

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Schlussbericht

Technische Informationsbibliothek

Entwicklung eines enzymatischen Produktes zur biobasierten Farbstoffentfernung -ENFA-

Prof. Dr. Jörg Matysik

Dr. Janine Kirchberg

Dr. Johannes Taubert

Förderkennzeichen: 031B1321

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen: 031B1321 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.“

- Gesamtziel des Vorhabens

Das Ziel des Vorhabens beruhte auf der Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur schonenden und effizienten Entfernung von Graffiti auf sämtlichen Flächen. Dabei sollen Enzyme aus Mikroorganismen Anwendung finden, die in der Lage sind diese Verbindungen abzubauen. Mikrobielle Enzyme sind hinreichend bekannt für den Abbau von Xenobiotika und anthropogen verursachten Kontaminationen. Das Vorhaben zielt darauf ab spezifische Lösungen/Gemische zu entwickeln, die auf sämtlichen Graffiti aufgetragen werden können und die enthaltenen Enzyme die Farbstoffe/Pigmente abbauen. Die Ergebnisse sollen in einem anwendbaren Produkt enden, dass auf eine mit Graffiti kontaminierte Fläche aufgetragen oder aufgesprüht wird und die Pigmentlösung wieder restlos aufgefangen werden kann ohne dass es in die Umwelt gelangt. Die Ergebnisse sollen als Grundlage dienen, um weitere umfangreiche Anwendungsgebiete zu erschließen, wie z.B. die Entfernung der farbgebenden Komponenten beim Kunststoffrecycling, die Renaturierung farbstoffkontaminierter Böden in der Umgebung von Färbereien der Textilindustrie (v.a. relevant in Entwicklungs- und Agrarländern), die Restaurierung alter Kulturgüter, wie Gemälde, Bilder, Rahmen, Skulpturen, Stuck, Fresken und die dermatologische Anwendung in Form der Tattoorentfernung.

- Stand der Wissenschaft und Technik

Azo- und Phthalocyaninpigmente, als häufigste farbgebende Bestandteile von Graffiti sind seit einigen Jahren im Fokus der Wissenschaft und die Fähigkeit von Organismen derartige Farbkomponenten abzubauen, ist durchaus bekannt und wird kontinuierlich untersucht. Die Schwierigkeit bei der Entfernung von Farbstoffen in der Textil-, Druck- und Graffitiindustrie ist das Vorhandensein von stabilen xenobiotischen Komponenten, welche einen Abbau und eine Entfernung als sehr herausfordernd darstellen. Jedoch konnten einige Studien das Potenzial von Mikroorganismen in diesem Feld erkennen lassen. Studien mit anaeroben Bakterien wie *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 13541 zeigten die Fähigkeit Lackbindemittel auf Nitrocellulosebasis abzubauen. Da jedoch anaerobe Bakterien restriktive Anwendung mit sich ziehen, wurde die Forschung eher auf aerobe Bakterien gerichtet. Die meisten bisher durchgeführten Forschungen beschäftigen sich mit der Isolierung von Bakterien auf Oberflächen von Graffiti und es gibt durchaus Potential Gattungen wie *Bacillus*, *Gordonia*, *Pseudomonas* und Mikrobakterium zur Biosanierung einzusetzen. Bisher blieb es allerdings bei Testungen und eine etablierte Methode existiert nicht. Studien mit verschiedenen Bakterienstämmen konnten zeigen, dass Graffiti nach Behandlung mit diesen Stämmen chemisch verändert wurden. Jedoch wird hier erwähnt, dass der Abbau nicht immer optisch sichtbar war, die Anwendung optimiert werden muss und eine Mischung der Stämme zur Behandlung der Oberflächen angestrebt wird. Auch andere Studien zeigten Untersuchungen von Bakterienstämmen, welche auf Graffitioberflächen angesiedelt sind. Identifizierte Stämme sind hier *Candida parapsilosis* und *Rhodococcus erythropolis*, durch deren Aufbringen auf Graffitioberflächen Oxidationsprozesse stattfinden, welche durch Infrarotspektroskopie nachgewiesen werden konnten. Jedoch wurde die Verwendung der Farbe als Substrat der Bakterien durch Zugabe von Detergenzien herbeigeführt bzw. verbessert. Bisher gibt es keine etablierten Verfahren, in denen mikrobielle Enzyme zur Graffitientfernungen erfolgreich eingesetzt werden. Die wenigen Forschungen die dazu bekannt sind, scheinen sich eher auf die Mikroorganismen als Ganzes zu konzentrieren, während im ENFA-Projekt Kandidatenenzyme aus Pilzstämmen produziert und isoliert werden sollen. Das erhaltene Enzym oder ein Enzymgemisch soll hinsichtlich der Stabilität und Aktivität durch Engineering dabei optimiert werden und so effektiver in seiner Funktion zum Einsatz kommen. Eine intensive Patent- und Literaturrecherche ergab, dass das Vorhaben des ENFA-Projektes kein Gegenstand anderweitiger Entwicklungen und Patente ist und keine Schutzrechte oder Schutzrechtsanmeldungen der späteren Ergebnisverwertung entgegenstehen

