

Abschlussbericht

Entwicklung eines Enzym-basierten Trockenstoffes für wasserverdünnbare Alkydharzlacke zum Ersatz umweltbelastender Ölkunstharzlacke und zur Verbesserung des derzeitigen technischen Standes von Wasserlacken

Aktenzeichen	34024/01
Auftraggeber	Deutsche Bundesstiftung Umwelt An der Bornau 2 49090 Osnabrück Deutschland
Bewilligungsempfänger	IRSA Lackfabrik Irmgard Sallinger GmbH An der Günz 15 86489 Deisenhausen Deutschland
Kooperationspartner	Prof. Dr. Georg M. Gübitz Universität für Bodenkultur, IFA Tulln, Institut für Umweltbiotechnologie Konrad Lorenzstraße 20 3430 Tulln Österreich
Projektlaufzeit	01.08.2017 – 31.07.2020
Verfasser	Katrin Greimel, Laurin Belanyecz, Doris Ribitsch (BOKU)

Tulln/Deisenhausen, August 2020

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt

Az **34024/01**Referat **21/2**

Fördersumme 177.220 €

Antragstitel Entwicklung eines Enzym-basierten Trockenstoffes für wasserverdünnbare Alkydharzlacke zum Ersatz umweltbelastender Ölkunstharzlacke und zur Verbesserung des derzeitigen technischen Standes von Wasserlacken

Stichworte

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
24 Monate	01.08.2017	31.07.2020	-

Zwischenberichte

Bewilligungsempfänger IRSA Lackfabrik
Irmgard Sallinger GmbH
An der Günz 15
86489 Deisenhausen

Tel 08282/89440

Fax 08282/894444

Projektleitung

Frau Lilo Sallinger

Bearbeiter

Frau Lilo Sallinger

Kooperationspartner Universität für Bodenkultur Wien
Institut für Umweltbiotechnologie
Konrad-Lorenz-Str. 20
A-3430 Tulln

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Zum Schutz vor Schmutz, Feuchtigkeit und Abrieb werden Parkettböden mit einer Oberflächenbehandlung (Versiegelung) versehen. Hierbei kommen Wasserlacke und Alkydharzlacke zum Einsatz, welche durch chemische Vernetzung (Aushärtung) einen zähelastischen, harten Film bilden, der Poren und Zwischenräume verschließt und so vor Abrieb, Verschmutzung und feuchtigkeitsbedingtem Aufquellen schützt. Alkydharzlacke enthalten jedoch sehr hohe und wenig umweltfreundliche Lösungsmittelanteile und werden nach wie vor zur Beschleunigung der Aushärtung mit gesundheitsbedenklichen metallhaltigen Katalysatoren (z.B. Cobaltsalze) versetzt. Ziel des Projektes war daher die Entwicklung eines umweltfreundlichen, Enzym-basierten Trockenstoffes für wasserverdünnbare Alkydharzlacke.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

- Zur Erreichung des Zieles wurden zunächst unterschiedliche natürliche und synthetische Mediatoren in Kombination mit dem Enzym Laccase von *Myceliophthora thermophila* (MtL) an einer Reihe von bereitgestellten Alkydharzen getestet. Die ersten Tests erfolgten durch Messung des Sauerstoffverbrauchs in Alkydharzemulsionen.
- In nächsten Schritten wurden die Polymerisierung und Aushärtung des Alkydharzes mittels FTIR-Spektroskopie und Sauerstoffverbrauch im Alkydharzfilm untersucht.
- Weiters wurden Laccasen aus unterschiedlichen Organismen mit anderen Eigenschaften getestet und Substanzen, die als Crosslinker fungieren sollten, zugesetzt.

Ergebnisse und Diskussion

- Unterschiedliche natürliche und synthetische Mediatoren wurden in Kombination mit dem Enzym Laccase von *Myceliophthora thermophila* (MtL) an einer Reihe von bereitgestellten Alkydharzen getestet. Die ersten Tests erfolgten durch Messung des Sauerstoffverbrauchs in Alkydharzemulsionen, wobei sich Ethylvanillin als Mediator und das Alkydharz Synthalat PWL 819 als optimale Kombination herauskristallisierte.
- Für die Polymerisierung und Aushärtung des Alkydharzes PWL 819 wurde Ethylvanillin-MtL ausgewählt und mittels FTIR-Spektroskopie und Sauerstoffverbrauch im Alkydharzfilm untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass eine Polymerisierung zwar stattfindet, eine zufriedenstellende Trocknung jedoch nur in feuchter Umgebungsluft erreicht werden kann.
- In Anwendungstests zeigte sich, dass das Alkydharz PWM 883 besser geeignet erscheint, weshalb diesem Alkydharz Leinöl beigemischt wurde, um den Anteil an ungesättigten Doppelbindungen zu erhöhen. Die neuen Mischungen zeigten in Abhängigkeit der Art des beigemischten Leinöls einen erhöhten Sauerstoffverbrauch bei einem größeren Einsatz an Mediator und Laccase.
- Die Verfärbung des Holzes durch das bio-basierte Trocknungssystem stellt ein großes Problem dar, konnte aber innerhalb der Projektzeit aufgrund des Lockdowns in der Coronakrise nicht mehr bearbeitet werden.

Fazit

Es bleibt festzuhalten, dass das eingesetzte Laccase-Mediator-System prinzipiell in der Lage ist Alkydharze zu polymerisieren. Dies konnte wiederholt sowohl über den Sauerstoffverbrauch bei der Firestingflüssigmessung, als auch mittels FTIR- Spektroskopie nachgewiesen werden. Diese Reaktion ist meist in unter 24 Stunden abgeschlossen und kommt mit ressourcenschonenden Mengen an Mediator und Enzym aus.

Die vollständige Trocknung der Harze in Form von Filmen konnte nicht erreicht werden. Dies liegt primär an der mangelnden Aktivität der *MtL* in hydrophobem Milieu. Auch die weiteren untersuchten Laccasen *CotA*, *ThL*, und *MaL1* zeigten hier das gleiche Verhalten und kommen somit in dieser Form nicht als Ersatz für die deutlich aktivere *MtL* in Frage.

Gerade bei der Erhaltung der Enzymaktivität in hydrophoben organischen Phasen handelt es sich um ein Thema mit hoher Relevanz für viele Bereiche in der Biotechnologie an dem weltweit geforscht wird. Viele Anwendungen, wie auch die enzymatische Trocknung von Alkydharzen, würden hier von einem weiteren Durchbruch profitieren. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es hier zukunftssträchtige Entwicklungen geben wird

Eine reduzierte Diffusionsmöglichkeit von Enzym, Sauerstoff und Mediator, sowie eine geringe Wasseraktivität im Alkydharzfilm spielen eine nicht zu unterschätzende Rolle. Immerhin konnte gezeigt werden, dass eine feuchte Umgebungsluft einen höheren Sauerstoffverbrauch bewirkt und die Trocknungszeit beschleunigt. Dies ist für die Anwendung jedoch nur schwierig handzuhaben.

Eine Deglykosylierung des verwendeten Enzyms *MtL* verbesserte die Leistung in wasserfreien Proben nicht eindeutig und ist hinsichtlich der Ressourcen wenig effizient.

Außerdem zeigte der Einsatz von Crosslinkern und Lignosulfonaten nicht den erhofften positiven Effekt, das könnte daran liegen, dass diese Substanzen womöglich als Radikalfänger agieren und die Reaktion dadurch verzögern.

In Anwendungstests durch die Firma IRSA konnte das Laccase-Mediator-System nicht die gewünschte Trocknung katalysieren, zusätzlich dazu wurde eine starke Verfärbung der verwendeten Holzplatten sichtbar, die bis zum Projektende nicht gelöst werden konnten.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis von Bildern	3
Verzeichnis von Tabellen.....	4
Verzeichnis von Begriffen, Abkürzungen und Definitonen	4
Zusammenfassung.....	5
Einleitung	5
1. Probenliste.....	9
2. Enzym & Mediatoren	10
2.1 Laccase.....	10
2.2 Mediatoren	11
3. Messung des Sauerstoffverbrauchs in Alkydharzemulsionen	11
3.1 Durchführung.....	11
3.2 Messung der unterschiedlichen Alkydharze.....	12
3.3 Messung des Synthalat PWL 819 Aquaalkyds.....	13
3.4. Alkydharzmuster mit Leinölzusatz	13
4. Messung des Sauerstoffverbrauchs im Dünnschichtfilm	16
4.1 Messung in einer Feuchtkammer	18
5. Inhibierungstests.....	20
6. Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie	21
6.1 Trocknung der Alkydharze in einer Feuchtkammer	23
6.2 Untersuchung der entstehenden Polymere mittels FTIR-Spektroskopie	24
7. Modifikation der MTL - Deglykosylierung	28
8. Einsatz von Lignosulfonaten zur Steigerung der Polymerisationsaktivität.....	30
8.1 Sauerstoffverbrauchsmessung mit Lignosulfonat als Mediator	30
8.2 Sauerstoffverbrauchsmessung mit Lignosulfonat als Zusatz	31
9. Einsatz von Crosslinkern zur Steigerung der Polymerisationsaktivität.....	31
9.1 Sauerstoffverbrauchsmessungen mit Crosslinkern als Mediator.....	32
9.2 Sauerstoffverbrauchsmessung mit Crosslinkern als Zusatz	34
10. Untersuchung alternativer Laccasen	34
10.1 CotA Laccase	34
10.2 Trametes hirsuta Laccase.....	36
10.3 Mal1 Laccase.....	37
11. Verfärbung des Holzes nach Behandlung mit Enzym/Mediator-hältigem Bindemittel	38
12. Fazit.....	39
13. Literatur	40
14. Anhang.....	41

Verzeichnis von Bildern

Abbildung 1: Trocknungsprozess von Alkydharzen mit dem Laccase-Mediator-System...	8
Abbildung 2: pH Optimum der Laccase von <i>Myceliophthora thermophila</i>	11
Abbildung 3: Aufbau der Sauerstoffmessung mittels optischen Sauerstoffsensor.....	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Sauerstoffsättigungskurve	12
Abbildung 5: Gemessener Sauerstoffverbrauch mit unterschiedlichen Mediatoren und Synthalat PWL 819.....	12
Abbildung 6: Firestingflüssigmessung mit Aquaalkyd; Ethylvanillin als Mediator.....	13
Abbildung 7: Firestingflüssigmessung V 1 2 2	14
Abbildung 8: Firestingflüssigmessung V 1 2 3	14
Abbildung 9: Firestingflüssigmessung V 1 2 4	15
Abbildung 10: Firestingflüssigmessung V 1 2 2	15
Abbildung 11: Firestingflüssigmessung V 1 2 3	16
Abbildung 12: Firestingflüssigmessung V 1 2 4	16
Abbildung 13: Filmessung mit PWL 819 und Cobalt Katalysator, reines Harz als Blank	17
Abbildung 14: Synthalat PWL 819 mit MtL und Ethylvanillin	18
Abbildung 15: Feuchtkammer für Dünnschichtmessungen	19
Abbildung 16: O ₂ -Verbrauchsmessung-Dünnschichtfilm in der Feuchtkammer.....	19
Abbildung 17: FTIR-Spektrum PWL 819, 120µm	21
Abbildung 18: FTIR-Spektrum PWL 819, Vergrößerung relevanter Bereich, C=C Peak mit Pfeil markiert	22
Abbildung 19: FTIR-Spektrum der Cobalt katalysierten Trocknung von PWL 819	22
Abbildung 20: Feuchtkammer für FTIR-Messungen	23
Abbildung 21: FTIR-Spektrum nach 48 h Inkubation.....	23
Abbildung 22: Trocknungsverlauf in der Feuchtkammer	24
Abbildung 23: PWL 819 ohne Trocknungssystem als Negativkontrolle, gefriergetrocknet	25
Abbildung 24: PWL 819 mit Cobaltkatalysator als Positivkontrolle, gefriergetrocknet..	25
Abbildung 25: PWL 819 mit MtL und Ethylvanillin, gefriergetrocknet	26
Abbildung 26: FTIR-Spektrum Polymer aus PWL 819, Negativkontrolle	26
Abbildung 27: FTIR-Spektrum Polymer aus PWL 819 mit Cobaltkatalysator	27
Abbildung 28: FTIR-Spektrum Polymer aus PWL 819 mit MtL und Ethylvanillin.....	27
Abbildung 29: SDS-Page Deglykosylierung 1	29
Abbildung 30: Filmmessung mit deglykosylierter MtL	29
Abbildung 31: Sauerstoffverbrauchsmessung in Alkydharzemulsionen mit Lignosulfonat als Mediator	30
Abbildung 32: Sauerstoffverbrauchsmessung in Alkydharzemulsionen mit Lignosulfonat als Mediatorzusatz	31
Abbildung 33: Firestingflüssigmessung mit Caffeic acid als Crosslinker	32
Abbildung 34: Firestingflüssigmessung mit Gallic acid als Crosslinker.....	33
Abbildung 35: Firestingflüssigmessung mit Tannic acid als Crosslinker	33
Abbildung 36: Firestingflüssigmessung mit Tannic acid als Crosslinker und Mediatorzusatz zu Ethylvanillin	34
Abbildung 37: Sauerstoffverbrauchsmessung mit CotA und Ethylvanillin als Mediator.	35
Abbildung 38: Sauerstoffverbrauchsmessung im Alkydharzfilm mit CotA.....	36
Abbildung 39: Firestingflüssigmessung mit ThL Charge 1	37
Abbildung 40: Firestingflüssigmessung mit ThL Charge 2	37
Abbildung 41: Sauerstoffverbrauchsmessung <i>Mal1</i> (Ch 3 und Ch 4) vs <i>MtL</i> Laccase (Ch 1 und Ch 2).....	38

Verzeichnis von Tabellen

Tabelle 1: Liste der Alkydharze	9
Tabelle 2: Bezeichnung Aquaalkyd auf Basis von Synthalat PWL 819	9
Tabelle 3: Zusammensetzung des Aquaalkyds V110.....	10
Tabelle 4: Zusammensetzung Alkydharzmuster mit Leinölzusatz	10
Tabelle 5: Additive	20
Tabelle 6: Zusammenfassung der Enzymaktivitäten vor und nach der Deglykosylierung	28
Tabelle 7: Überblick Crosslinker - Strukturformel und Molekulargewicht.....	31
Tabelle 8: Eigenschaften der zur Verfügung stehenden CotA.....	34
Tabelle 9: Dosierung der ThL Charge 1 und Charge 2	36
Tabelle 10: Eigenschaften eingesetzte <i>Mal</i> 1.....	38
Tabelle 11: Synthetische Mediatoren	41
Tabelle 12: Natürliche Mediatoren.....	42

Verzeichnis von Begriffen, Abkürzungen und Definitionen

PU	Polyurethan
CaF ₂	Chemische Formel für Calciumfluorid
Co	Cobalt
O ₂	Sauerstoff
ABTS	2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
MQ-H ₂ O	Milli-Q Wasser, vollentsalztes Wasser
MtL	<i>Myceliophthora thermophila</i> Laccase
ThL	<i>Trametes hirsuta</i> Laccase
Mal1	<i>Melanocarpus albomyces</i> Laccase
CotA	CotA Laccase aus <i>Bacillus subtilis</i>
cm ⁻¹	Wellenzahl
µm	Mikrometer
h	Stunden
ml	Milliliter
cm	Zentimeter
kDA	Kilodalton
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ch	Channel
U/g	Unit pro Gramm, Maß für die Spezifische Enzymaktivität
U/ml	Unit pro Milliliter, Volumenaktivität

Zusammenfassung

Ziel des Projektes war die Entwicklung eines Enzym-basierten Trockenstoffes für wasserverdünnbare Alkydharzlacke.

Zur Erreichung des Zieles wurden zunächst unterschiedliche natürliche und synthetische Mediatoren in Kombination mit dem Enzym Laccase von *Myceliophthora thermophila* (MtL) an einer Reihe von bereitgestellten Alkydharzen getestet. Die ersten Tests erfolgten durch Messung des Sauerstoffverbrauchs in Alkydharzemulsionen, wobei sich Ethylvanillin als Mediator und das Alkydharz Synthalat PWL 819 als optimale Kombination herauskristallisierte.

In nächsten Schritten wurden die Polymerisierung und Aushärtung des Alkydharzes PWL 819 mit Ethylvanillin-MtL mittels FTIR-Spektroskopie und Sauerstoffverbrauch im Alkydharzfilm untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass eine Polymerisierung zwar stattfindet, eine zufriedenstellende Trocknung jedoch nur in feuchter Umgebungsluft erreicht werden kann.

Weiters wurden Laccasen aus unterschiedlichen Organismen mit anderen Eigenschaften getestet und Substanzen, die als Crosslinker fungieren sollten, zugesetzt, jedoch mit ausbleibendem Erfolg.

In Anwendungstests zeigte sich, dass das Alkydharz PWM 883 besser geeignet erscheint, weshalb diesem Alkydharz Leinöl beigemischt wurde, um den Anteil an ungesättigten Doppelbindungen zu erhöhen. Die neuen Mischungen zeigten in Abhängigkeit der Art des beigemischten Leinöls einen erhöhten Sauerstoffverbrauch bei einem größeren Einsatz an Mediator und Laccase^[KG1].

