

Abschlussbericht über die Arbeiten im Rahmen des Max–Buchner–Stipendiums (MBFSt-Kennziffer 2508)

Stipendiatin: Claudia Nachtigall; Thema: Biologische Bleiche von Baumwolle

Die bisherigen Arbeiten hatten zum Ziel, einzelne Komponenten eines biologischen Bleichsystems zu isolieren und zu charakterisieren. Weißfäulepilze, als ganze Organismen eingesetzt, sind in der Lage Baumwolle oder Farbstoffe zu bleichen, allerdings ist für die effektive Bleiche das Zusammenspiel mehrerer Enzyme und Mediatoren erforderlich. Als bleichender Organismus war der Weißfäulepilz *Bjerkandera adusta* DSZM 3375 ausgewählt worden und es wurde versucht, eine detektierte Laccase näher zu charakterisieren. Dies gestaltete sich aufgrund der unzureichenden Enzymstabilität als äußerst schwierig. Daher wurde ein **erneutes Screening** nach bleichenden Pilzen durchgeführt.

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik der TU Dresden konnten neue Pilzproben, u.a. aus Indonesien untersucht werden. Die Kultivierung erfolgte auf Agarplatten in Kirk–Medium oder Malzmedium und nach 7 bis 21 Tagen waren alle Proben gewachsen. Nachfolgend wurde die Bleiche von Baumwolle auf der Agarplatte untersucht (Tab. 1).

Tab. 1: Bleiche von Baumwolle durch Weißfäulepilze nach 45 Tagen

Organismus	Weißgrad (nach Berger)
<i>Laetiporus</i> sp.	55,6
<i>Ganoderma</i> sp.	52,3
<i>Nematoloma frowardii</i>	49,8
<i>Trametes versicolor</i>	44,2
<i>Marasmius</i> sp.	43,4
„Unbekannt“	41,6
<i>Auricularia</i> sp.	39,9
Blindwert (ohne Pilz)	23,0

Ein hoher Weißgrad (nach Berger) bedeutet dabei eine gute Bleiche. In dieser Tabelle nicht mit aufgeführt ist die Aktivität von Zellulasen, die z.B. bei *Ganoderma* zu einer deutlichen Stoffzerstörung führten.

Als nächstes erfolgte die Kultivierung der Pilze in Flüssigkultur und die Detektion von sekretierten Enzymen. Hier unterschieden sich die verschiedenen Spezies deutlich. *Auricularia* sp. zeigte erhebliche Wachstumsprobleme unter den gewählten Bedingungen (25°C, 120 rpm, Kirk-Medium), bei *Ganoderma* sp. gab es keine Probleme beim Wachstum, aber es konnte nur eine geringe Laccaseaktivität gemessen werden. Unspezifische Peroxidasen konnten nicht detektiert werden. Somit wurden für weitergehende Untersuchungen die Pilze *Marasmius* sp. und *Laetiporus* sp. ausgewählt. Bei beiden konnte nach 5 bis 10 Tagen eine hohe Laccaseaktivität gefunden werden. Nachfolgend wurde die Entfärbung verschiedener Farbstoffe auf der Agarplatte (Abb. 1) und mit Laccase-Rohextrakten in der Küvette getestet (Tab. 2).

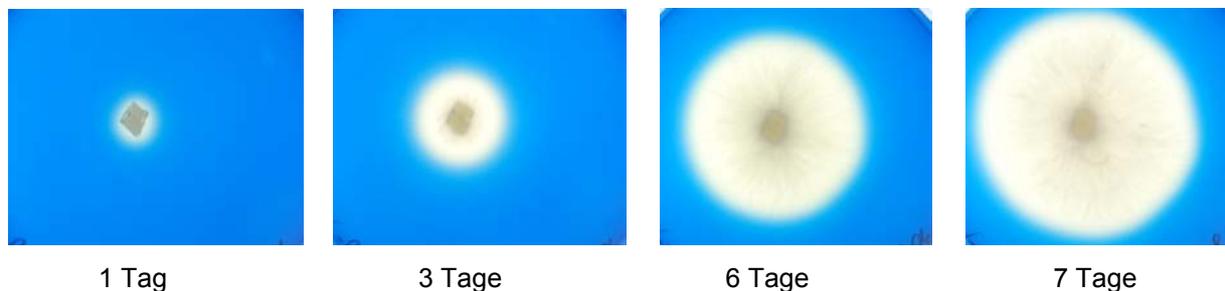


Abb. 1: Entfärbung von Levafix E-RA auf der Agarplatte durch *Laetiporus* sp

Tab. 2: Bleiche von Farbstoffen durch 2 verschiedene Laccasen (0 = keine Entfärbung, +++++ = vollständige Entfärbung)