- Ablauf des Vorhabens

Im Projektvorhaben wurden Pigmentklassen ausgewählt, die am häufigsten in Graffiti verwendet werden. Die Pigmentklassen umfassen je einen Vertreter der Diketopyrrolopyrrol-(DPP)-Pigmente (Pigment Red 254), Phthalocyanin-Pigmente (Pigment Blue 15) und der Azofarbstoffe (Pigment Yellow 13). Um eine mögliche Degradierung der Pigmente zu untersuchen wurden verschiedene Mikroorganismen verwendet, die im Co-Metabolismus mit speziellen Substraten kultiviert wurden. Als Substrate wurden Nebenprodukte der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie eingesetzt. Es wurden über 550 verschiedene Kulturansätze gewählt mit dem Ziel das enzymatische System zum Pigmentabbau nutzbar zu machen. Dafür wurden Wachstumsbedingungen gewählt, die den Ligninabbau simulieren und so die beteiligten Enzyme aktivieren. Die Parameter (pH-Wert, Medium, Substrat, Puffersubstanz, C-Quelle, N-Quelle, Temperatur, Agitation, C/N-Verhältnis, Vitamine, weitere Zusätze) wurden systematisch kombiniert und für 30 Tage kultiviert. Die Kultivierungsversuche, die eine visuelle Reduktion der Farbintensität zeigten, wurden für anschließende *In-Vitro*-Versuche ausgewählt.

- Wesentliche Ergebnisse / Zusammenarbeit

In der geförderten Sondierungsphase konnten für alle drei untersuchten Pigmentklassen Bedingungen gefunden werden, die zur Degradation dieser führten. Für Pigment Red 254 und Pigment Yellow 13 konnten Kultivierungsbedingungen identifiziert werden, die zum Abbau der Pigmente führten. *In-Vitro*-Versuche mit Kulturüberständen, die sezernierte Enzymgemische enthielten, zeigten einen vollständigen Abbau des Pigments Red 254 nach 24 h. Der Abbau von Pigment Yellow 13 konnte im *In-Vitro*-Versuch mit Kulturüberständen zu 70 % erfolgen. Es konnten mehrere Wachstumsbedingungen zum Abbau von Pigment Blue 15 durch verschiedene Pilzstämme identifiziert werden. Erste Versuche mit graffiti-behafteten Oberflächen zeigten eine geringe visuelle Reduktion der Farbintensität. Die umfangreichen Versuchsansätze und die erzielten Ergebnisse dienen bereits als Grundlage für die Fortführung des Projekts.

AP1 Durchführung der Wachstumsexperimente

1.1 Analyse der Wachstumsbedingungen

Für die im Arbeitspaket beschriebene umfangreiche Analyse der Wachstumsbedingungen wurden verschiedenen Mikroorganismen, Medien und Pigmente als C- und N-Quelle gewählt. In Graffiti-Farben enthaltene Pigmente können in verschiedene Substanzklassen eingeteilt werden. Die am häufigsten verwendeten Pigmente sind Diketopyrrolopyrrol-(DPP)-Pigmente, Phthalocyanin-Pigmente und Azofarbstoffe. Aus jeder Substanzklasse wurde der am häufigsten verwendete Vertreter in Graffiti-Farben für die Abbauxperimente gewählt. Dies sind Pigment Red 254 (DPP-Pigment), Pigment Blue 15 (Phthalocyanin-Pigment) und Pigment Yellow 13 (Azofarbstoff), welche äußerst stabil gegenüber Licht-, Umwelt- und chemischen Einflüssen sind. Besonders hervorzuheben sind die Lösemittel- und Witterungsbeständigkeit der genannten Pigmente.

Organismen, die das Potential haben Xenobiotika, wie synthetische Pigmente, abzubauen, wurden durch intensive Literaturrecherche ausfindig gemacht. Im Projektvorhaben werden folgende Stämme verwendet: *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Irpex lacteus*, *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Bjerkandera adusta*, *Lentinula edodes* und *Aspergillus ochraceus*. Bis auf den letztgenannten handelt es sich um Weißfäulepilze, die aufgrund ihrer enzymatischen Ausstattung in der Lage sind synthetische Verbindungen im Stoffwechsel umzusetzen. Durch ein besonderes enzymatisches System sind diese Organismen in der Lage hochkomplexe Verbindungen wie Lignin abzubauen. Um das enzymatische System zum Pigmentabbau nutzbar zu machen, wurden Wachstumsbedingungen gewählt, die den Ligninabbau simulieren und so die beteiligten Enzyme aktivieren. Das Ziel beinhaltet, dass die genannten Stämme durch die Nutzung verschiedener Kohlenstoffquellen (C-Quelle) im Co-Metabolismus die eingesetzten Pigmente abbauen. Dafür wurden landwirtschaftliche Nebenprodukte eingesetzt, die Lignin, Ligninderivate und weitere komplexe Kohlenhydrate enthalten (Tab. 1). Weiterhin wurden Mono-, Di- und Polysaccharide als C-Quelle verwendet. Als Stickstoffquelle (N-Quelle) wurden organische und anorganische Verbindungen genutzt (Tab. 1).