Die Verfärbung des Holzes durch das bio-basierte Trocknungssystem stellt ein großes Problem dar, konnte aber innerhalb der Projektzeit aufgrund des Lockdowns in der Coronakrise nicht mehr bearbeitet werden.

Das Projekt „Entwicklung eines Enzym-basierten Trockenstoffes für wasserverdünnbare Alkydharzlacke zum Ersatz umweltbelastender Ölkunstharzlacke und zur Verbesserung des derzeitigen technischen Standes von Wasserlacken“ ist ein durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU) gefördertes Forschungsprojekt (Az: 34024/01). Die Bearbeitung erfolgte durch das Institut für Umweltbiotechnologie an der Universität für Bodenkultur Tulln und der Lackfirma IRSA. ^[DR2]

Einleitung

Parkett- und Holzböden sind aufgrund Ihrer Vielseitigkeit, Beständigkeit und nicht zuletzt aufgrund ihrer optischen Eigenschaften besonders beliebt und finden nicht nur in Privathaushalten, sondern auch in Theater- und Konzertsälen, Sporthallen und Tanzböden Anwendung.

Zum Schutz vor Schmutz, Feuchtigkeit und Abrieb werden Parkettböden mit einer Oberflächenbehandlung (Versiegelung) versehen. Hierbei kommen Wasserlacke und Alkydharzlacke zum Einsatz, welche durch chemische Vernetzung (Aushärtung) einen zähelastischen, harten Film bilden, der Poren und Zwischenräume verschließt und so vor Abrieb, Verschmutzung und feuchtigkeitsbedingtem Aufquellen schützt.

Alkydharzlacke zeichnen sich durch besonders schöne optische Effekte (Farbgebung, schöne warme Anfeuerung, kein Weißbruch) aus. Allerdings enthalten Alkydharzlacke sehr hohe und wenig umweltfreundliche Lösungsmittelanteile und werden nach wie vor zur Beschleunigung der Aushärtung mit gesundheitsbedenklichen metallhaltigen Katalysatoren (z.B. Cobaltsalze) versetzt.

Um Umweltrisiken und Gesundheitsbedenken zu reduzieren, wurden wasserbasierte Polyurethan-Acrylat-Systeme entwickelt, deren Marktanteil mittlerweile knapp 80% des Gesamtvolumens im Bereich „Parkettlacke“ ausmacht. Allerdings sind die herausragenden optischen und technischen Eigenschaften lösemittelhaltiger Alkydharz-Systeme (schöne Farbgebung, schöne warme Anfeuerung, kein Weißbruch, keine Seitenverleimung) mit wasserbasierten Produkten - also Grundierungen und Decklacken - bisher nicht zu realisieren.

Eine mögliche Alternative bieten wasserbasierte Alkydharz-Systeme. 2011 entwickelte die IRSA Lackfabrik einen auf nachwachsenden Rohstoffen basierenden, wasserverdünnbaren Alkydharzlack, der sich durch eine natürliche Anfeuerung auszeichnet, die mit lösemittelhaltigen Alkydharzsystemen vergleichbar ist. Weiterhin erlaubt die geringe Elastizität des Lackfilms (Alkydharz), dass beim Quellen und Schwinden des Holzes (Angleichung der Holzfeuchte an die Luftfeuchte) der Lack sich nicht dehnt, wie beispielsweise die aktuell sich auf dem Markt befindenden Wasserlacksysteme basierend auf Acrylaten und Polyurethanen (durch das Dehnen von Acrylat- oder Polyurethan-Wasserlacken entstehen dann Weissfugen und im weiteren Verlauf der sog. Weißbruch), sondern gleich reißt. Im Fachjargon spricht man bei Alkydharzlacken von einer geringen Seitenverleimung - der Lack reißt, statt sich zu dehnen - gravierende optische Mängel wie Weißbruch, Blockverleimung, Blitzfugen werden so vermieden. Die Fugen, die durch das Arbeiten des Holzes entstehen, zeigen bei relativ spröden Alkydharzlacken durch das schnell einsetzende Reißen dann eine gleichmäßige Fugenöffnung und keine optischen Störungen.

Bei dem entwickelten wässrigen Alkydharzsystem konnte die geringe Seitenverleimung sehr gut erreicht werden. Schwierige Einsatzzwecke wie Schwingböden (Turnhallenböden), Hölzer, die zu starkem Quellen und Schwinden neigen (z.B. Obstholz, Buche) oder in Kombination mit herkömmlichen Wasserlacken zu Verfärbungen neigen, könnten mit diesem neuen wässrigen Alkydharzsystem endlich risikolos geschützt werden. Somit stellen solche wässrigen Alkydharze eine echte Innovation im Wasserlackbereich dar.

Allerdings konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt kein wasserbasierter, umweltfreundlicher Trockner für das beschriebene wässrige Alkydharzsystem entwickelt werden. Somit fehlen bis heute praktikable, umweltfreundliche und gesundheitlich unbedenkliche Alternativen, die sich mit den besonderen Eigenschaften konventioneller lösemittelhaltiger Alkydharzsysteme messen können.

Alkydharzlacke werden durch Kondensation mehrwertiger Alkohole mit mehrprotonigen Säuren gebildet, wobei zur Modifizierung der Harzeigenschaften ungesättigte Fettsäuren zugesetzt werden. Bei lufttrocknenden Alkydharzlacken erfolgt die Polymerisation (Aushärtung) über eine Quervernetzung der Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäurereste durch Reaktion mit Luftsauerstoff.

Zur Beschleunigung der Polymerisationsreaktion und somit zur Verringerung der Trocknungszeit werden metallhaltige Katalysatoren (Trocknungsbeschleuniger) eingesetzt.

Hierbei kommen unter anderem Cobaltkomplexe zum Einsatz, welche aufgrund ihrer potentiell krebserzeugenden Wirkung jedoch umstritten sind (Bucher et al. 1999; Lison et al. 2001)

Diese toxischen Metallkatalysatoren könnten jedoch durch Biokatalysatoren ersetzt werden, wobei sich vor allem Laccasen als vielversprechend herausgestellt haben. Laccasen gehören zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen (EC 1.10.3.2) und katalysieren die Oxidierung von phenolischen Substanzen während gleichzeitig Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Laccasen kommen in Pilzen, Bakterien und Pflanzen vor und finden bereits in einer Vielzahl an unterschiedlichen biotechnologischen Prozessen Verwendung. Um die Substratspezifität von Laccasen zu erweitern, können Mediatoren, die als „Elektronen-Shuttle“ wirksam eingesetzt werden.

Greimel et al postulierten (Greimel et al. 2013) einen Trocknungsprozess von Alkydharzen mit einem enzymatischen System, wobei in einem ersten Schritt ein Mediator von der Laccase oxidiert wird, während gleichzeitig Sauerstoff als Elektronen-Akzeptor zu Wasser reduziert wird. Der oxidierte Mediator abstrahiert ein Wasserstoff-Atom von einer ungesättigten Fettsäure und es bildet sich ein Fettsäure-Radikal. Durch Einbau von Luftsauerstoff entsteht in weiterer Folge ein Hydroperoxid. Durch den Zerfall dieses Hydroperoxids entstehen weitere Radikale aus denen sich ein vernetzter Lackfilm, bestehend aus C-C, C-O-C und C-O-O-C Verbindungen aufbaut. **(Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.)**.

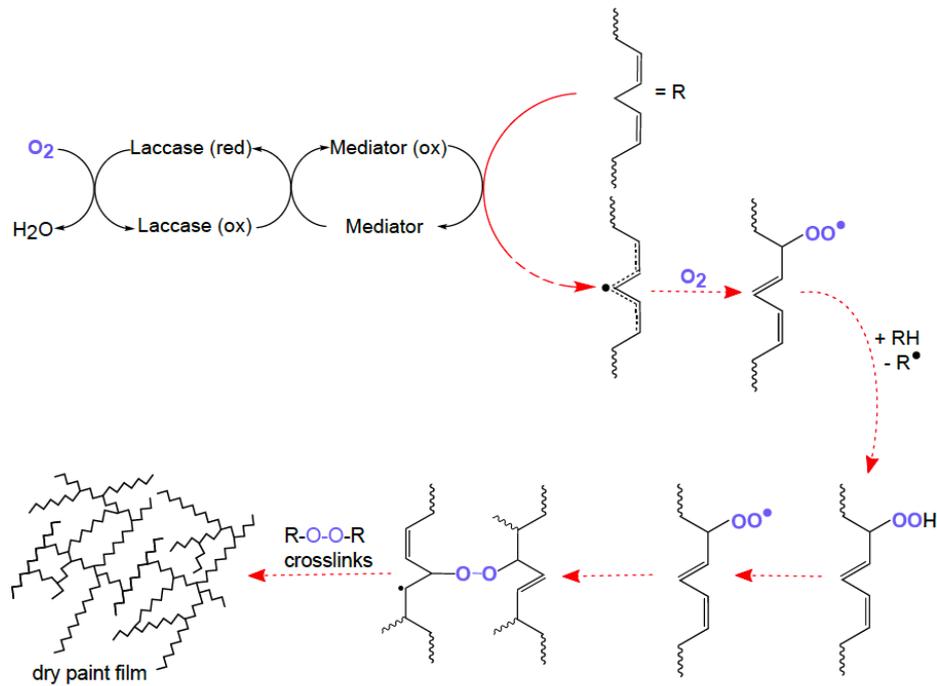


Abbildung 1: Trocknungsprozess von Alkydharzen mit dem Laccase-Mediator-System

Da die verwendeten Metallkatalysatoren im Verdacht stehen, krebserregend für Lunge und Gewebe zu sein, ist die biologische Alternative von besonderer Bedeutung für Lackproduzenten und Verbraucher. Eine neue, enzymatische Methode ist nicht nur ressourcenschonend, sie revolutioniert vor allem die Umweltfreundlichkeit von Lacken und vermeidet Gesundheitsschäden überall dort, wo die Lacke zum Einsatz kommen.

Bislang wurde das Potential dieser umweltfreundlichen Technologie noch nicht für die Entwicklung von Trocknungssystemen für Parkettbodenlacke genutzt. Jedoch bietet die biologische Alternative der metallbasierten Trocknungsmittel gerade hier eine große Chance.

Für das Forschungsvorhaben zur Entwicklung eines Enzym-basierten Trockners wurden folgende Schwerpunkte festgelegt: [KG3]

- Modifikation der Modellreaktion, wobei sowohl das enzymatische System, als auch die Lack-Rezeptur variiert werden kann
- Selektion potentieller Inhaltsstoffe
- Anwendungstests, sowie Lacktechnische Überprüfung

1. Probenliste

Für die Entwicklung des Enzym-basierten Trockenstoffes wurden von IRSA folgende Alkydharzproben (Tabelle 1) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1: Liste der Alkydharze

	Alkydharz	Interne Bezeichnung v IRSA	Beschreibung
1	Inokem UR Exp 141	AAV106	Urethan-modifizierte Alkydemulsion (36% Öllänge)
2	Synthalat PWM 883	AA107	Urethanisierte Alkydharzemulsion (mittelölig, 45%) – 20% Ricinusfettsäure, 22% Tallölfettsäure
3	Synthalat PWL 819		Urethanisierte Alkydemulsion auf Langölbasis, amin- und ammoniakfrei, vorneutralisiert mit Natriumhydroxid, Ölgehalt: ca.65%
4	Atremul SO 27/45		modifizierte kurzölige Alkydemulsion: Festkörper 45%, Pflanzliches Öl, Ölgehalt 33 %
5	Atremul SO 40/42		kurzölige Alkydemulsion: Festkörper 42%, pflanzliches Öl, Ölgehalt 24 %, Ölgehalt 24 %
6	Atremul MO 15/50W		mittelölige Alkydemulsion: Festkörper 50%, pflanzliches Öl, Ölgehalt 46%
7	Inokem UR 3301		Urethan modified alkyd emulsion of medium oil length (39% oil length)
8	Inokem UR 3304		PU-alkyd emulsion
9	WorleeSol NW 474		Öllänge ca. 74%
10	Rokralux RK 6875		Öllänge ca. 74%

Außerdem wurde das Rohharz Synthalat PWL 819 auch in Form eines Aquaalkyds zur Verfügung gestellt. Dies enthält neben dem Rohharz auch alle weiteren Zusätze, die den Alkydharzen in der Regel beigemischt werden. Die Bezeichnung und Zusammensetzung des Aquaalkyds befindet sich in Tabelle 2 und Tabelle 3.

Tabelle 2: Bezeichnung Aquaalkyd auf Basis von Synthalat PWL 819

Alkydharz	Interne Bezeichnung v IRSA	Beschreibung
Aquaalkyd	V110	86,55% PWL 819

Tabelle 3: Zusammensetzung des Aquaalkyds V110

Zusatz	Anteil [%]
Synthalat PWL 819	86,55
Butylglykol	3,00
Wasser	8,15
Aerosil R 972	1,00
Acematt TS 100	0,50
Agitan 351	0,50
Schwego Antimec	0,30

Um die Performance des bereits zu einem früheren Zeitpunkt untersuchten Harzes PWM 883 zu erhöhen, wurden das Harz mit unterschiedlichen Leinölderivaten gemischt. Da sich PWM 883 in Anwendungsversuchen als vielversprechend dargestellt hat, wurde dieses Harz dem PWL 819 vorgezogen. Wie bereits erwähnt, zeichnet sich Leinöl besonders durch einen hohen Anteil an oxidierbaren einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus. Zusätzlich wurde ein wässriges Alkydharzgemisch mit einem Linol/Linolsäureanteil von 100% getestet (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammensetzung Alkydharzmuster mit Leinölzusatz

Bezeichnung	Hauptbestandteil	Zusatz
V 1 2 2	PWM 8 8 3, 90%	QWL 2 8 7 3 (Leinölalkyd), 10%
V 1 2 3	PWM 8 8 3, 90%	Leinöl, 10%
V 1 2 4	Synthalat W 4 8 wässriges Alkydharzgemisch mit Linol/Linolsäureanteil, 100%	---

2. Enzym & Mediatoren

2.1 Laccase

Laccasen gehören zur Familie der Oxidoreduktasen (EC 1.10.3.2) und katalysieren die Oxidierung von phenolischen Substanzen während gleichzeitig Sauerstoff zu Wasser reduziert wird (Thurston 2010). Laccasen kommen in Pilzen, Bakterien und Pflanzen vor und finden bereits in einer Vielzahl an unterschiedlichen biotechnologischen Prozessen Verwendung. Um die Substratspezifität von Laccasen zu erweitern, können Mediatoren eingesetzt werden, wie es auch bei dem Trocknungssystem der Fall ist.

Da die getesteten Alkydharze einen pH-Wert im neutralen bis leicht basischen Milieu aufweisen, werden erste Versuche mit einer Laccase des Organismus *Myceliophthora thermophila* (MtL) durchgeführt. Dieses Enzym weist ein pH-Optimum bei pH 7 auf.

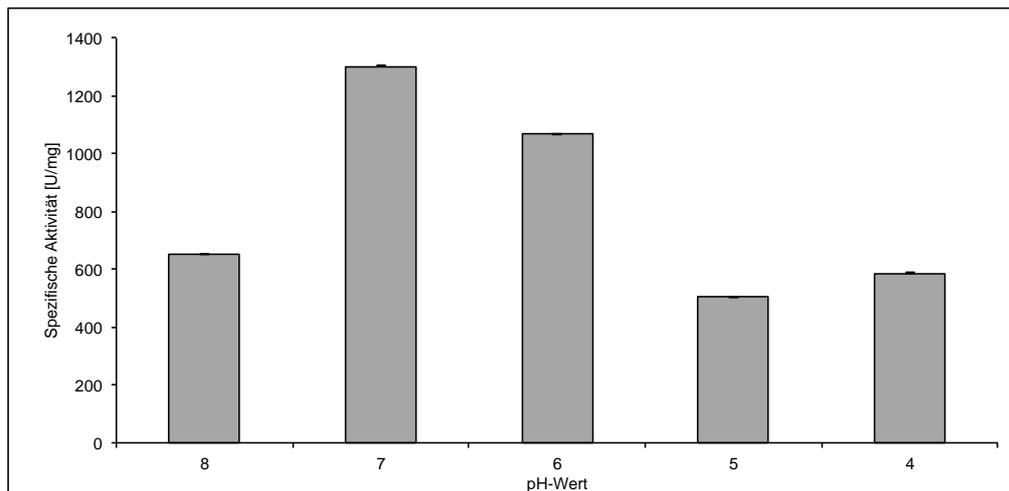


Abbildung 2: pH Optimum der Laccase von *Myceliophthora thermophila*

2.2 Mediatoren

Mediatoren wirken in dem untersuchten Trocknungssystem als „Elektronen-Shuttle“ zwischen der Laccase und dem Alkydharz („Substrat“). Es hat sich gezeigt, dass die Zugabe von Mediatoren notwendig ist, da Laccasen die Fettsäuren im Alkydharz aufgrund des hohen Redoxpotentials der Fettsäuren nicht direkt oxidieren können. Es stehen eine Vielzahl von synthetischen und natürlichen Mediatoren zur Verfügung, wobei der optimale Mediator für die jeweilige Fettsäurezusammensetzung ermittelt werden muss. Eine Darstellung der Strukturen der verwendeten Mediatoren befindet sich im Anhang.