Farbstoff	<i>Marasmius</i> sp.	<i>Laetiporus</i> sp.
Procion Blue H-EGN 125	++	+++++
Levafix Blue PN-3R	+	+
Levafix Blau E-RA gran.	+	++
Remazol Brilliantrot 5B 150%	0	+
Remazol Golden Yellow 3R liq 25	+	+
Remazol Türkisblau G133	0	0
Remazol Black B gran. 133%	0	0

Da *Marasmius* sp. einfacher und reproduzierbarer kultiviert werden konnte, wurde als erstes die dort detektierte Laccase isoliert und charakterisiert.

Die **Züchtung von *Marasmius sp.*** erfolgte in 2 l-Erlenmeyerkolben, mit 500 ml Kirk II-Medium bei 25 °C und 120 rpm im Rundschüttler. Der Pilz beginnt nach 3 Tagen mit der Produktion einer extrazellulären Laccase, deren Aktivität nach 5-9 Tagen ein Maximum erreicht. Mit verschiedenen Zusätzen, für die beispielhaft in Abb. 2 Tween 80 und Kupfersulfat stehen sollen, wurde getestet, ob sich die Produktion der Laccase erhöhen lässt. Dies konnte unter den gewählten Bedingungen nicht festgestellt werden. Allerdings zeigten sich auch bei *Marasmius sp.* gewissen Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Züchtungen. Eine Reihe verschiedener Parameter, wie Lichtversorgung (Standort im Schüttler) oder Sauerstoffversorgung wurden untersucht, allerdings konnten keine deutlich erkennbaren Einflüsse beobachtet werden.

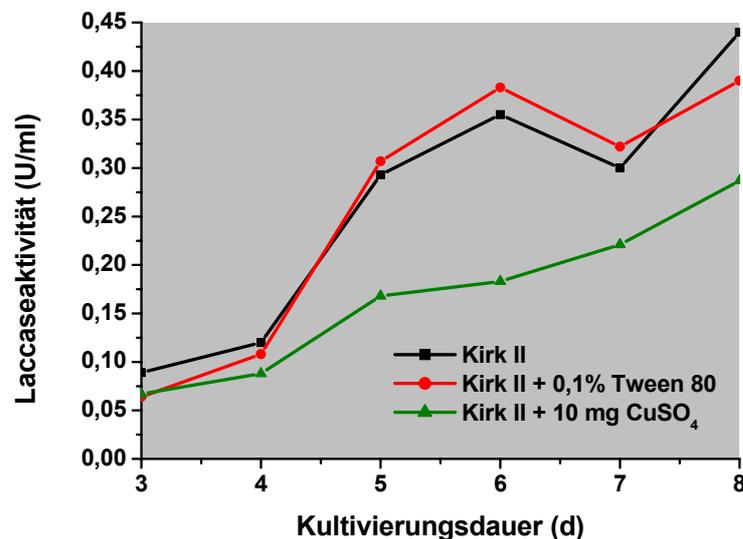


Abb. 2: Kultivierung von *Marasmius sp.* in Kirk II-Medium mit verschiedenen Zusätzen

Für jede **Reinigung der *Marasmius sp.* Laccase** wurde daher während der Züchtung des Pilzes täglich die Laccaseaktivität im Medium detektiert und beim Maximum der Aktivität die Kultivierung beendet. Nach der Abtrennung der festen Bestandteile erfolgte eine Dialyse gegen 10 mM Malonatpuffer, pH 6,0, über Nacht. Dabei konnte die Hälfte des Gesamtproteins unter vollständigem Erhalt der Laccaseaktivität abgetrennt werden. Dann folgte eine Ionenaustauschchromatographie (IAC) an Q-Sepharose Fast Flow mit einem Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in 10 mM Malonatpuffer. In Abb. 3 ist der Proteingehalt im Gradienten

einer solchen Trennung dargestellt; der schwarze Pfeil markiert den Bereich mit Laccaseaktivität.