Tab.1 Auflistung der verwendeten Medienbestandteile

Medium	Puffer	pH-Wert	C-Quelle	N-Quelle	Zusätze
KMMI ¹ ,	10 mM Phosphat,	4,0	Weizen-, Raps-, Reisstroh,	NH ₄ -tartrat,	0,4 mM
KMMII ¹ ,	10 mM 2,2-DMS ³ ,	4,5	Haferspelzen, Reis-, Weizenkleie,	NH ₄ -chlorid,	Veratrylalkohol,
MEP ²	10 mM	5,0	Maiskorn, Cellulose, Weizen-	NH ₄ -oxalat,	0,1 % Tween 80,
	Essigsäure/Acetat	5,5	schlempe, Bierhefe + Treber,	Hefeextrakt,	10 ml/l Spuren-
			Ligninsulfonsäure, Glucose,	Pepton,	elementelösung ⁴ ,
			Fructose, Saccharose, Trehalose,	Bierhefe	0,001 g/l Thiamin
			Stärke, Pepton, Lignin		

¹Kirk's Minimalmedium: 1,54 mM KH₂PO₄; 0,4 mM MgSO₄·7H₂O; 0,09 mM CaCl₂; KMMI – anorg. N-Quelle; KMMII – org. N-Quelle

²Maltoseextrakt-Pepton-Medium: 3 % Malzextrakt; 0,3 % Pepton aus Soja

³2,2-Dimethylsuccinat

⁴25 mM MgSO₄; 3,3 mM MnSO₄; 17,1 mM NaCl; 0,36 mM FeSO₄·7H₂O; 0,77 mM CoCl₂; 0,35 mM ZnSO₄·7H₂O; 0,63 mM CuSO₄; 0,02 mM AlK(SO₄)₂·12H₂O; 0,16 mM H₃BO₃; 0,04 mM Na₂MoO₄·2H₂O; 7,85 mM Nitrotriacetat

Die Kulturen wurden überwiegend unter N-Mangelbedingungen (1 mM – 5 mM) kultiviert, um das enzymatische System zum Ligninabbau zu aktivieren. Des Weiteren wurden verschiedene Pufferbedingungen und pH-Werte getestet, wobei Phosphat- und 2,2-Dimethylsuccinatpuffer und ein pH-Wert von 4,5 die besten Effekte auf den Pigmentabbau zeigten. Allen Kulturen wurden Veratrylalkohol und Tween 80 zugegeben, um das Enzymsystem zum Ligninabbau zu induzieren. Zur Untersuchung der Effekte des Sauerstoffeintrags und der Mycelbildung, wurden alle Kulturen schüttelnd (120 Upm) und stationär bei 30 °C inkubiert. Nach 2 bis 7 Tagen wurden der jeweiligen Kultur die Pigmente in einer Konzentration von 0,005 % bis 0,02 % zugegeben und bis zu 31 Tagen

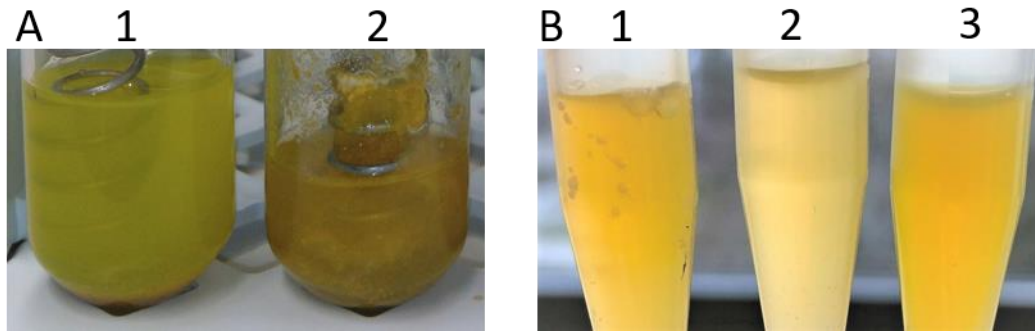
inkubiert. Die Anzahl der getesteten kombinierten Bedingungen (pH, Medium, Co-Substrat, Puffer, C-Quelle, N-Quelle usw.) sind für jeden Stamm unterschiedlich zusammengesetzt wurden, da jeder Stamm eine andere Wachstumsgeschwindigkeit aufwies. Die verwendeten Stämme zeigten beim Wachstum mit verschiedenen Substraten unterschiedliche Effekte auf die Pigmenteigenschaften (Tab. 2). Die Effekte bezüglich eines veränderten Farbspektrums oder einer visuellen Abnahme der Pigmentkonzentration waren frühestens nach zwei Wochen Wachstum in Anwesenheit der Pigmente zu erkennen, was durch die späte Aktivierung des Sekundärstoffwechsels zu erklären ist. Die verwendeten Substrate sind überwiegend Nebenprodukte der Landwirtschaft oder der Nahrungsmittelproduktion und entsprechen einer effizienten Ressourcennutzung. Dies verstärkt den Nachhaltigkeitsaspekt und die nationale Bioökonomiestrategie zusätzlich.

Tab. 2 Auflistung der verwendeten Stämme, der getesteten Wachstumsbedingungen sowie der Substrate mit dem größten Effekt auf die Pigmenteigenschaften

Stamm	Bedingungen	Substrate
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	65	Treber, Weizenschlempe, Reiskleie
<i>Pleurotus ostreatus</i>	69	Weizen-, Reisstroh
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	50	Pepton
<i>Irpex lacteus</i>	105	Treber, Weizenschlempe, Hefeextrakt
<i>Trametes versicolor</i>	84	Treber, Cellulose
<i>Trametes hirsuta</i>	53	Reiskleie, Cellulose, Haferspelzen
<i>Bjerkandera adusta</i>	60	-
<i>Lentinula edodes</i>	38	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>	26	Weizenkleie, Hefeextrakt

Kulturen die eine visuelle Abnahme oder andere Veränderung der Farbintensität zeigten, wurden auf ein Filterpapier gegeben, um das Pilzmycel und unlösliche Anteile zu trennen. Der gewonnene Kulturüberstand wurde zentrifugiert (15.000 x g, 10 min) und der Überstand 10-30fach konzentriert (*Centrifugal concentrator*, Vivaspin® 20, MWCO 10 kDa). Der konzentrierte Kulturüberstand, welcher potenzielle pigmentabbauende Enzyme enthält, wurde unter geeigneten Pufferbedingungen mit Pigmenten und Zusätzen (z.B. für die Enzymfunktion erforderliche Elektronenüberträger) versetzt und bei 30 °C inkubiert.