3. Messung des Sauerstoffverbrauchs in Alkydharzemulsionen

3.1 Durchführung

Es hat sich herausgestellt, dass der Sauerstoffverbrauch, der nach der Zugabe des Substrates (Alkydharz) zum Laccase-Mediator-System beobachtet werden kann, eine gute Möglichkeit darstellt, nach geeigneten Mediatoren zu screenen, wobei die Messung mit einem faseroptischen Mikrosensor (Firesting, PyroScience GmbH) erfolgt und bei der Durchführung folgendermaßen vorgegangen wird:

Zunächst wird der Mediator vorgelegt und sobald sich eine stabile Sauerstoffsättigung eingestellt hat, wird das Enzym zugegeben. Die Oxidation des Mediators kann durch den Abfall der Sauerstoffsättigungskurve beobachtet werden. Sobald diese erste Reaktion beendet ist, steigt die Kurve wieder an und die Substratzugabe kann in dem Moment erfolgen, in dem sich der Wert wieder stabilisiert hat. Nun kann die Oxidation des Substrats verfolgt werden.

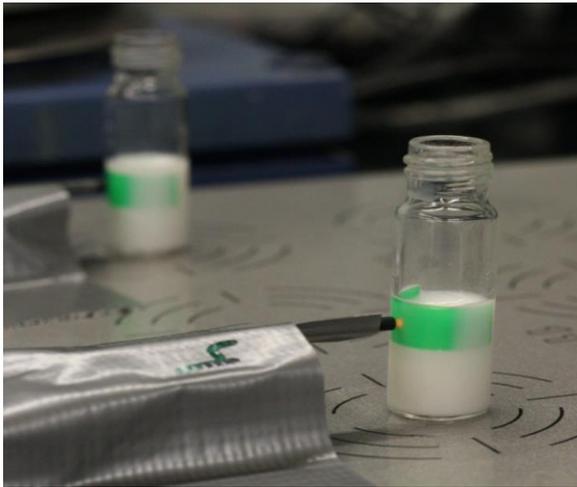


Abbildung 3: Aufbau der Sauerstoffmessung mittels optischen Sauerstoffsensoren

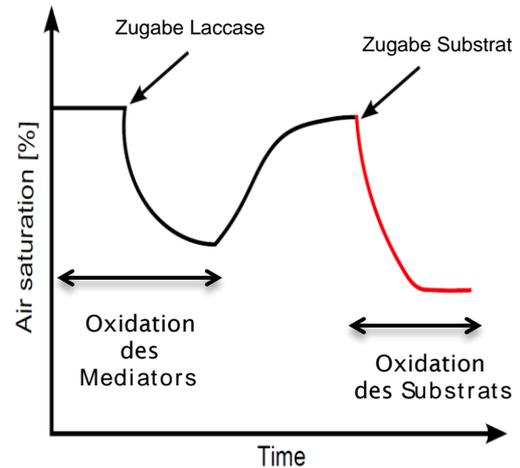


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Sauerstoffsättigungskurve

3.2 Messung der unterschiedlichen Alkydharze

Vergleicht man den Sauerstoffverbrauch der bereitgestellten Alkydharzproben (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**), sticht deutlich die Probe Synthalat PWL 819 hervor. Wie man aus der Übersichtstabelle erkennen kann, enthält Synthalat PWL 819 einen höheren Ölgehalt als die anderen Alkydharzproben. Zusätzlich dazu scheint Leinöl mit einem höheren Grad an ungesättigten Doppelbindungen vorteilhaft für das enzymatische Trocknungssystem zu sein.

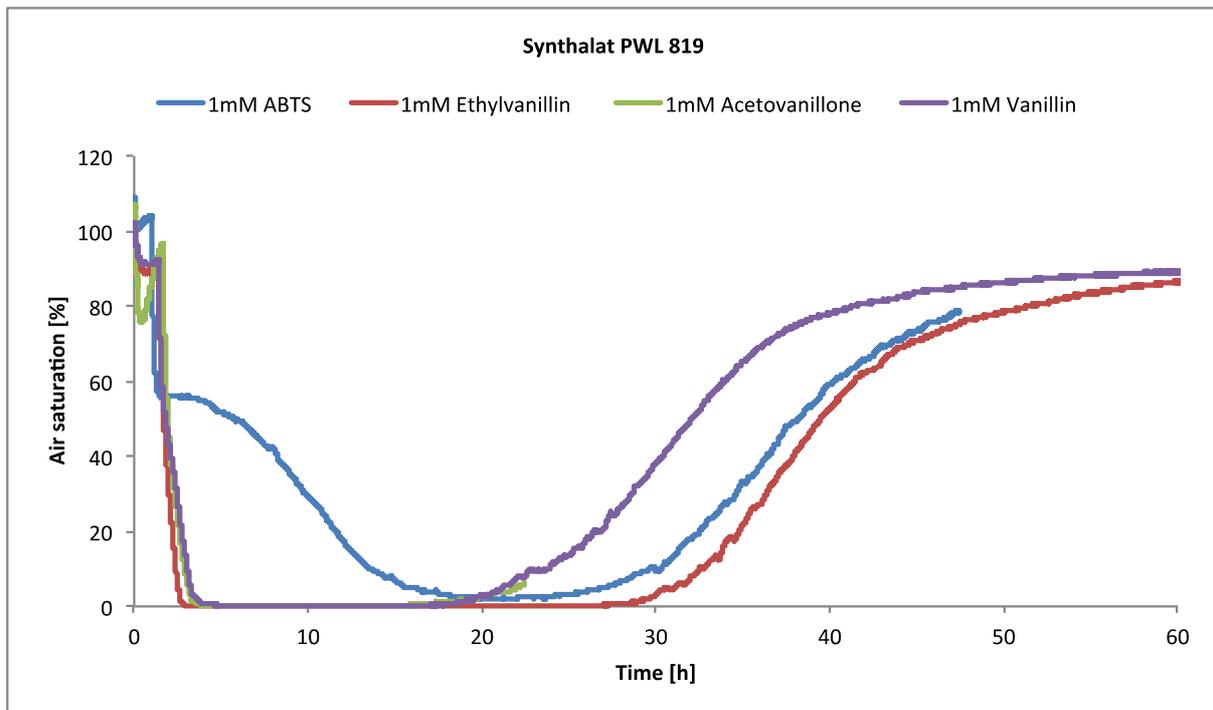


Abbildung 5: Gemessener Sauerstoffverbrauch mit unterschiedlichen Mediatoren und Synthalat PWL 819

Da beim Einsatz des Mediators Ethylvanillin der höchste Sauerstoffverbrauch gemessen wird, wird in weiterer Folge vor allem mit Ethylvanillin weitergearbeitet.

3.3 Messung des Synthalat PWL 819 Aquaalkyds

Um festzustellen, ob sich das Aquaalkyd gleich verhält wie das Rohharz Synthalat PWL 819 wurde zunächst eine Firesting-Flüssigmessung mit Ethylvanillin durchgeführt.

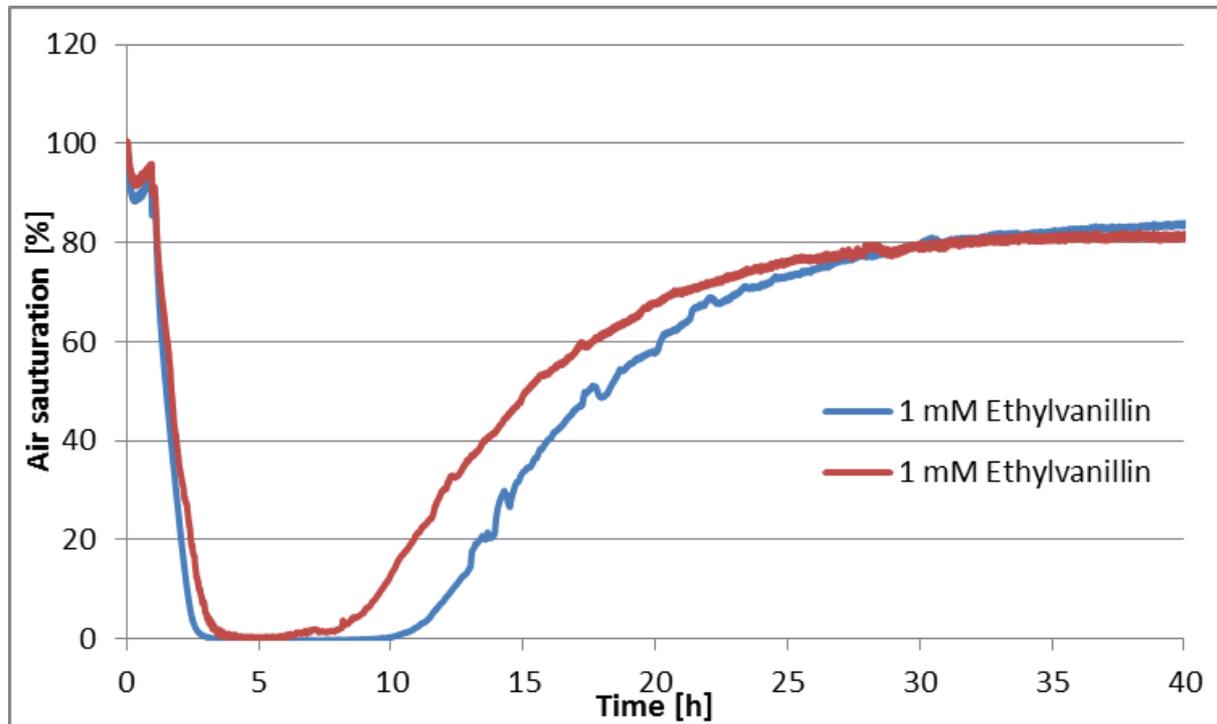


Abbildung 6: Firestingflüssigmessung mit Aquaalkyd; Ethylvanillin als Mediator

Der Sauerstoffverbrauch bei Verwendung des Aquaalkyds ist vergleichbar mit dem des Rohharzes, wenn auch geringfügig geringer, da der Wert einer 0%-igen Luftsättigung lediglich 10 Stunden gehalten wird.

3.4. Alkydharzmuster mit Leinölzusatz

Von den drei Alkydharzen mit einem erhöhten Anteil an Leinöl aus Tabelle 4 wurde eine Sauerstoffverbrauchsmessung durchgeführt.

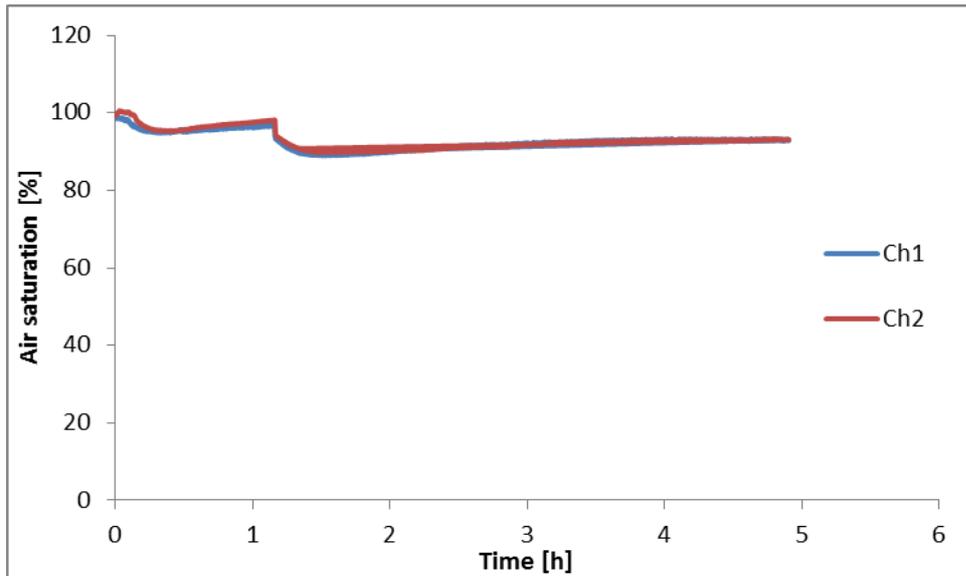


Abbildung 7: Firestingflüssigmessung V 1 2 2

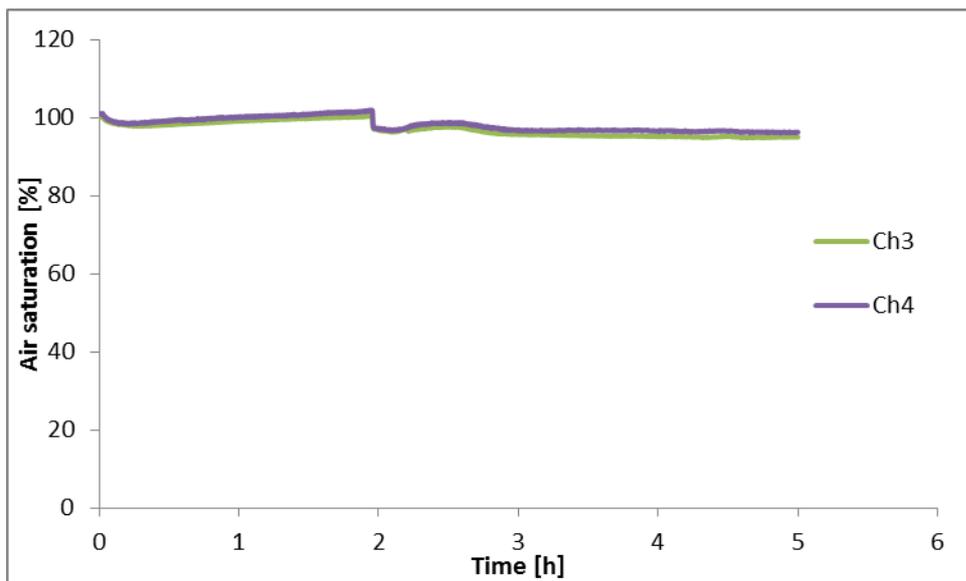


Abbildung 8: Firestingflüssigmessung V 1 2 3

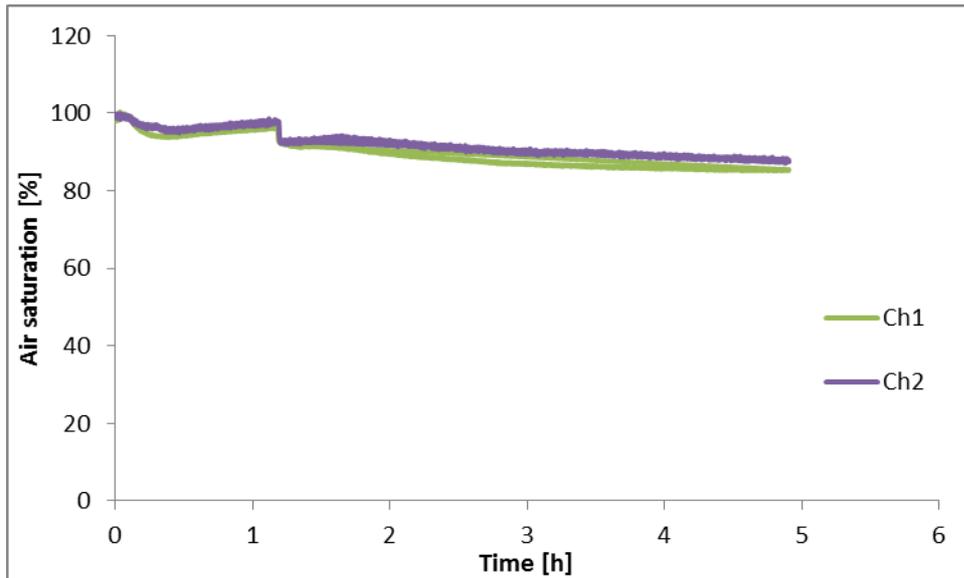


Abbildung 9: Firestingflüssigmessung V 1 2 4

Es ist ersichtlich, dass bei Verwendung desselben Mediators Ethylvanillin der Sauerstoffverbrauch nicht annähernd so hoch ist, wie bei Verwendung des Alkydharzes PWL 819 (vgl. Abbildung 6).

Möglicherweise ist Ethylvanillin für diese Harzmuster nicht geeignet. Es müsste daher ein weiteres Mal ein Mediatorscreening durchgeführt werden. Zusätzlich könnte die Reaktionsgeschwindigkeit unter der Diffusionsrate des Sauerstoffs liegen.

In einem nächsten Schritt wurde eine zehnfach höhere Konzentration an Mediator und eine zehnfach höhere Enzymaktivität eingesetzt.