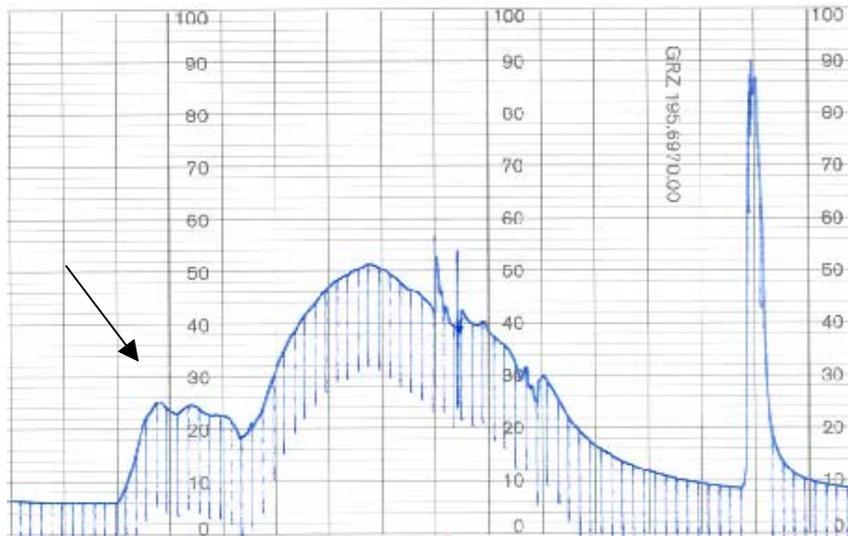


Abb. 3: Chromatogramm der Ionenaustauschchromatographie der Laccase aus *Marasmius* sp. an Q-Sepharose FF

Als weitere Reinigungsschritte wurden nach erneuter Dialyse eine IAC an Mono Q und nachfolgend eine Gelfiltration an Superdex 200 durchgeführt. In Abb. 4 sind die zugehörigen PAGE Gele (nativ und SDS) des gereinigten Enzyms zu sehen und Tab. 3 zeigt die Zusammenfassung der Reinigung.

Tab. 3: Reinigungstabelle für die Reinigung der Laccase aus *Marasmius* sp.

Reinigungsschritt	Gesamt protein [mg]	Gesamt aktivität [U]	spez. Aktivität [U mg ⁻¹]	Reinigungs faktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt dialysiert	262,7	110,26	0,4197	1	100
Q Sepharose (IAC)	21,7	80	3,6866	9	73
Dialyse	10,4	57,46	5,5250	13	52
Mono-Q (IAC)	2,05	28,08	13,6976	33	25

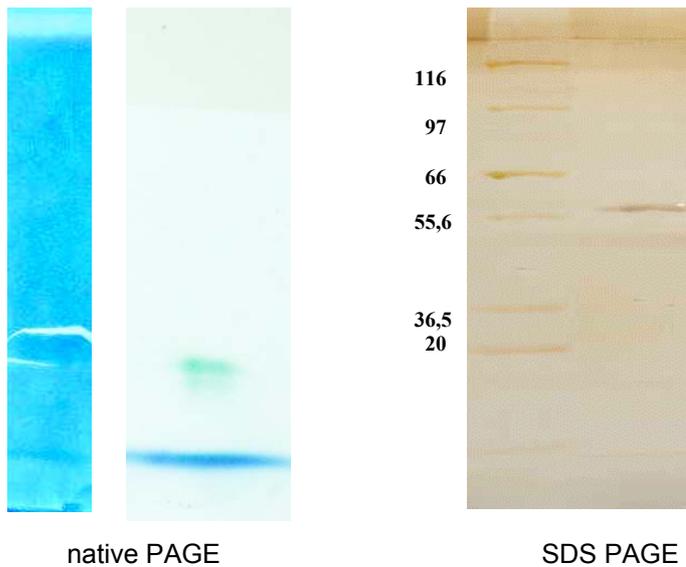


Abb. 4: Native und SDS PAGE der gereinigten Laccase aus *Marasmius* sp. Links: Färbung mit Coomassie Brilliant Blue; Mitte: Aktivitätsfärbung mit ABTS; rechts: Silberfärbung des SDS-Gels.

Im Weiteren erfolgte die **Enzymcharakterisierung**. Die gereinigte Laccase ist ein Monomer mit einer Größe von 60 kDa. Das pH-Optimum wurde mit 6,0 bestimmt, aber das Enzym ist ebenso über mind. 24 h stabil bei pH 10. Das Temperaturoptimum beträgt 45 °C (Abb. 5) und die Laccase ist stabil in Gegenwart von 20% Methanol, Ethanol oder EDTA (Abb. 6).