Im ursprünglichen Experiment mit dem Pilzstamm *Irpex lacteus* (*I. lacteus*) und Reiskleie als Substrat konnte eine Reduktion der Farbintensität nach 27 Tagen Wachstum in Anwesenheit von Pigment yellow 13 detektiert werden (Abb. 1A). Im *In-vitro*-Versuch (Abb. 1B) mit dem konzentrierten Kulturüberstand konnte ebenfalls eine Abnahme der Pigmentkonzentration nach 24 h im Ansatz 2 detektiert werden. Messungen der optischen Dichte bei 600 nm zeigten eine Abnahme im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 1B, Tube 1 und 2; und Abb. 1C). In Tube 2 ist im Vergleich zu Tube 1 dem Kulturüberstand Mangansulfat zugeführt wurden. Der hier visuelle Abbau des Pigment Yellow 13 lässt damit vermutlich auf eine manganabhängige Peroxidase von *I. lacteus* schließen (Abb. 1B). Tube 3 ist ein Kontrollansatz. Hier wurde der Kulturansatz hitzebehandelt, um Enzymreaktionen zu inaktivieren. Die Ergebnisse werden aktuell validiert und die Identifizierung der enzymatischen Komponente stellt den nächstfolgenden Schritt dar.



C

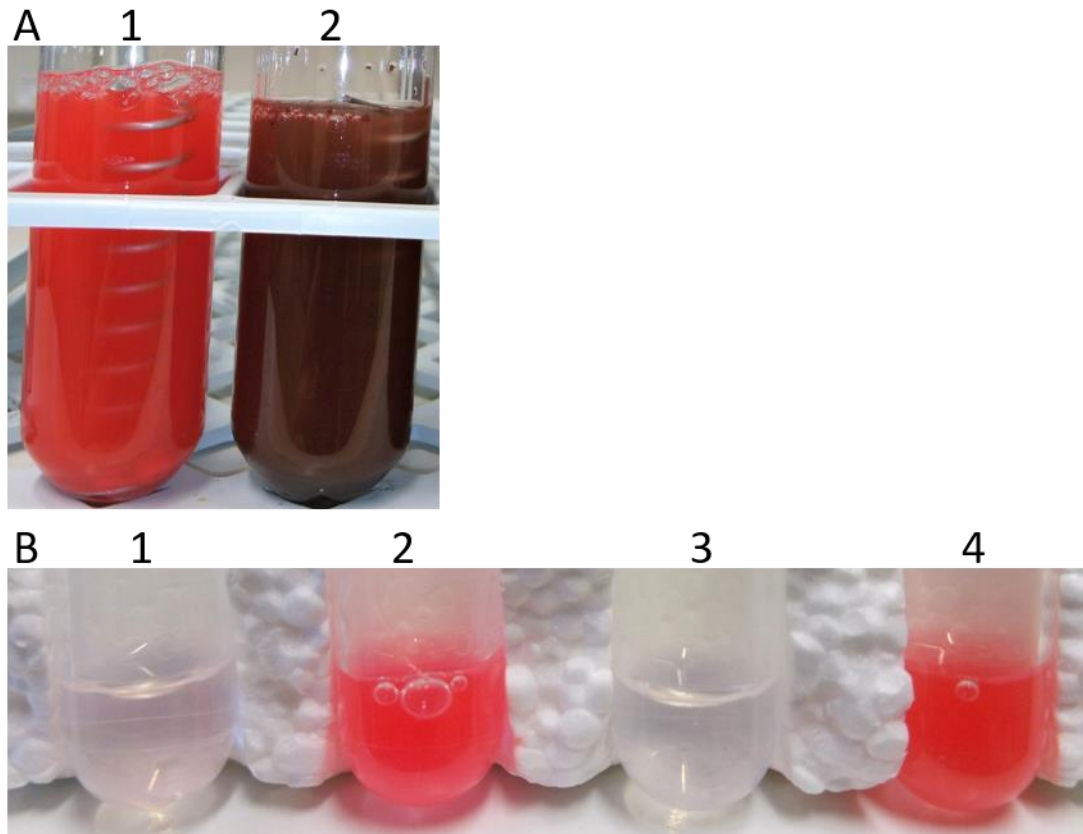
Tube	OD _{600 nm} vor Inkubation	OD _{600 nm} nach Inkubation
1	0,152	0,149
2	0,153	0,047
3	0,160	0,161