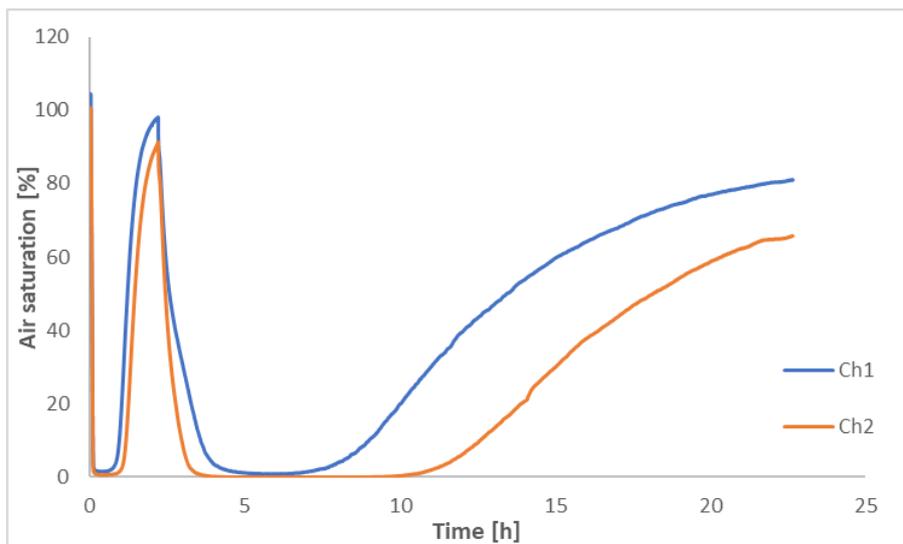


Abbildung 10: Firestingflüssigmessung V 1 2 2

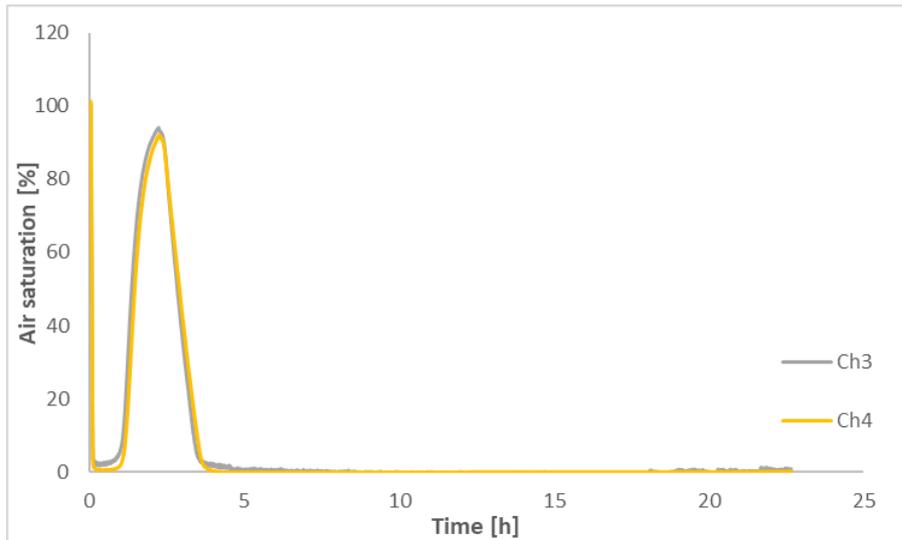


Abbildung 11: Firestingflüssigmessung V 1 2 3

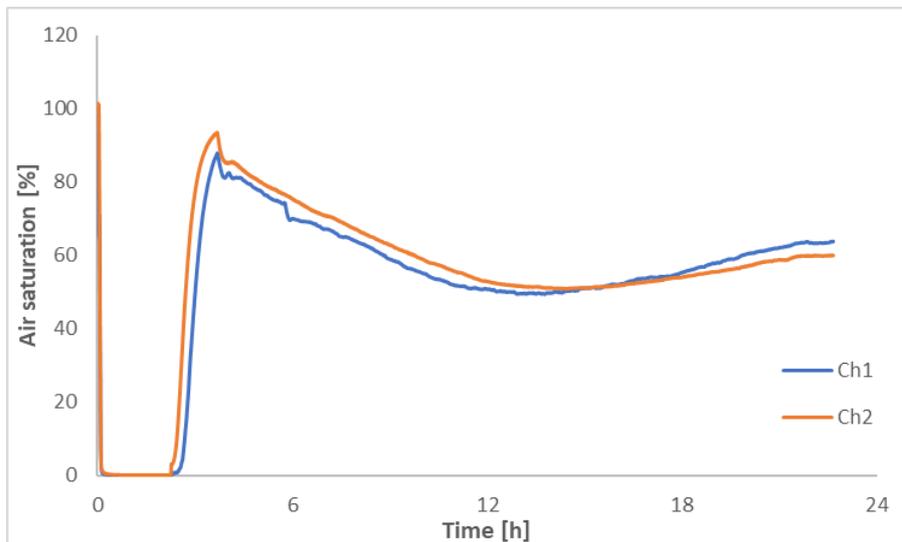


Abbildung 12: Firestingflüssigmessung V 1 2 4

Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen den drei Proben zu erkennen, wobei das Alkydharz V123 den höchsten Sauerstoffverbrauch aufweist. Dieses Ergebnis zeigt auch klar, dass es einen Unterschied ausmacht, wie das Leinöl im Alkydharz vorliegt (Leinölalkyd in V122 vs. Leinöl in V123).

4. Messung des Sauerstoffverbrauchs im Dünnschichtfilm

Neben den Sauerstoffverbrauchsmessungen in den Alkydharzemulsionen wurden auch Messungen in einem aufgezogenen Alkydharzfilm durchgeführt. Dafür kommt der gleiche Sensor wie bei den Sauerstoffmessungen in Alkydharzemulsion zum Einsatz, mit dem Unterschied, dass die Proben auf einer mit dem Sensor markierten Folie aufgetragen werden.

Um die Eignung der Methode zu überprüfen, wurde zunächst eine Messung mit einem Cobalt-Katalysator angesetzt. Dieser wurde zuvor direkt in dem Harz PWL 819 gelöst und anschließend in verschiedenen Schichtdicken aufgetragen:

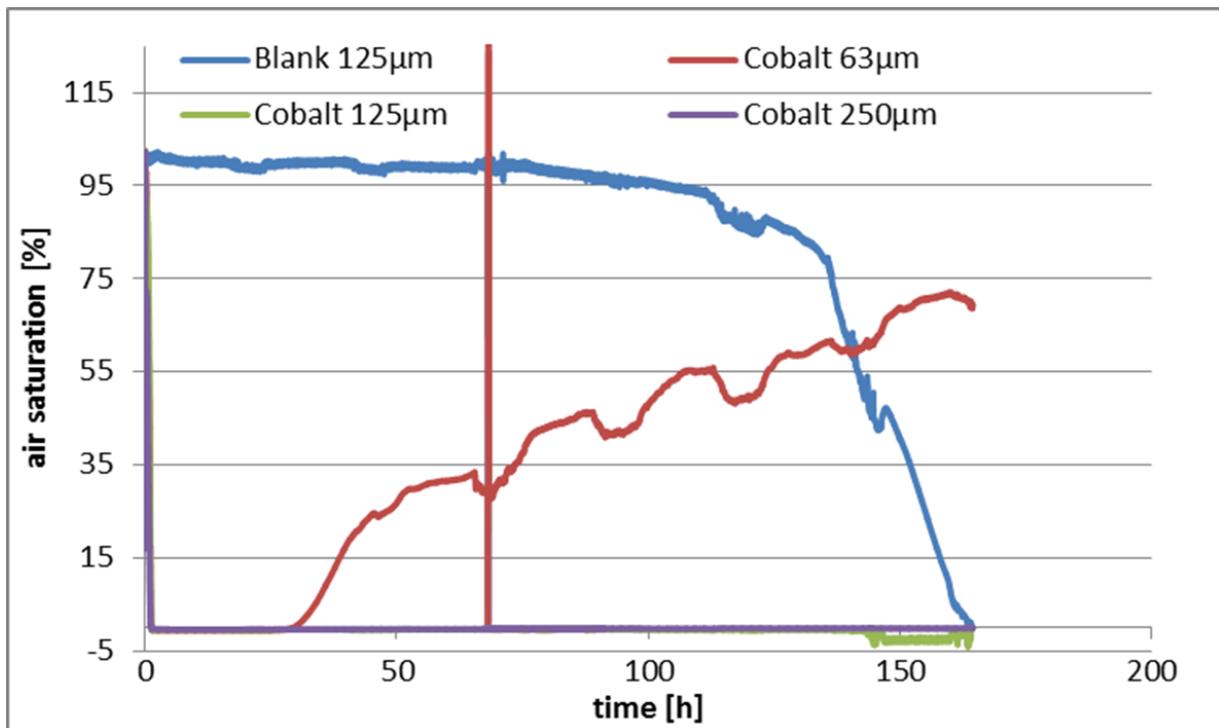


Abbildung 13: Filmmessung mit PWL 819 und Cobalt Katalysator, reines Harz als Blank

Nach etwa 65h wurde der 63µm Alkydharzfilm sowohl mit Stickstoff als auch mit Sauerstoff begast um die Gaspermeabilität des Filmes zu überprüfen (Startpunkt: rote vertikale Linie).

Neben den Versuchen mit Cobalt als Positivkontrolle, wurden nun auch Experimente mit dem Laccase-Mediator System (MtL-Ethylvanillin) in Kombination mit dem Harz Synthalat PWL 819 durchgeführt. Dafür kam das Harz zunächst 1:3 mit Wasser verdünnt zum Einsatz. Die Laccase wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen getestet und zwar einmal niedrig (MtL1) und einmal höher (MtL2) dosiert.

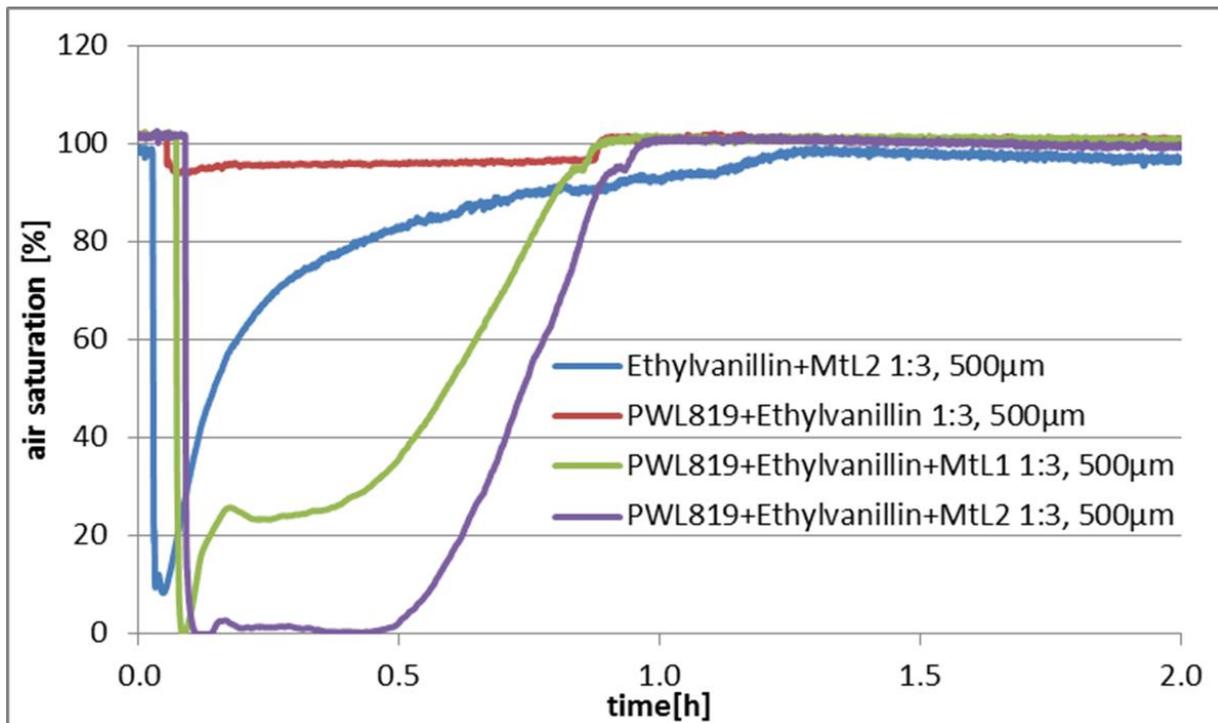


Abbildung 14: Synthalat PWL 819 mit MtL und Ethylvanillin

In Abbildung 14 ist der Sauerstoffverbrauch über den Zeitraum von zwei Stunden dargestellt und der Zusammenhang zwischen O₂-Sättigung und dem Vorhandensein von Laccase (bzw deren Dosierung) in der Probe ist deutlich erkennbar. Des Weiteren lässt sich der Einfluss der Anwesenheit des Mediators auf die Kurvenform erkennen: Ist Mediator vorhanden, bleibt die O₂-Sättigung länger auf einem niedrigen Wert.

Durch die Sauerstoffverbrauchsmessung im Dünnschichtfilm konnte die Aktivität der Laccase im Alkydharz bestätigt werden.

4.1 Messung in einer Feuchtkammer

Um zu untersuchen, welchen Effekt die Stabilisation des Wassergehalts der Filme auf den Sauerstoffverbrauch hat, wurde eine Feuchtkammer für die Sauerstoffmessung entworfen.

Dafür wurde zunächst ein 1x1 cm großes Quadrat der Firesting-Sensorfolie mit Silikonkleber auf den Boden eines 20 mL Fläschchens geklebt. In dem Plastikdeckel wurde mit doppelseitigem Klebeband ein etwa 5x5 cm großes Stück Papierhandtuch befestigt. Das Papierhandtuch wurde mit 200 µL MQ-H₂O befeuchtet und das Fläschchen mit dem Deckel verschlossen.



Abbildung 15: Feuchtkammer für Dünnschichtmessungen

Bei der Messung kam sowohl Synthalat PWL 819, als auch Aquaalkyd V110 zum Einsatz. Die Harze waren 1:2 und 1:4 mit H₂O verdünnt, wobei jeweils genau 120 µm der unverdünnten Harze aufgetragen werden. Nach etwa 40 h wurden die Feuchtkammern geöffnet, um zu überprüfen ob der Sauerstoffgehalt noch weiter steigt

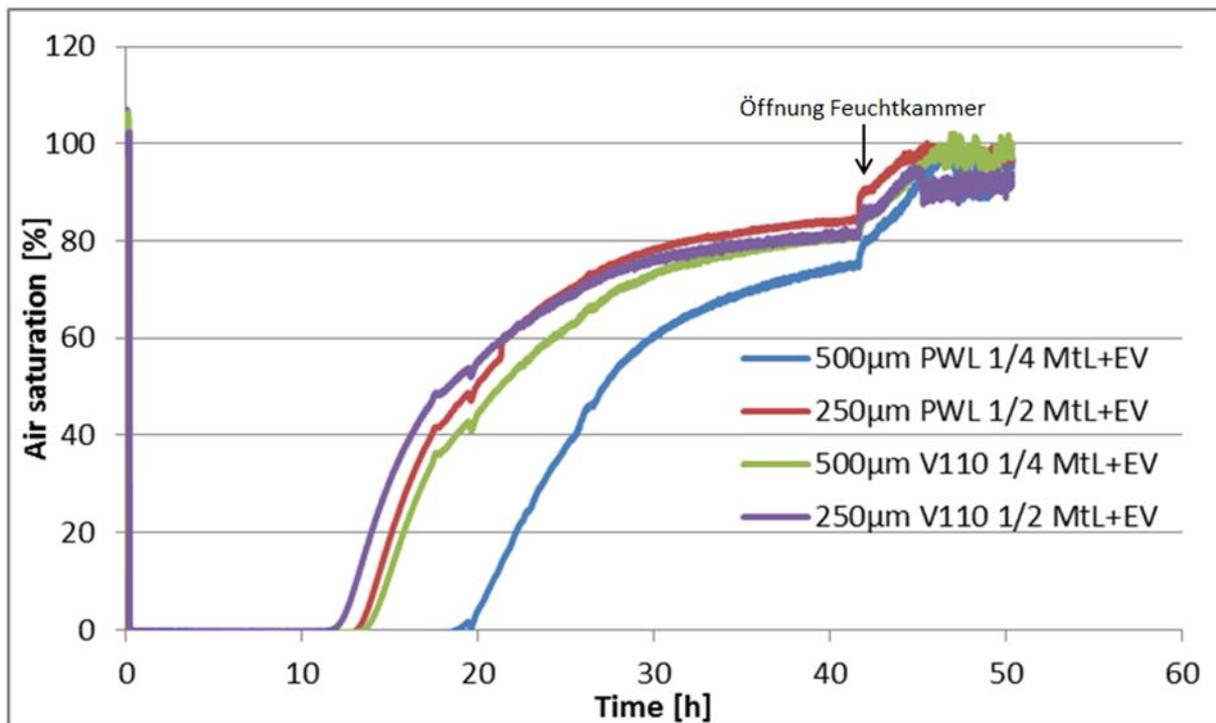


Abbildung 16: O₂-Verbrauchsmessung-Dünnschichtfilm in der Feuchtkammer

Die Sauerstoffsättigung war über einen Zeitraum von 10 - 20 h auf 0% gesunken und stieg dann wieder langsam auf etwa 80% an. Nach dem Öffnen der Kammer stieg der O₂-Gehalt weiter auf etwa 100% an. Die Filme waren danach bei Berührung trocken. Man kann hier

deutlich erkennen, dass eine feuchte Umgebung für die Trocknung mit dem Enzym-Mediator System von Vorteil ist.

