrolysis of triglycerides in o/w emulsions, study of the initial rates and the reaction time course. *Biochem Eng J* 40:473–484
46. Lifshitz IM, Slyozov VV (1961) The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions. *J Phys Chem Solids* 19:35–50
47. Murphy CA, Cameron JA, Huang SJ, Vinopal RT (1998) A second polycaprolactone depolymerase from *Fusarium*, a lipase distinct from cutinase. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:692–696
48. Li Y, Le Maux S, Xiao H, McClements DJ (2009) Emulsion-based delivery systems for tributyrin, a potential colon cancer preventative agent. *J Agric Food Chem* 57:9243–9249
49. Kwan SF, Hunt RJ (1995) Lipase single reagent system. U.S. Patent 5,378,609
50. Fernandez-Lafuente R (2010) Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J Mol Catal B Enzym* 62:197–212

## 8. Gelistete Veröffentlichungen als Patentanmeldung, Poster und Vorträge

### Patentanmeldung

- 1) Susann Barig, K.-Peter Stahmann, Klaus Schnitzlein, Sandra Schröter. Wasserfreie Immobilisierung von Enzymen. Anmeldung erfolgte am 13.05.2013 mit der amtlichen Anmelde Nummer 10 2013 104 906.0.

### Posterpräsentationen

- 1) Susann Barig, Romy Alisch, Janine Schubert, Susanne Nieland, Anne Wuttke, K.-Peter Stahmann. Identification of an acidic lipase activity from *Phialemonium curvatum* and comparison with two other fungal lipases in a newly developed two-layer assay. VAAM Jahrestagung 2011, Karlsruhe.
- 2) Susann Koall, Susanne Nieland, Anne Wuttke, K.-Peter Stahmann. Robust and cheap lipase production process using *Phialemonium spec.* AW02. VAAM Jahrestagung 2008, Frankfurt/ Main.

### Vorträge

- 1) Susann Barig, Romy Alisch, Susanne Nieland, K.-Peter Stahmann. Secreted but cell-wall associated lipases by *Phialemonium spec.* AW02 allow easy down-stream processing. VAAM Jahrestagung 2009, Bochum.
- 2) Susann Barig, Romy Alisch, Susanne Nieland, Klaus Schnitzlein, Mahesh Huddar, K.-Peter Stahmann. From Petri Dish to 350 Litre Scale: robust monoseptic Cultivation of fungal Biofilms under non-sterile Conditions. DECHEMA Himmelfahrtstagung 2010, Nürnberg.
- 3) Susann Barig, Romy Alisch, Susanne Nieland, K.-Peter Stahmann. Lipase production by fungi: robust monoseptic cultivation system under non-sterile conditions. VAAM Symposium: Biotransformation by Fungal Cells or Fungal Enzymes. September 2010, Hochschule Lausitz (FH), Senftenberg.

## 9.2 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**„Beiträge zur Steigerung der industriellen Verwendung mikrobieller Lipasen:  
Produktion und Immobilisierung  
sowie Entwicklung eines quantitativen Nachweissystems“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Ich versichere, dass die elektronische Version der Dissertation mit der gedruckten übereinstimmt.

A handwritten signature in blue ink that reads "Susann Bärig".

Cottbus, im Juli 2014