Abb. 1 *In-situ*- und *In-vitro*-Reduktion der Pigmentkonzentration. (A) Wachstumsexperiment mit *I. lacteus* in KMMI mit 1 % Reiskleie und 0,01 % Pigment Yellow 13 stationär inkubiert bei 30 °C. Im Kulturgefäß 2 ist nach 27 Tagen Wachstum eine Reduktion der Pigmente sichtbar. Das Kulturgefäß 1 wurde nicht mit Pilzmycel inokuliert (Kontrolle) und zeigte keine Reduktion von Pigment Yellow 13. (B) *In-vitro*-Analyse mit 20fach konzentriertem Kulturüberstand aus Kulturen von Abb.1A. Ein Volumen von 900 µl 50 mM Glycin-HCl-Puffer, pH 3,5 wurde mit 1 mM H₂O₂ und 100 µl Kulturüberstand versetzt (Tube 1). Tube 2 enthält zusätzlich 0,1 mM MnSO₄. Tube 3 diente als Kontrolle und wurde mit hitzebehandeltem Kulturüberstand (95 °C, 10 min) versetzt. Alle Ansätze enthielten 0,01 % Pigment yellow 13 und wurden bei 30 °C über Nacht inkubiert. (C) Die OD_{600 nm} der Ansätze wie in (B) beschrieben wurde vor der Inkubation und nach 24 h gemessen.

1.2 Optimierung der Wachstumsbedingungen

In Wachstumsversuchen mit *I. lacteus* und Pigment Red 254 konnten zahlreiche sichtbare Effekte wie eine Abnahme der Farbtintensität oder eine Verschiebung des Farbspektrums beobachtet werden. In *In-vitro*-Versuchen mit konzentrierten Kulturüberständen konnte keine Reduktion der Pigmentkonzentration unter den beschriebenen Bedingungen gesehen und gemessen werden. Um die Kultivierungsbedingungen zu optimieren, wurde der Fokus verstärkt auf das C/N-Verhältnis gelegt und Wachstumsexperimente mit verschiedenen C/N-Verhältnissen durchgeführt. Hierfür wurde als C-Quelle Glucose eingesetzt und Hefeextrakt als N-Quelle verwendet, das verschiedene Stickstoffverbindungen enthält. Es zeigte sich, dass ein gleiches C/N-Verhältnis im Minimalmedium zur visuellen Reduktion von Pigment red 254 führte (Abb. 2A).

Im *In-vitro*-Experiment mit konzentriertem Kulturüberstand konnte nach 5 Tagen ein vollständiger Abbau der enthaltenen Pigmente gesehen und gemessen werden (Abb. 2B, C). Mit den bisherigen Optimierungen der Wachstumsbedingungen konnte damit ein Abbau des Pigment Yellow 13 und Pigment Red 254 erzielt und damit die Basis des „proof of concept“ erreicht werden.



C

Tube	OD _{600 nm} vor Inkubation	OD _{600 nm} nach Inkubation
1	0,242	0,000
2	0,250	0,251
3	0,251	0,002
4	0,260	0,258

Abb. 2 *In-situ*- und *In-vitro*-Reduktion der Pigmentkonzentration. (A) Wachstumsexperiment mit *I. lacteus* in KMMI mit 0,1 % Glucose, 0,1 % Hefeextrakt und 0,005 % Pigment Red 254 schüttelnd inkubiert bei 30 °C. Im Kulturgefäß 2 ist nach 25 Tagen Wachstum eine Reduktion der Pigmente sichtbar. Das Kulturgefäß 1 wurde nicht mit Pilzmycel inokuliert (Kontrolle) und zeigte keine Reduktion von Pigment Red 254. (B) *In-vitro*-Analyse mit 24fach konzentriertem Kulturüberstand. Ein Volumen von 450 µl 50 mM Ammoniumoxalat-Puffer, pH 4,5 wurde mit 0,01 % Pigment Red 254; 0,5 mM MnSO₄; 0,1 mM H₂O₂ und 50 µl Kulturüberstand versetzt (Tube 1). Tube 2 enthält 450 µl 50 mM Ammoniumoxalat-Puffer, pH 3,0; 0,1 % Tween 80; 0,1 mM H₂O₂ und 50 µl Kulturüberstand. Tube 3 enthält 450 µl 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,5; 0,1 mM H₂O₂ und 50 µl Kulturüberstand. Tube 4 (wie Tube 1) diente als Kontrolle und wurde mit hitzebehandeltem Kulturüberstand (95 °C, 10 min) versetzt. Alle Ansätze enthielten 0,01 % Pigment Red 254 und wurden bei 30 °C über Nacht inkubiert. (C) Die OD_{600 nm} der Ansätze wie in (B) beschrieben wurde vor der Inkubation und nach 24 h gemessen.

1.3 Identifizierung der Enzyme

Analyse der pigmentabbauenden Enzyme mittels Aktivitätsgelen

Die Identifizierung der pigmentabbauenden Enzyme für Pigment Yellow 13 und Pigment Red 254 wurde mit Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native-PAGE) durchgeführt werden. Dazu werden Polyacrylamidgele hergestellt und die Auftrennung im Ansatz enthaltene Proteine aus Zellextrakten oder Kulturüberständen läuft unter nativen Bedingungen ab. So bleibt die Struktur und enzymatische Aktivität enthaltener Enzyme bestehen. Die nativen Gele wurden mit Pigmenten in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt und in Gelapparaturen gegossen. Aufgrund der Unlöslichkeit der Pigmente in wässrigen Bedingungen war eine gleichmäßige Verteilung der Pigmente