5. Inhibierungstests

Mit unterschiedlichen Additiven wurden Inhibierungstests durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Aktivität der Laccase durch diese beigefügten Einzelkomponenten inhibiert wird.

Die untersuchten Einzelkomponenten werden in nachfolgender Tabelle dargestellt:

Tabelle 5: Additive

Bezeichnung/Name	Verwendung
Butylglykol	Lösungsmittel
Schwego Antimec	Antioxidans
Agitan 351	Entschäumer
Acematt TS100	Mattierungsmittel
Aerosil R972	Antiabsetzmittel

In den Fällen der zwei löslichen Komponenten Butylglykol und Schwego Antimec wurde das Enzym in der jeweiligen Lösung für die angegebene Zeitdauer inkubiert und die Aktivität wurde danach mittels ABTS-Assay bestimmt.

Der Assay beruht auf der Tatsache, dass durch die Reaktion der Laccase mit dem Substrat ABTS, ein grün gefärbtes ABTS-Radikal gebildet wird, das bei 420 nm photometrisch gut detektierbar ist. Dieser Assay wird standardmäßig für die Bestimmung der Laccase-Aktivität durchgeführt.

Es konnte festgestellt werden, dass eine wässrige 3%-ige Butylglykol-Lösung die Laccase bereits nach 24 Stunden sehr stark inhibiert.

Schwego Antimec wird als Antioxidans eingesetzt und könnte eine Konkurrenzreaktion darstellen, indem es dem System Sauerstoff entzieht, der in weiterer Folge für die Laccase nicht vorhanden ist. Erst wenn das Antioxidans verbraucht ist, kann die Laccasereaktion starten. Diese Tatsache sollte kein Problem darstellen, wenn das Antioxidans rasch "verbraucht" wird und danach der Sauerstoff für die Trocknungsreaktion zur Verfügung steht.

Für Inhibierungstests mit den nichtlöslichen Komponenten Agitan 351, Acematt TS100, und Aerosil R972 wird die Methode der Sauerstoffmessung herangezogen, da hier der üblicherweise verwendete ABTS-Assay nicht eingesetzt werden kann.

Für die Inhibierungstests wurde das Enzym über einen Zeitraum von insgesamt 96h (Agitan 351), 148h (Acematt TS100) bzw. 121h (Aerosil R972) mit der jeweiligen Einzelkomponente inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden Proben gezogen und der Sauerstoffverbrauch nach Zugabe eines Enzymsubstrates bestimmt. Zusätzlich dazu wurde der Sauerstoffverbrauch einer reinen Enzymlösung und einer reinen Einzelkomponentenlösung auf die gleiche Art und Weise getestet.

Bei keiner der unlöslichen Komponenten konnte eine Inhibierung des Enzymes festgestellt werden.

6. Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie

Neben dem Sauerstoffverbrauch ist das Abreagieren der ungesättigten Bindungen der Alkydharze ein gut geeigneter Indikator für das Verfolgen der Polymerisationsreaktion. Die C=C Doppelbindungen (unkonjugierte Doppelbindungen) der ungesättigten Fettsäuren lassen sich mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie darstellen, da sie einen spezifischen Peak bei 3010cm^{-1} verursachen. Dieser Peak nimmt im Laufe der Trocknungsreaktion ab. Gleichzeitig ist eine Zunahme der Absorption im Bereich von $3600\text{-}3100\text{cm}^{-1}$ zu erwarten (hier absorbieren Sauerstoff enthaltende Verbindungen). Für die Messung werden die Alkydharze in einer definierten Schichtdicke auf einen CaF_2 -Kristall (FTIR-Kristall) aufgetragen und die Spektren werden mit dem FTIR-Spektrometer Spektrum 100 von Perkin Elmer aufgenommen.

In der folgenden Abbildung 17 ist ein typisches FTIR-Spektrum einer Alkydharzprobe dargestellt.

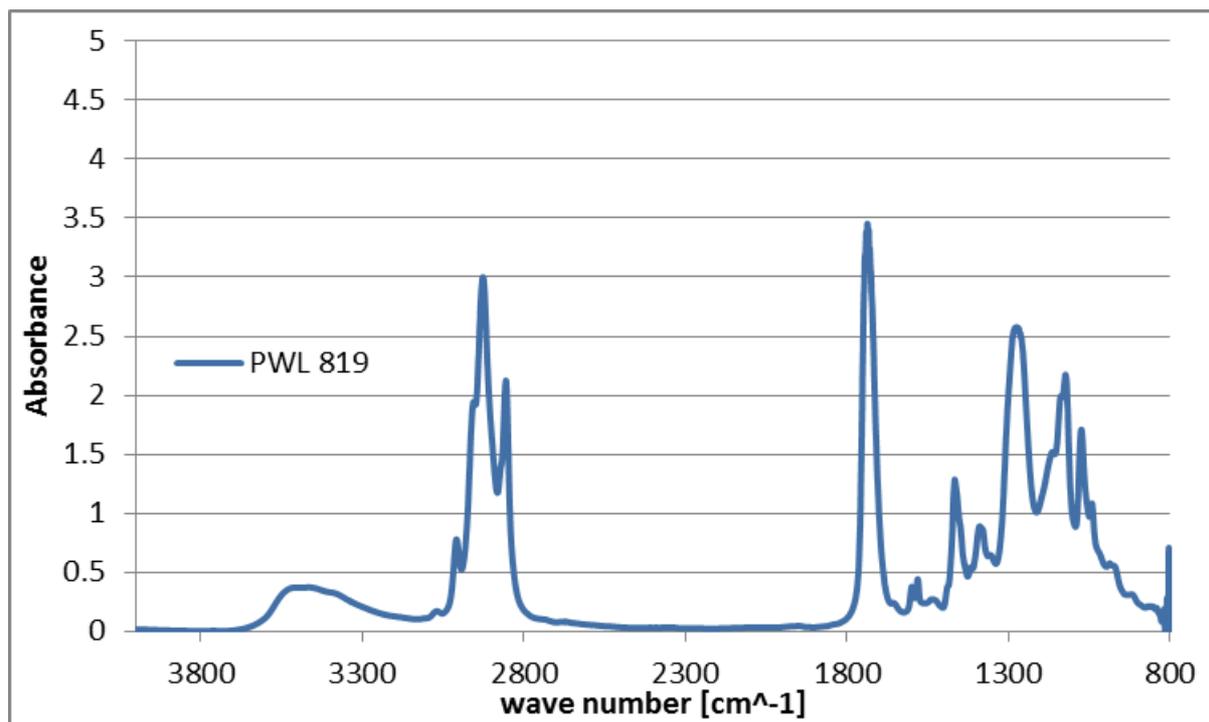


Abbildung 17: FTIR-Spektrum PWL 819, 120 μm

Um einen besseren Einblick zu liefern, wird in den folgenden Diagrammen nur mehr der relevante Bereich des FTIR-Spektrums von $3675\text{ bis }2950\text{cm}^{-1}$ dargestellt.

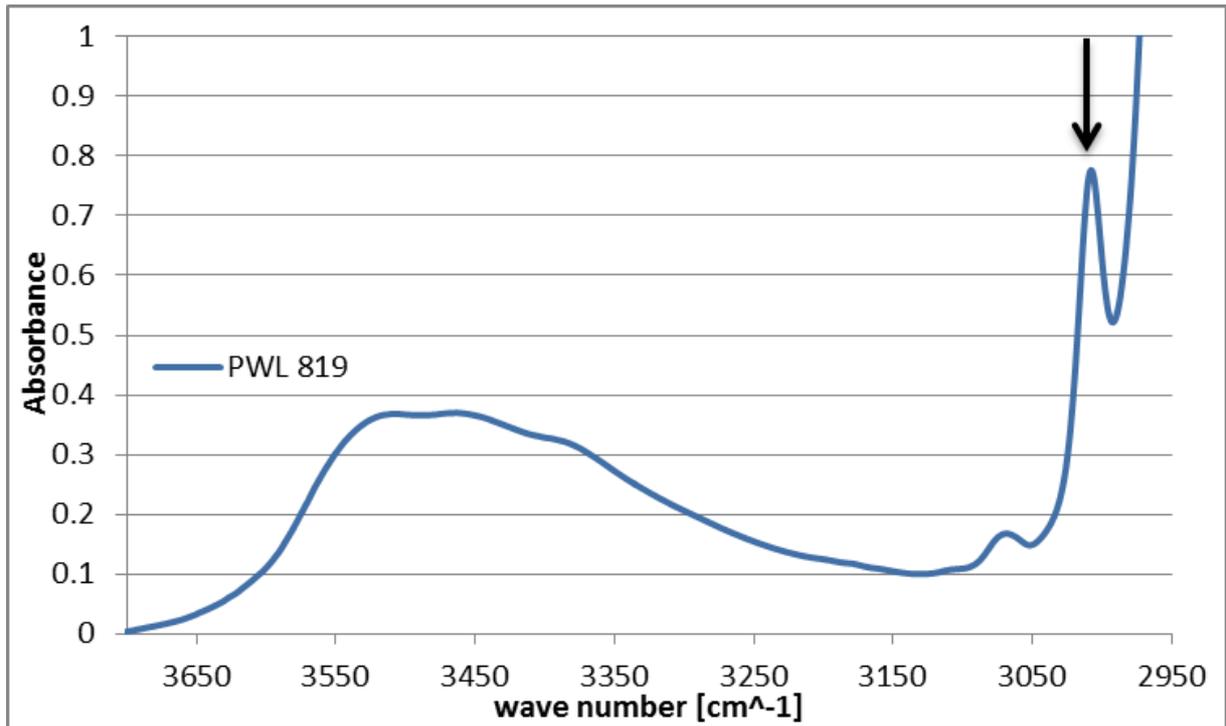


Abbildung 18: FTIR-Spektrum PWL 819, Vergrößerung relevanter Bereich, C=C Peak mit Pfeil markiert

Die Eignung der Methode wurde abermals durch Verwendung eines Cobalt-Katalysators getestet.

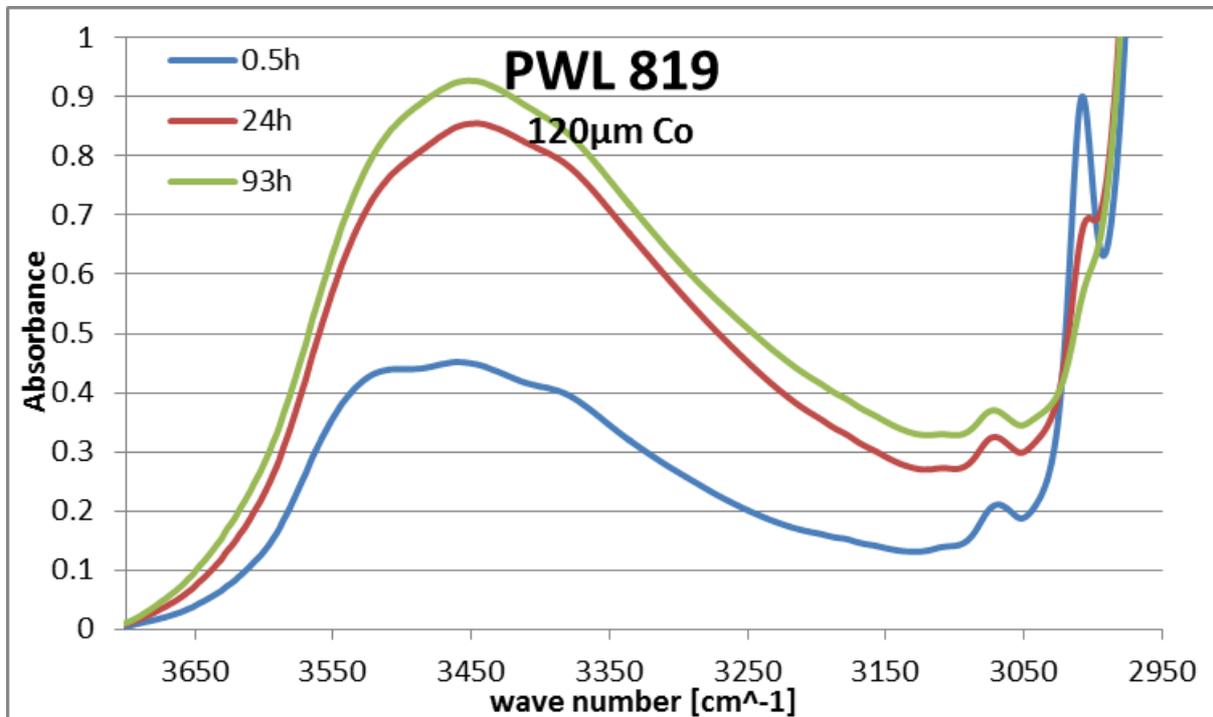


Abbildung 19: FTIR-Spektrum der Cobalt katalysierten Trocknung von PWL 819

In Abbildung 19 ist deutlich erkennbar, dass der Peak der C=C Doppelbindungen wie angenommen über die Reaktionszeit abnimmt und nach 93h sogar vollständig verschwunden ist.

6.1 Trocknung der Alkydharze in einer Feuchtkammer

Da bereits in Sauerstoffverbrauchsmessungen der positive Effekt einer feuchten Umgebungsluft festgestellt werden konnte, wurden auch die Alkydharzproben auf den FTIR-Kristallen einer solchen Umgebung ausgesetzt.

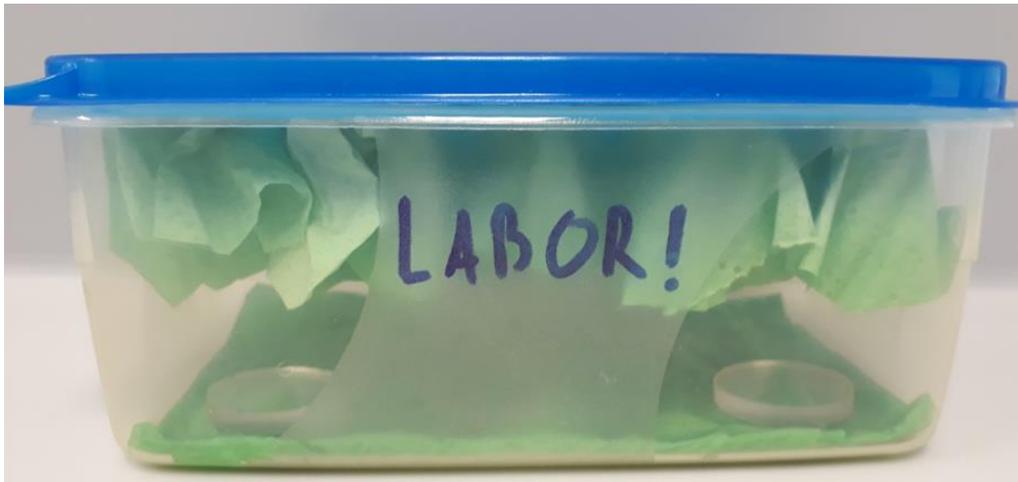


Abbildung 20: Feuchtkammer für FTIR-Messungen

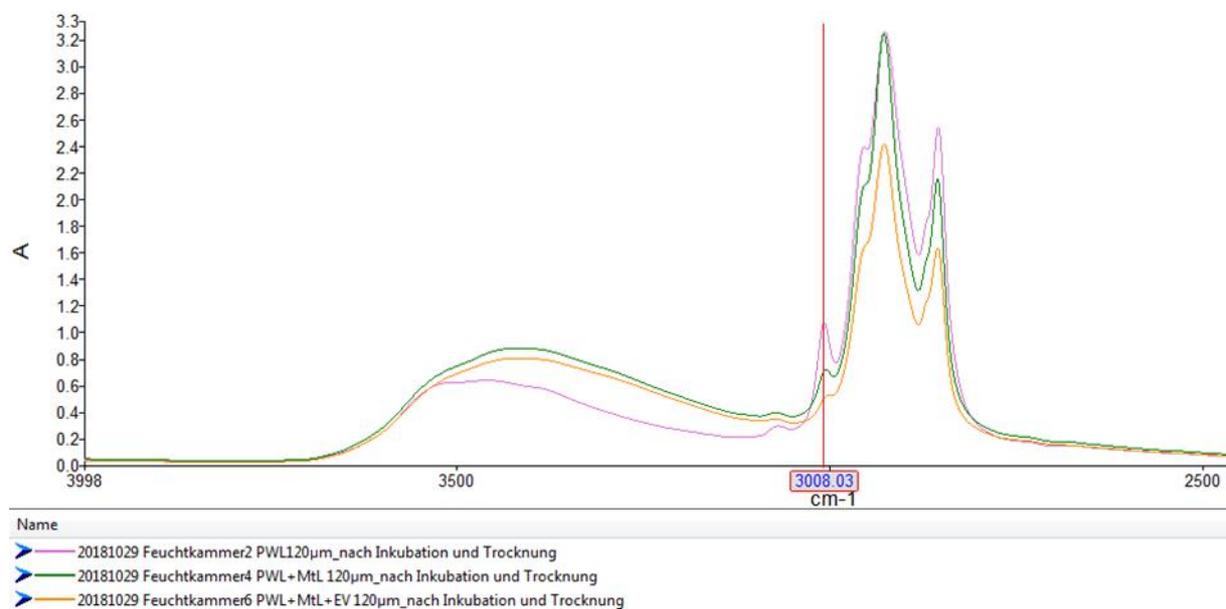


Abbildung 21: FTIR-Spektrum nach 48 h Inkubation

Nach einer Trocknungszeit von 48 h zeigte sich ein sehr deutlicher Unterschied zwischen dem 120 µm Alkydharzfilm mit Laccase-Mediator-System (MtL-Ethylvanillin; orange Linie), mit ausschließlich Laccase (grüne Linie) und ohne Trocknungssystem (rosa Linie). Der durch die C=C Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren verursachte Peak bei etwa 3010 cm⁻¹ ist in dem Spektrum mit einem roten Strich markiert. Durch die deutliche

Abnahme des Peaks der Proben mit MtL und insbesondere der mit MtL und Etylvanillin, ist die Polymerisierung qualitativ nachgewiesen.