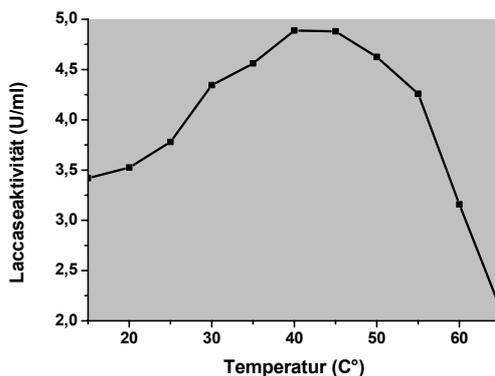


Abb. 5: Temperatur-Optimum der Laccase aus *Marasmius* sp

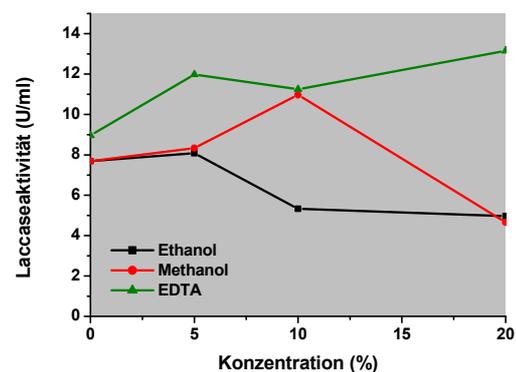


Abb. 6: Laccaseaktivität in Gegenwart von Methanol, Ethanol, EDTA

Nach einem Western Blot wurde die N-terminale Aminosäuresequenz bestimmt. Dabei konnten die ersten 20 Aminosäuren identifiziert werden, deren Sequenz eine

hohe Homologie zu bekannten Laccasen ergab. Wir untersuchten weiterhin die Entfärbung von Farbstoffen unterschiedlicher chemischer Struktur, was beispielhaft für Lanaset Blau 5G in Abb. 7 dargestellt ist.

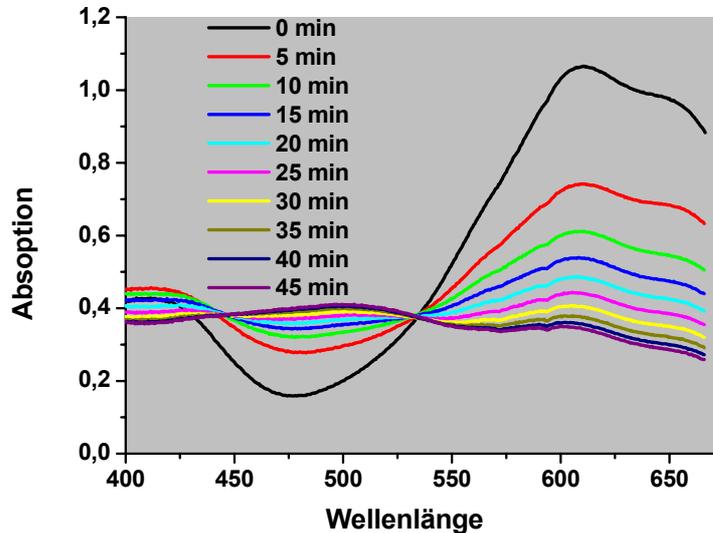


Abb. 7: Entfärbung von Lanaset Blau 5G durch die Laccase von *Marasmius* sp.

Ausblick

Die nachfolgenden Arbeiten beinhalten die **vollständige Charakterisierung der Laccase aus *Marasmius* sp.**, z.B. die Bestimmung der kinetischen Parameter für verschieden Substrate, die Bestimmung des Metallgehaltes und Langzeitstabilitäten des Enzyms. Weiterhin soll seine Eignung für die Immobilisierung an magnetische Partikel getestet werden.

Nach den ersten erfolgreichen Versuchen zur **Reinigung der Laccase aus *Laetiporus* sp.** soll auch dieses Enzym zur Homogenität gereinigt und charakterisiert werden.

Anschließend gilt das Augenmerk dem **Gesamtenzymsystem für die Bleiche** von Baumwolle. Als Modellorganismen scheinen *Laetiporus* sp. oder aber *Trametes hirsuta* geeignet. Letzterer zeigte zwar sehr gute Bleichresultate, bisher gelang es aber nicht, in der Flüssigkultur eine Enzymaktivität nachzuweisen. Diese Arbeiten sollen auch die Suche nach **natürlichen Mediatoren** einschließen.