in den Polyacrylamidgelen nicht gegeben, so dass hohe Konzentrationen von bis zu 5 % verwendet wurden, um Abbauprozesse sichtbar zu machen (Tab. 3). Zum Nachweis enzymatischer Aktivität wurden Kulturüberstände in denen Abbauprozesse sichtbar waren, konzentriert und mittels Elektrophorese getrennt. Anschließend wurden die Aktivitätsgele auf enzymatische Aktivität getestet. Die Gele wurden mit verschiedenen Pufferlösungen und verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen versetzt (Tab. 3). Weiterhin wurden die Aktivitätsgele mit zusätzlichen Elektronendonatoren versetzt, um eine mögliche Enzymaktivität zu initiieren (Tab. 3). Zusätzlich wurden Aktivitätsgele ohne Pigmentzugabe hergestellt, um mögliche Peroxidaseaktivitäten zu detektieren. Nach der Testung zahlreicher Bedingungen zum enzymatischen Abbau der Pigmente Yellow 13 und Red 254 in Aktivitätsgelen konnte kein sichtbarer Abbau in Form von Aktivitätsbanden detektiert werden. Mögliche Ursachen könnten in der Pigmentverteilung im Polyacrylamidgel und der enzymatische Zugang zum Substrat sein. Weiterhin können Komponenten die unter *In-Vivo*-Bedingungen in Schüttelkultur vorhanden sind, im *In-Vitro*-Experiment fehlen, so dass Bedingungen zum Nachweis der enzymatischen Aktivität in Aktivitätsgelen nicht gegeben waren.

Tab. 3 Zusammensetzung und Bedingungen zum enzymatischen Abbau der Pigmente in Aktivitätsgelen. Die nativen Polyacrylamidgele wurden nach einem Standardprotokoll (Schägger *et al.*, 1994) hergestellt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele mit verschiedenen Zusätzen versetzt.

Gelzusätze	Bestandteile im Aktivitätsassay			
Pigmentkonzentration	Puffersubstanz	H ₂ O ₂ -Konzentration	Elektronendonatoren	Zusätze
0,5 % – 5 %	50 mM Na-malonat, Na-malat, Na-oxalat, Na-tartrat	0,1 % - 1 %	¹ ABTS (0,3 mM), o-Dianisidine (0,5 mM)	Veratrylalcohol 0,4 µM - 400 µM, Tween 80 0,01 % - 0,1 %

¹2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonate

AP2 Etablierung eines Produktionsstammes

Die Pigmentdegradierung von Pigment Red 254 und Pigment Yellow 13 (Abb. 1 und 2) konnte im wiederholten Experiment bestätigt werden. Die Identifizierung der Enzyme konnte durch den Einsatz von Aktivitätsgelen, wie oben beschrieben (1.3) nicht bestätigt werden. Somit konnten molekularbiologische Arbeiten wie die Amplifizierung und Klonierung von Kandidatengen nicht durchgeführt werden. Umfangreiche *In-Silico*-Analysen der sequenzierten Stämme zeigten zahlreiche Kandidatengene, die für manganabhängige Peroxidasen und zahlreiche weitere Peroxidasen codieren. In weiteren Studien können parallel zur Enzymidentifizierung diese Kandidatengene kloniert und auf ihre enzymatische Aktivität getestet werden. Ein Produktionsstamm konnte somit nicht etabliert werden.

Fortführung und Optimierung der Wachstumsexperimente zum Abbau von Pigment Blue 15

Die Anzahl der Wachstumsexperimente zum Abbau von Pigment Blue 15 belief sich auf 287 Versuchsansätze (Tab. 1 und 2). Die Ansätze mit einem deutlichen visuellen Verlust der Farbintensität des verwendeten Pigments sind in Abbildung 3 gezeigt. Es wurden alle Pilzstämme (Tab. 2) und zahlreiche Variationen in der Puffersubstanz, der C- und N-Quelle, des pH-Wertes und einiger Zusätze (Tab. 2) getestet. Es zeigte sich nach 30 Tagen, dass beim Einsatz von Weizen- und Reisstroh sowie Haferspелzen als einzige C-Quelle eine deutliche Reduktion der Farbintensität zu detektieren war (Abb. 3, Ansatz 1 - 8). Der Einsatz dieser Substrate veranlasst offensichtlich die Veränderung der Farbgebung und somit oxidative Prozesse durch die eingesetzten Pilzstämme. Die Kultivierung des Pilzstammes *T. hirsuta* und der Einsatz von Weizenschlempe und Biertreber als C-Quelle führte während 30 Tagen

Kultivierung zur Veränderung und oder zum Abbau des Pigments Blue 15. Die Verwendung von Cellulose als C-Quelle führte zu einer fast vollständigen Reduktion des Pigment Blue 15 (Abb. 3, Ansatz 9 - 12). Die Kultivierung des Stammes *T. versicolor* mit Biertreber und Cellulose als C-Quelle führte ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der Farbintensität von Pigment Blue 15 und lässt auf Abbauprozesse schließen. Die Wiederholung dieser Wachstumsexperimente führte zu identischen Resultaten, so dass die Bedingungen zum Abbau des Pigments Blue 15 optimiert werden konnten. Somit stehen nun einige Kandidaten für *In-Vitro*-Experimente zur Verfügung stehen.