Für die Darstellung eines Trocknungsverlaufes wurde der Peak bei 3010cm^{-1} integriert und die Fläche des Peaks wurde gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 22). Eine Abnahme des Peaks (gleichbedeutend mit einer Polymerisationsreaktion) ist bereits nach 17 Stunden deutlich erkennbar und nach 25 Stunden beinahe abgeschlossen (die weitere Reduktion des Peaks ist nur noch gering).

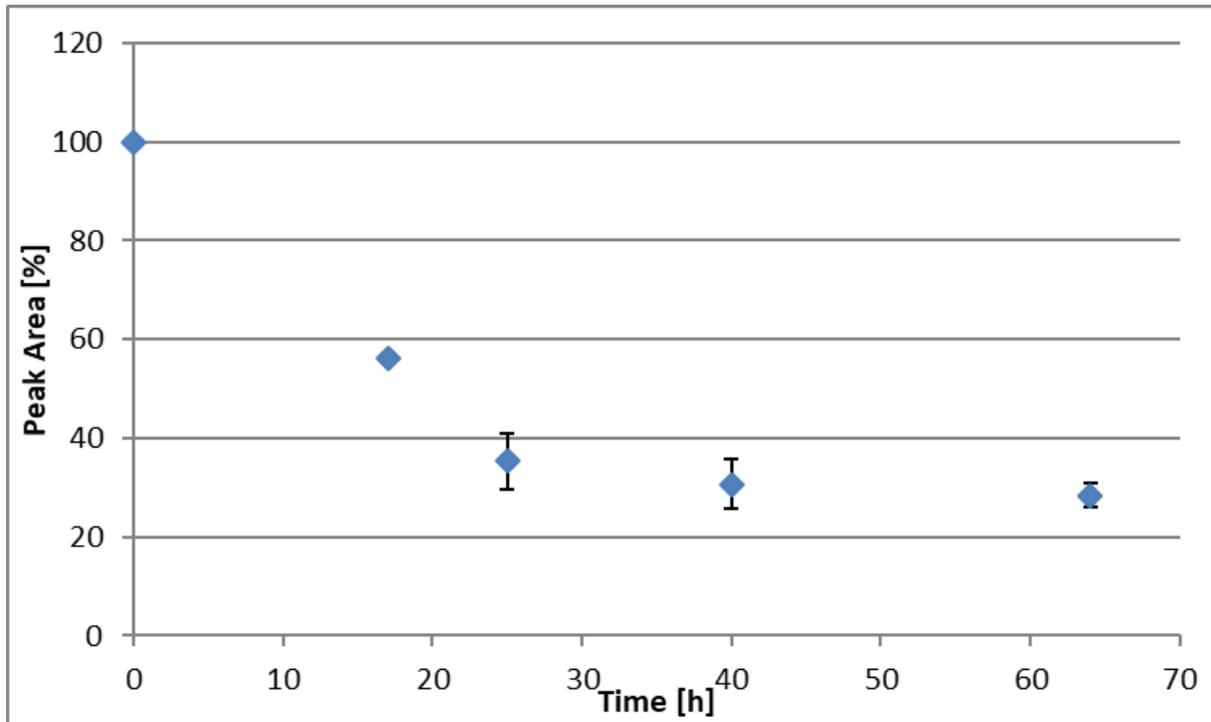


Abbildung 22: Trocknungsverlauf in der Feuchtkammer

6.2 Untersuchung der entstehenden Polymere mittels FTIR-Spektroskopie

Es konnte beobachtet werden, dass während der Sauerstoffmessung aus den Alkydharzemulsionen eine polymerartige Struktur entsteht, das nach einer angeschlossenen Lyophilisierung (Gefriertrocknung) untersucht wurde.

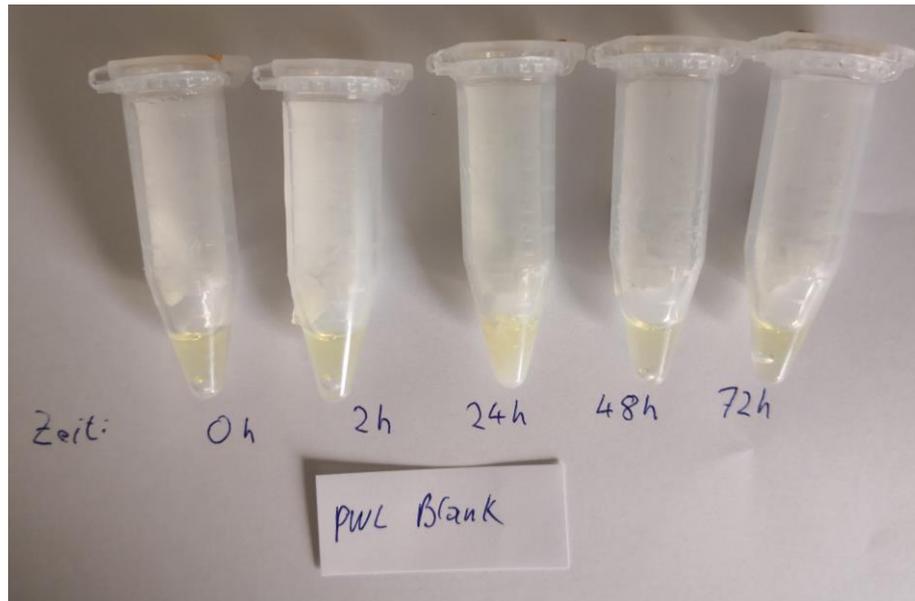


Abbildung 23: PWL 819 ohne Trocknungssystem als Negativkontrolle, gefriergetrocknet

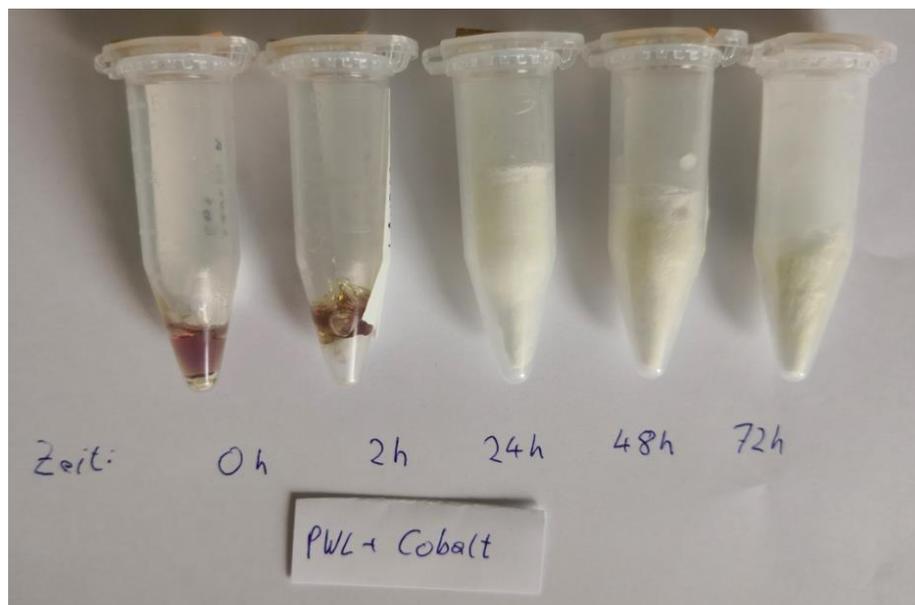


Abbildung 24: PWL 819 mit Cobaltkatalysator als Positivkontrolle, gefriergetrocknet

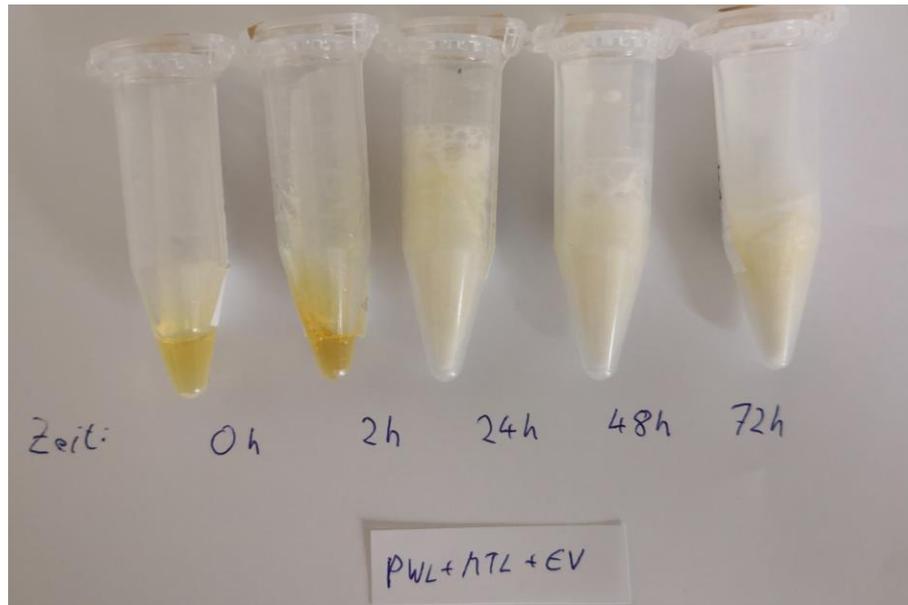


Abbildung 25: PWL 819 mit MtL und Ethylvanillin, gefriergetrocknet

Ab dem Zeitpunkt 24h waren die Positivkontrolle, als auch die Enzym-katalysierten Reaktionen deutlich von den Negativkontrollen zu unterscheiden: Diese Proben erinnerten in ihrer Form und Konsistenz an eine Art Schaumstoff der bei Berührung zwar nachgibt aber nicht haftet. Dies ist bei gefriergetrockneten Proben üblich. Bei der Negativkontrolle trat diese Veränderung selbst nach 72h nicht ein.

Um die Proben nun auch auf ihre Zusammensetzung zu analysieren wurden FTIR-Spektren von den Substanzen aufgenommen.

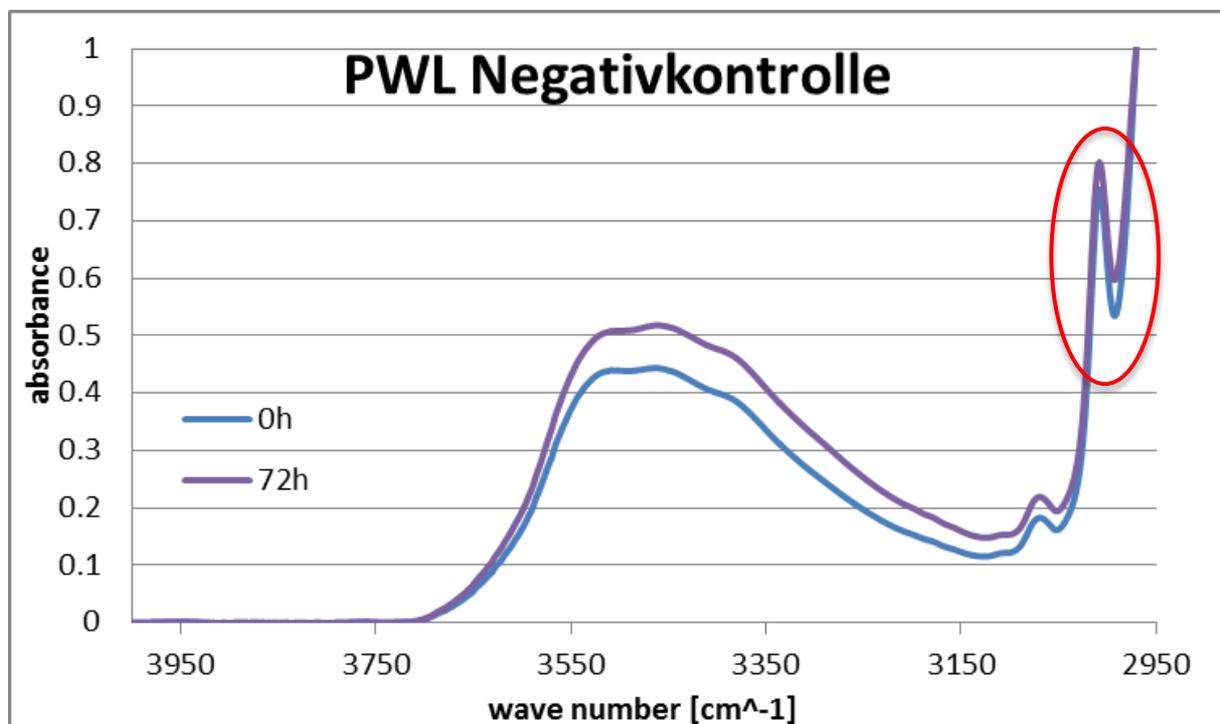


Abbildung 26: FTIR-Spektrum Polymer aus PWL 819, Negativkontrolle

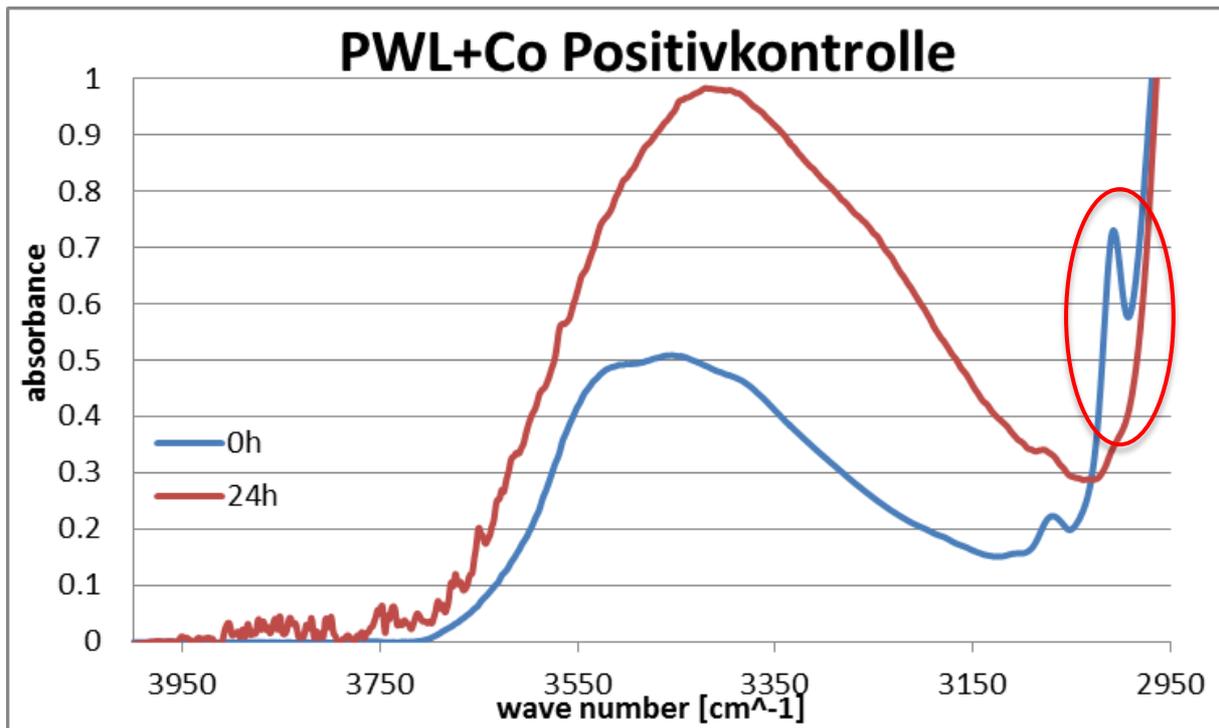


Abbildung 27: FTIR-Spektrum Polymer aus PWL 819 mit Cobaltkatalysator

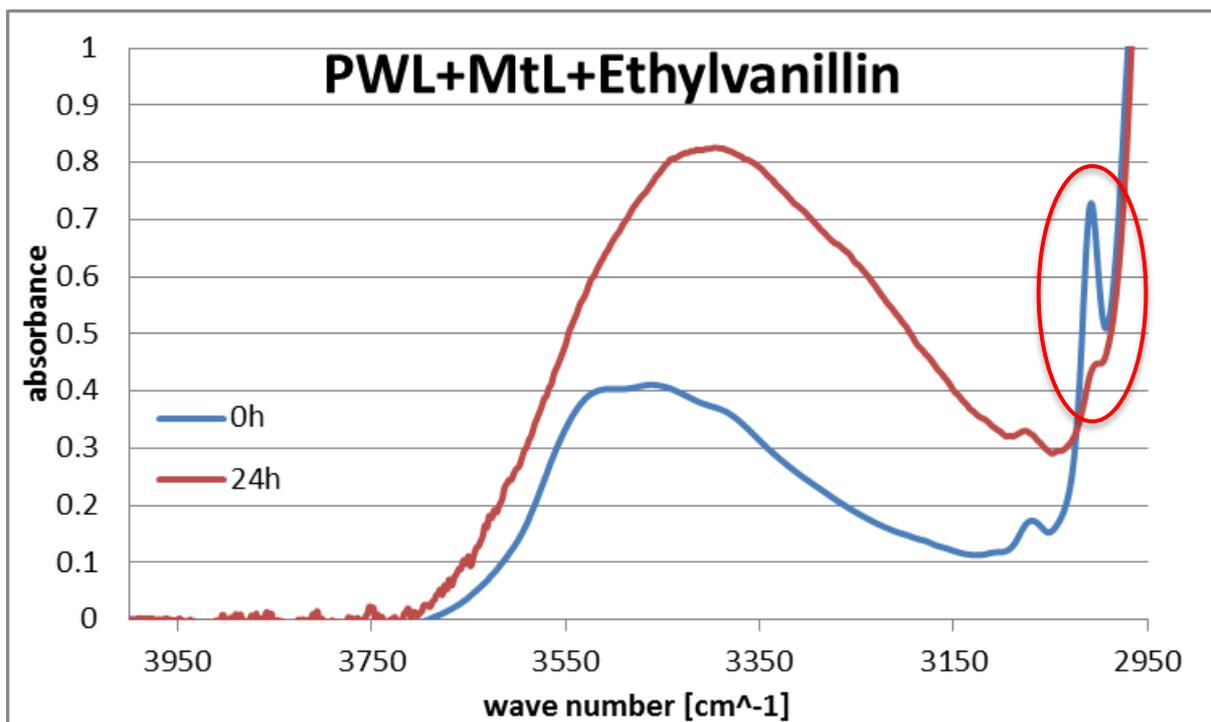


Abbildung 28: FTIR-Spektrum Polymer aus PWL 819 mit MtL und Ethylvanillin

Der durch die C=C Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren verursachte Peak bei 3010cm^{-1} ist in den Spektren jeweils rot eingekreist.

Bei der Analyse der Spektren fällt auf, dass sowohl bei der Positivkontrolle mit Cobalt, als auch bei der Enzym-katalysierten Reaktion die Abnahme dieses Peaks bereits nach 24h deutlich erkennbar ist, was auf ein Abreagieren der C=C Doppelbindungen schließen lässt. Dies ist ein Indikator für das Ablaufen der Polymerisierung der Alkydharze. Bei der

Positivkontrolle ist der Peak nach 24h vollständig verschwunden während bei der Enzym-katalysierten Reaktion zum selben Zeitpunkt noch ein kleines Plateau zu sehen ist. Bei der Negativkontrolle ist selbst nach 72h kaum ein Unterschied feststellbar.

7. Modifikation der MtL - Deglykosylierung

Die *Myceliophthora thermophila* Laccase ist ein Enzym mit stark ausgeprägter Glykosylierung, d.h. an die Aminosäurenkette, die das Enzym bildet, sind einige Kohlenhydratreste kovalent gebunden. Diese Reste stabilisieren das Enzym zwar in Wasser, nicht aber in hydrophoben Medien wie Alkydharzen. Es wird angenommen, dass eine Entfernung dieser Kohlenhydratreste eine Erhöhung der Aktivität in wasserfreier Umgebung bewirkt.

Die Deglykosylierung wird mit dem Enzym Endoglykosidase H durchgeführt, welches in der Lage ist Mannose-reiche Asparagin-gebundene Oligosaccharide zu schneiden. Die Enzymaktivität der deglykosylierten Laccase wird mit der Aktivität einer nicht behandelten Laccase verglichen.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Enzymaktivitäten vor und nach der Deglykosylierung

Probe	Gemessene Verdünnung	Enzymaktivität [U/mL]
MtL 8	1: 30000	960.7
MtL 8 deglykosiliert	1: 10000	1322.9
MtL gereinigt	1: 30000	983.6
MtL gereinigt deglykosiliert	1: 10000	685.4

Außerdem wurde die erfolgreiche Deglykosylierung über die Abnahme des Molekulargewichts mittels SDS-Page visualisiert.

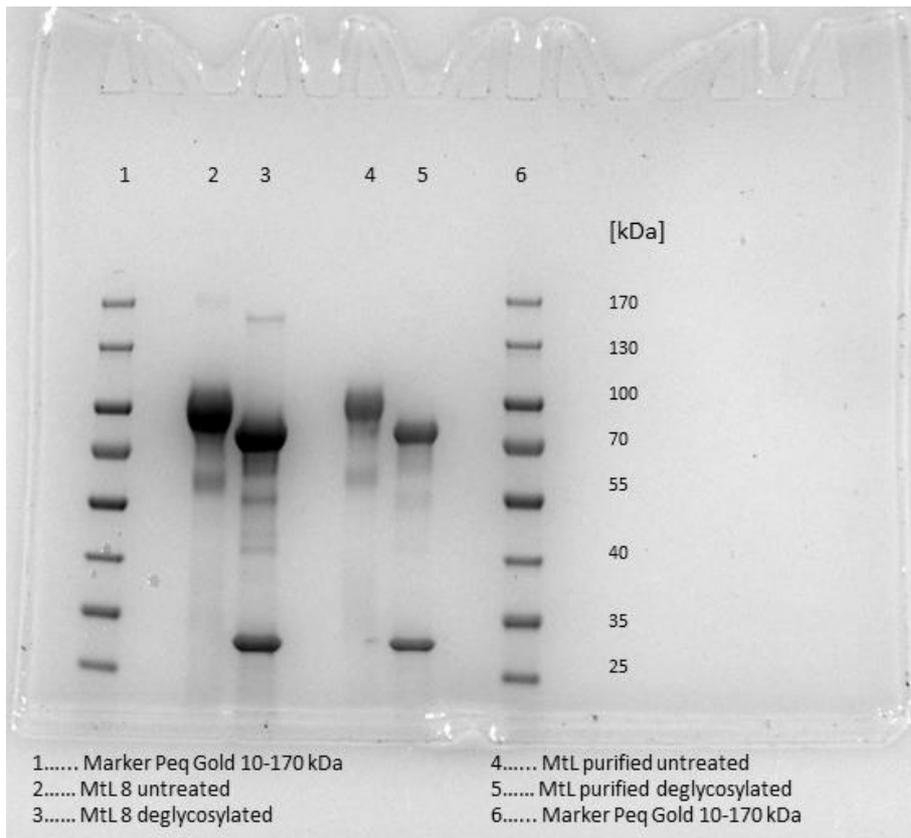


Abbildung 29: SDS-Page Deglykosylierung 1

Die in Tabelle 6 zusammengefassten Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessung zeigen, dass die Aktivität durch die Behandlung mit Endo H nicht wesentlich verringert wurde. Der Erfolg der Deglykosylierung ist in Abbildung 29 deutlich zu erkennen. Das Molekulargewicht der MTL aus dem Rohlysate und der gereinigten MTL sank um etwa 10 kDa auf ungefähr 75 kDa.

Die deglykosylierte Laccase wurde in einer Sauerstoffverbrauchsmessung im Alkydharzfilm eingesetzt (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

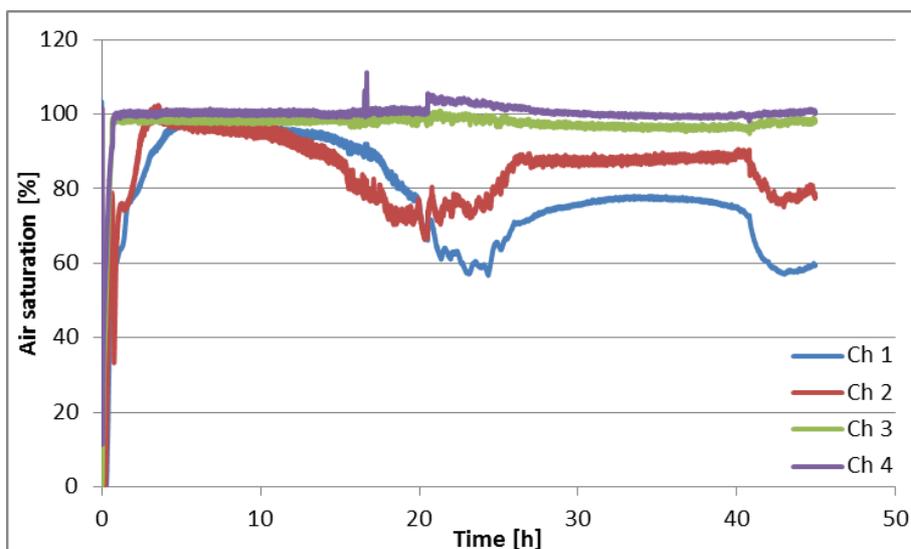


Abbildung 30: Filmmessung mit deglykosylierter MTL

Die Sauerstoffsättigung fiel zu Beginn deutlich ab, allerdings regenerierte sich der Wert innerhalb der, von Messungen mit nicht deglykosylierter MtL, gewohnten Zeitspanne auf 100%. Es hat also den Anschein, dass die Deglykosylierung keine deutliche Verbesserung in Bezug auf die Aktivität in wasserfreien Proben bringt.

8. Einsatz von Lignosulfonaten zur Steigerung der Polymerisationsaktivität

Lignosulfonate sind die Salze der Ligninsulfonsäure, welche als Nebenprodukte bei der Herstellung von Zellstoff anfallen und somit weltweit in großen Mengen günstig verfügbar sind. Außerdem sind sie ein Substrat der verwendeten Laccase und daher ein interessanter Zusatz zum eingesetzten Laccase-Mediator System. Um die Polymerisationsaktivität zu erhöhen, wurden Versuche mit Lignosulfonaten durchgeführt. Die phenolischen Bestandteile Cumaryl-, Coniferyl-, und Sinapylalkohol können sowohl selbst als Mediator dienen, als auch ergänzend zu Ethylvanillin eingesetzt werden.

8.1 Sauerstoffverbrauchsmessung mit Lignosulfonat als Mediator

Bei einem ersten Versuch wurde Lignosulfonat als Mediator eingesetzt und die beiden Alkydharze NW 474 (Ch 1 und Ch 2) und PWL 819 (Ch 3 und Ch 4) getestet.

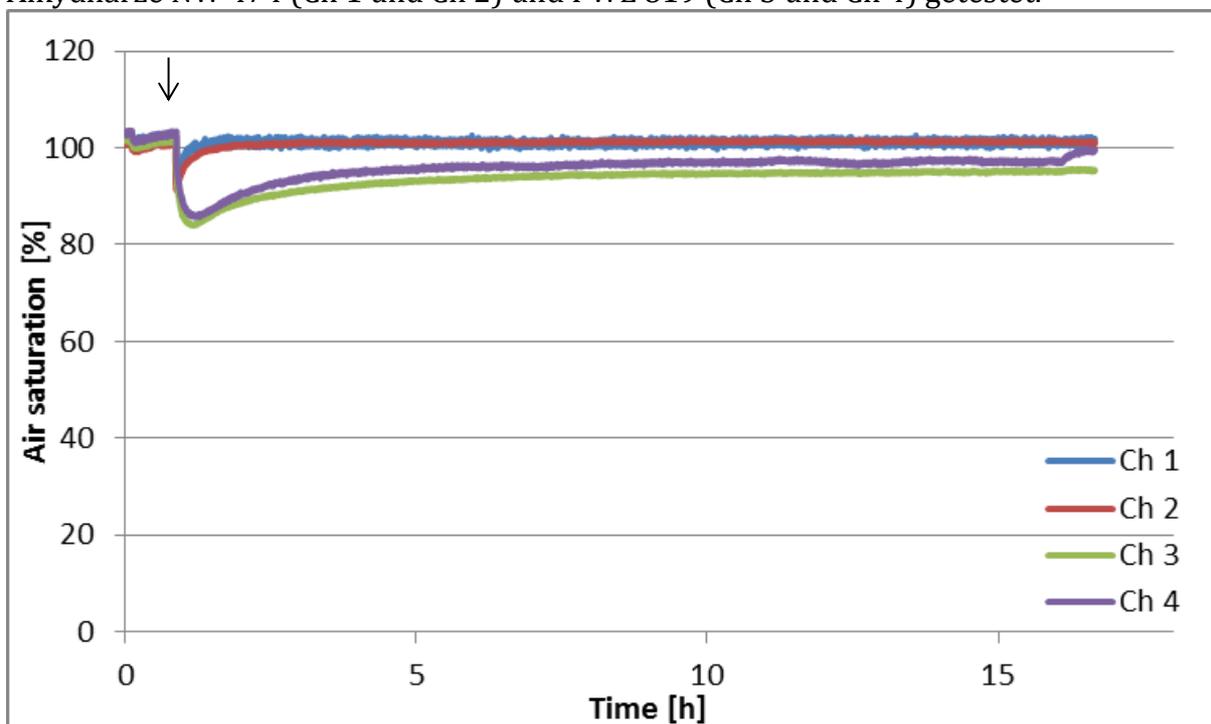


Abbildung 31: Sauerstoffverbrauchsmessung in Alkydharzemulsionen mit Lignosulfonat als Mediator

Schlussfolgernd kann man sagen, dass Lignosulfonat als Mediator nicht geeignet ist. Die Sauerstoffsättigung sinkt nach Zugabe des Harzes (mit Pfeil markiert) kaum ab und steigt danach schnell wieder auf einen hohen Wert an. Interessant ist, dass die Messung mit PWL 819 (Ch 3 und 4) nachdem die Laccase zugegeben wurde, nicht wieder vollständig auf 100% ansteigt. (Abbildung 31).

8.2 Sauerstoffverbrauchsmessung mit Lignosulfonat als Zusatz

Hierbei wurde der Alkydharzemulsion zusätzlich auch Ethylvanillin als Mediator zugesetzt. Die gemessenen Alkydharze waren PWL 819 (Ch 1 und Ch 2) und das Aquaalkyd aus PWL 819 (Ch 3 und Ch4).