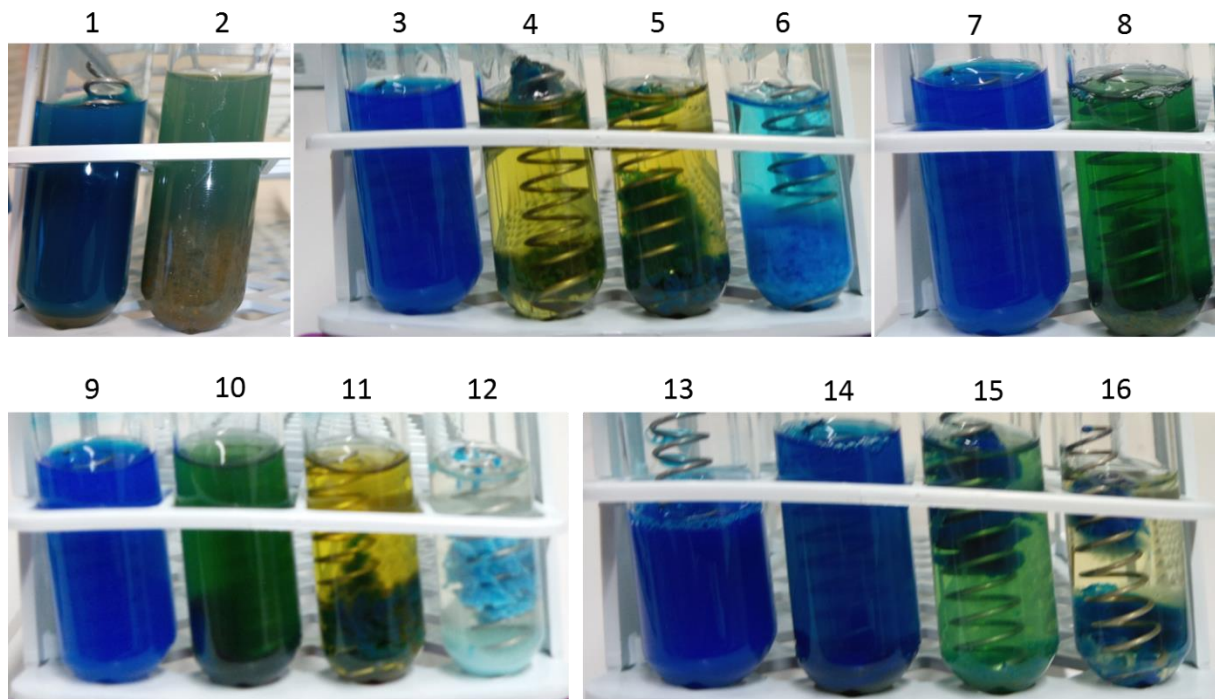


Abb. 3 Optimierung der Wachstumsexperiment zum Abbau von Pigment Blue 15. Wachstumsexperimente mit verschiedenen Pilzstämmen in KMMI-Medium mit verschiedenen C-Quellen und 0,005 % Pigment Blue 15 schüttelnd inkubiert bei 30 °C. Die Fotos wurden nach 30 Tagen Kultivierung aufgenommen. Im Kulturgefäß 1 (Kontrolle ohne Pilzstamm) und 2 (mit *Pleurotus ostreatus*) wurde als C-Quelle Weizenstroh verwendet. Die Kulturgefäße 3 - 6 zeigen Kultivierungsexperimente mit Reisstroh als C-Quelle. (3) Kontrolle ohne Pilzstamm, (4) *P. ostreatus*, (5) *P. chrysosporium*, (6) *I. lacteus*. Die Kulturgefäße 7 - 8 zeigen Kultivierungsexperimente mit Haferspелzen als C-Quelle. (7) Kontrolle ohne Pilzstamm, (8) *P. pulmonarius*. Die Kulturgefäße 9 - 12 zeigen Kultivierungsexperimente mit *T. hirsuta*. (9) Kontrolle ohne Pilzstamm, (10) Weizenschlempe als C-Quelle, (11) Biertreber als C-Quelle, (12) Cellulose als C-Quelle, Die Kulturgefäße 13 - 16 zeigen Kultivierungsexperimente mit *T. versicolor*. (13) Kontrolle ohne Pilzstamm, (14) Weizenschlempe als C-Quelle, (15) Biertreber als C-Quelle, (16) Cellulose als C-Quelle.

AP3 Produktion und Reinigung eines Kandidatenenzym

Im Arbeitspaket 3 (Abb. 4) sollte ursprünglich die Kultivierung des Produktionsstammes im Litermaßstab erfolgen sowie eine chromatografische Reinigung des Enzyms. Anschließend sollte die enzymatische Aktivität überprüft werden und ein nutzbares pigmentabbauendes Enzymprodukt vorliegen.

Da der Meilenstein 2: Die Fertigstellung eines Produktionsstammes nicht erreicht werden konnte, konnte demzufolge auch das Arbeitspaket 3 in der beschriebenen Weise nicht erstellt und bearbeitet werden.

AP4 Versuche zum Pigmentabbau/Versuche mit Pilotpartnern

Da der in Arbeitspaket 3 beschriebene Meilenstein 3: Nutzbarkeit des pigmentabbauenden Enzyms (Abb. 4) und Verfügbarkeit einer höheren Menge an Enzymlösung bisher nicht erreicht werden konnte und sich der Nachweis der Enzymproduktion in der Entwicklungsphase befindet, konnten bisher keine Abbauprobversuche in Dispersion bei der LVB/LSB stattfinden. Jedoch wurde der Kontakt zur LSB weiter vertieft und der Sachstand der Problematik der Firma in der Entfernung der Graffiti in der Stadt Leipzig detaillierter eruiert.

Des Weiteren wurden im Labor erste Versuche zum Farbabau durchgeführt. Hierfür wurden einige Untergründe mit Graffiti-Farben versehen und die angereicherten Überstände der Kulturen genutzt und auf die gefärbten Oberflächen gebracht. Die Ansätze wurden bei für 24 h inkubiert und die Farbtintensität anschließend qualitativ bewertet. Es wurden 2 Gelbtöne sowie 2 Rottöne der Firma Montana Cans Black sowohl auf Glas-Objekträgern als auch auf kleinen Metallstücken von Stromkästen (erhalten von der LSB) aufgetragen. Die 20fach konzentrierten Kulturüberstände nach Kultivierung von *I. lacteus* wurden auf die farbbehafeten Oberflächen so aufgetragen, dass die Oberflächen mit Überstand leicht bedeckt waren. Die Ansätze wurden 24 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend qualitativ beurteilt. Erste Ergebnisse zeigten, dass sowohl auf Glas und Metall bei allen eingesetzten Graffiti-Farben makroskopisch eine leichte Reduzierung der Farbtintensität detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt, da auf den vorhandenen Fotos kein Effekt zu sehen ist). Diese Versuche werden in Zukunft wiederholt und verifiziert werden müssen sowie einer quantitativen Analyse unterzogen werden.

Projektplan - Projekt IBÖ-09_ENFA	Termine Meilensteine	Projektmonat											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Projektstart													
Projektplanung ist abgeschlossen		■											
Einweisung in die Laboratorien		■											
Durchführung der Sicherheitsunterweisungen		■											
Arbeitspaket 1 Durchführung der Wachstumsexperimente													
1. Analyse der Wachstumsbedingungen		■	■	■	■								
2. Optimierung der Wachstumsbedingungen		■	■	■	■								
3. Identifizierung der Enzyme						■							
Meilenstein 1 Identifizierung der optimalen Wachstumsbedingungen/Enzyme	PM 5					■							
Arbeitspaket 2 Etablierung eines Produktionsstammes													
1. Klonierung der Kandidatengene in einen geeigneten Produktionsstamm							■						
2. Testen der Klone, Sequenzierung der Konstrukte							■						
3. Transformation der Konstrukte in geeigneten Produktionsstamm								■					
4. Testexpressionen der Konstrukte, Nachweis der Enzymproduktion								■					
5. Fortführung der Wachstumsexperimente							■	■					
Meilenstein 2 Fertigstellung eines Produktionsstammes	PM 7							■					
Arbeitspaket 3 Produktion und Reinigung eines Kandidatenenzym													
1. Kultivierung des Produktionsstammes im Litermaßstab										■	■		
2. chromatografische Reinigung des Enzyms										■	■	■	
3. Überprüfung der enzymatischen Aktivität											■	■	
Meilenstein 3 Nutzbarkeit des pigmentabbauenden Enzyms	PM 10										■	■	
Arbeitspaket 4 Versuche zum Pigmentabbau													
1. Abbauprobversuche in Dispersion												■	
2. Abbauprobversuche auf unterschiedlichen Oberflächen													■
Meilenstein 4 Prototyp eines einsatzfähigen Enzyms	PM 12												■
Projektende													

Abb. 4 Projektplan aus der Vorhabenbeschreibung

Die Verwertbarkeit der Ergebnisse und konkrete Planungen für die Zukunft

Das geförderte Vorhaben „Entwicklung eines enzymatischen Produktes zur biobasierten Farbstoffentfernung“ konnte nach 11monatiger Bearbeitungszeit zahlreiche Ergebnisse erzielen. Es konnten Bedingungen identifiziert werden, die zum Abbau je eines Kandidaten aus den in Graffiti am häufigsten verwendeten Pigmentklassen führten. Diese umfassen einen Vertreter der Diketopyrrolopyrrol-(DPP)-Pigmente (Pigment Red 254), Phthalocyanin-Pigmente (Pigment Blue 15) und Azofarbstoffe (Pigment Yellow 13). Für Pigment Red 254 und Pigment Yellow 13 konnten Kultivierungsbedingungen identifiziert werden, die zum Abbau der Pigmente führten. *In-Vitro*-Versuche mit konzentriertem Kulturüberstand aus den Wachstumsexperimenten zeigten einen vollständigen Abbau des Pigments Red 254 nach 24 h (Abb. 2). Der Abbau von Pigment Yellow 13 konnte im *In-Vitro*-Versuch mit konzentriertem Kulturüberstand zu 70 % erfolgen (Abb. 1) Es konnten mehrere Wachstumsbedingungen zum Abbau von Pigment Blue 15 durch verschiedene Pilzstämmen identifiziert werden (Abb. 3). Die umfangreichen Versuchsansätze und die erzielten Ergebnisse dienen als Grundlage für die Fortführung des Projekts. Die Identifizierung der am Abbau beteiligten Enzyme waren im zeitlichen Projektrahmen nicht möglich und sind Gegenstand der neuen Förderphase. Die etablierten Wachstumsexperimente dienen als Grundlage, um Bedingungen für den Abbau weiterer Pigmente und Pigmentklassen zu untersuchen. Die Förderung des Projekts „Entwicklung eines enzymatischen Produktes zur biobasierten Farbstoffentfernung“ erfolgt durch das Fördervorhaben der SAB (sächsische Aufbaubank) Validierungsförderung 2021-2027 und beginnt in wenigen Monaten.