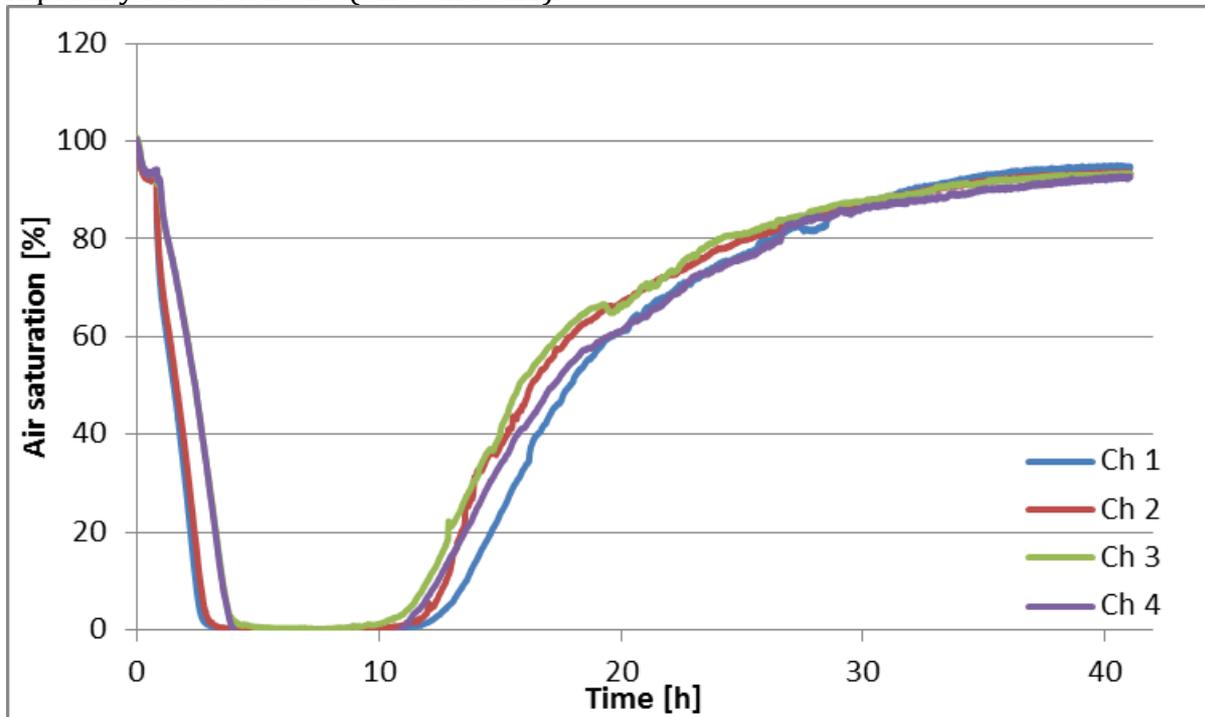


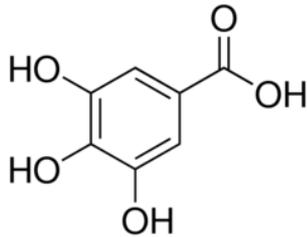
Abbildung 32: Sauerstoffverbrauchsmessung in Alkydharzemulsionen mit Lignosulfonat als Mediatorzusatz

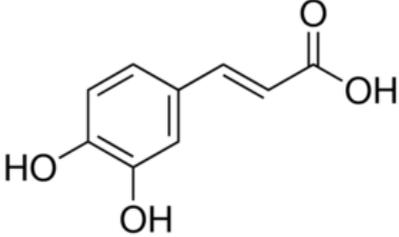
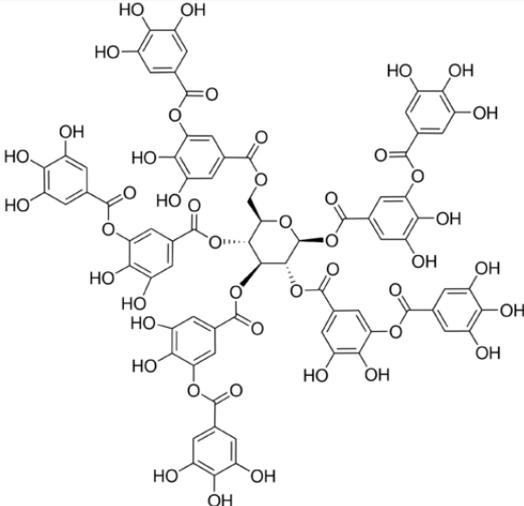
Durch den Zusatz von Lignosulfonaten zeigt sich keine maßgebliche Verbesserung der Sauerstoffsättigungskurve (Abbildung 32).

9. Einsatz von Crosslinkern zur Steigerung der Polymerisationsaktivität

Desweiteren wurden sogenannte Crosslinker (Tabelle 7) eingesetzt, um deren Einfluss auf das Trocknungsverhalten zu überprüfen. Zunächst wurden sie wie Mediatoren eingesetzt und, abhängig von den Resultaten, in weiterer Folge dann auch in Kombination mit Ethylvanillin.

Tabelle 7: Überblick Crosslinker - Strukturformel und Molekulargewicht

Name		Molekulargewicht [g/mol]
Caffeic acid		180,16

Gallic acid		170,12
Tannic acid		1701,19

9.1 Sauerstoffverbrauchsmessungen mit Crosslinkern als Mediator

In den folgenden Abbildungen sind die einzelnen Sauerstoffverbrauchsmessungen in Alkydharzemulsionen mit Caffeic-, Gallic- und Tannic acid veranschaulicht, wobei das Alkydharz PWL 819 verwendet wurde.

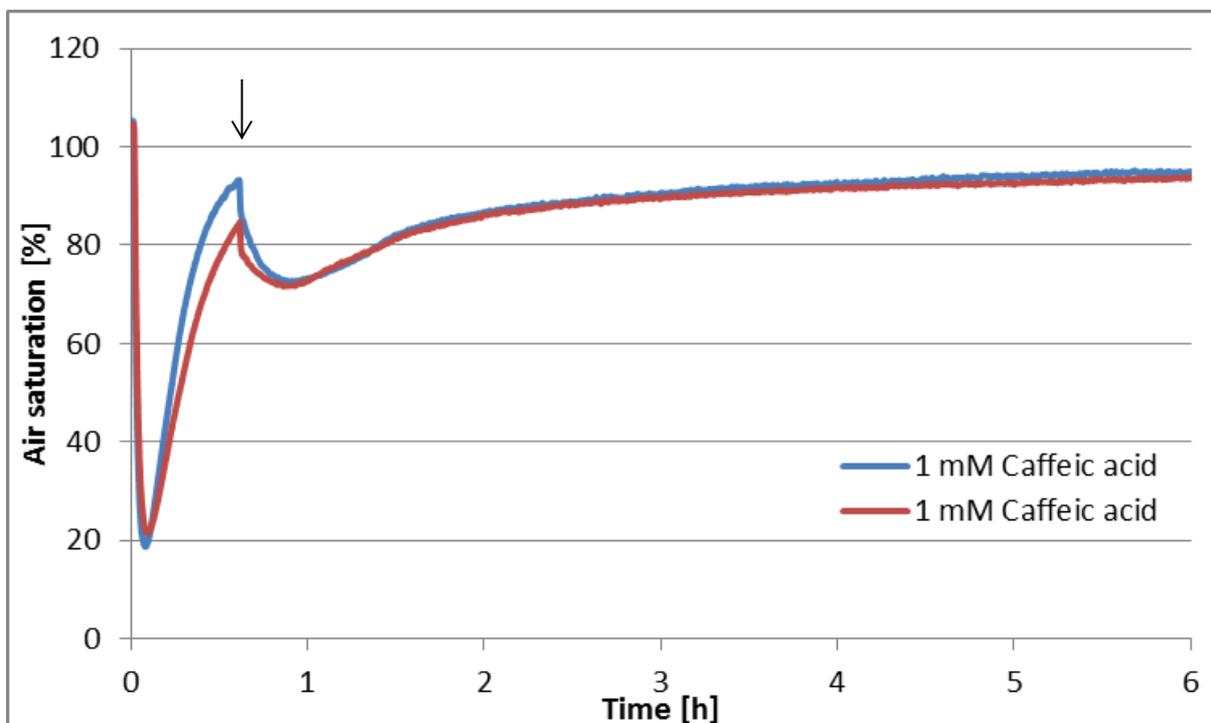


Abbildung 33: Firestingflüssigmessung mit Caffeic acid als Crosslinker

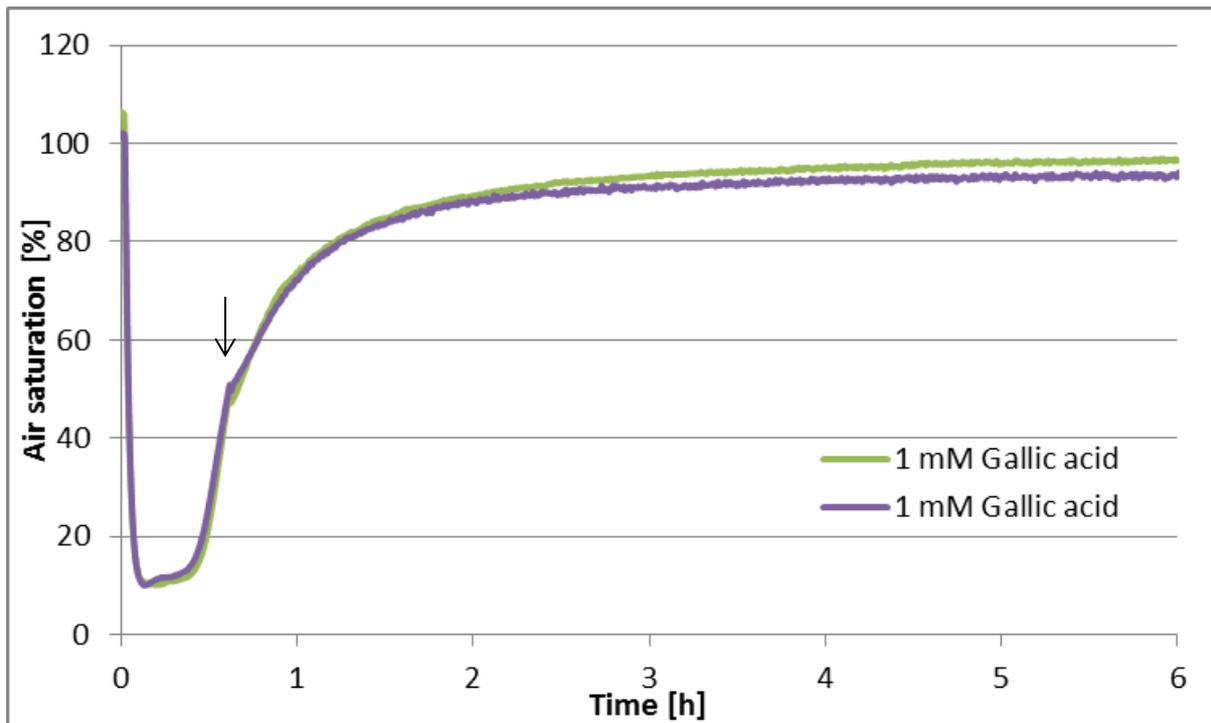


Abbildung 34: Firestingflüssigmessung mit Gallic acid als Crosslinker

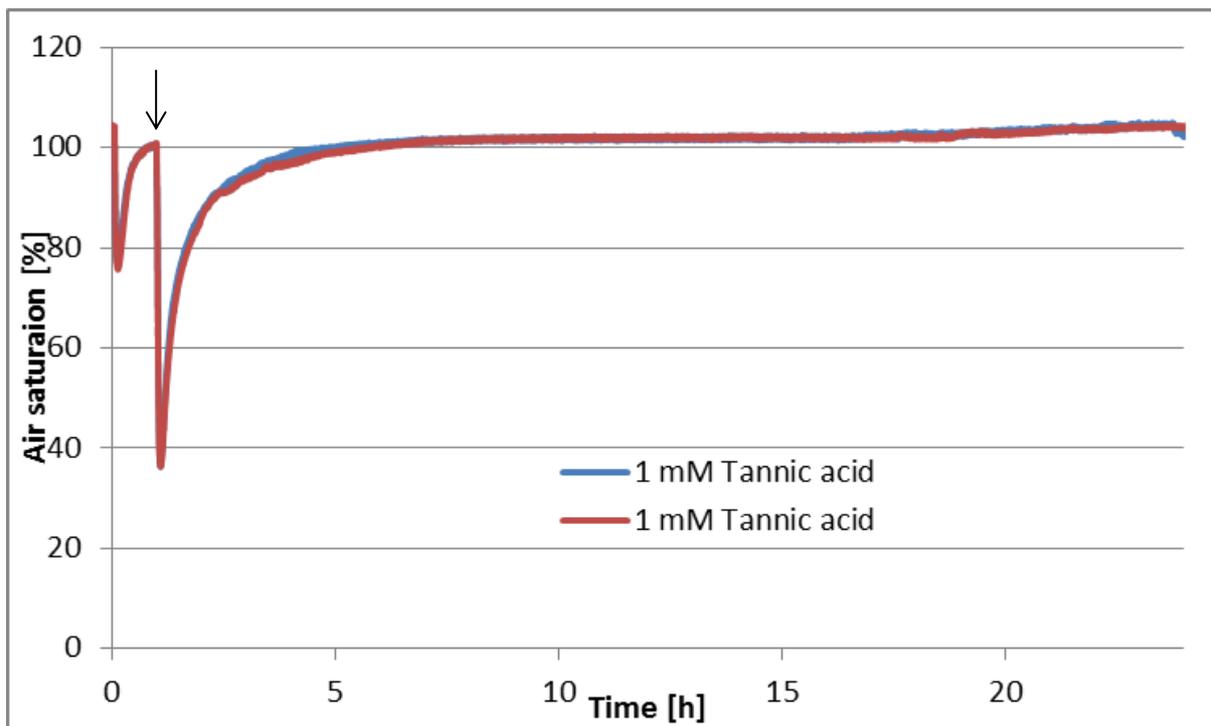


Abbildung 35: Firestingflüssigmessung mit Tannic acid als Crosslinker

Im Zuge dieser Experimente zeigt sich, dass die Voroxidation der Crosslinker deutlich mehr Sauerstoff verbraucht als die von Ethylvanillin. Die Zugabe von PWL 819 (mit Pfeil markiert) verursacht vor allem mit Tannic acid einen Abfall der Sauerstoff-Sättigung, allerdings nur über 1-2 Stunden.

9.2 Sauerstoffverbrauchsmessung mit Crosslinkern als Zusatz

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der Messung mit Tannic acid als Mediator, wurde dieser Crosslinker auch noch als Mediatorzusatz zu Ethylvanillin eingesetzt.

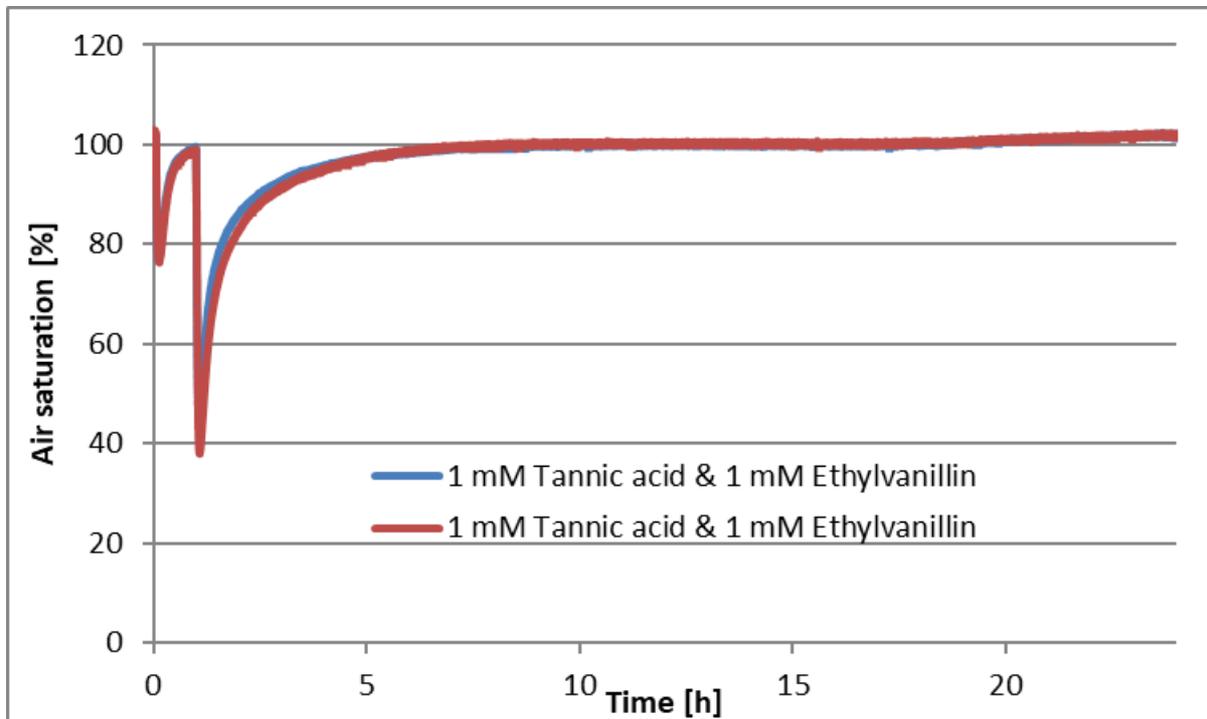


Abbildung 36: Firestingflüssigmessung mit Tannic acid als Crosslinker und Mediatorzusatz zu Ethylvanillin

Durch den Zusatz von Ethylvanillin verändert sich die Form der Sauerstoff-Sättigungskurve kaum (Abbildung 36). Somit kann man nicht davon ausgehen, dass der Zusatz eines Crosslinkers wie Tannic acid einen positiven Effekt auf die Polymerisation ausübt.

10. Untersuchung alternativer Laccasen

10.1 CotA Laccase

CotA ist eine von *Bacillus subtilis* stammende Laccase, welche aufgrund ihrer - im Vergleich zur MtL - schwach ausgeprägten Glykosylierung möglicherweise aktiver in den hydrophoben Alkydharzen ist. Die Aktivitäten der uns zur Verfügung stehenden CotA Laccase sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Eigenschaften der zur Verfügung stehenden CotA

Aktivität [U/mg] bei 27°C	Proteinkonzentration [mg/mL]	Aktivität [U/mL] bei 27°C
33,56	2,0	67,12

Um festzustellen, ob sich die katalytische Aktivität der CotA Laccase in Bezug auf die Alkydharze mit der MtL vergleichen lässt, wurde eine Sauerstoffverbrauchsmessung mit

diesem Enzym durchgeführt. Von der CotA kamen 17 μL der unverdünnten Lösung zum Einsatz um bestmöglich ein Verhältnis von 10 U/g Harz zu erreichen.

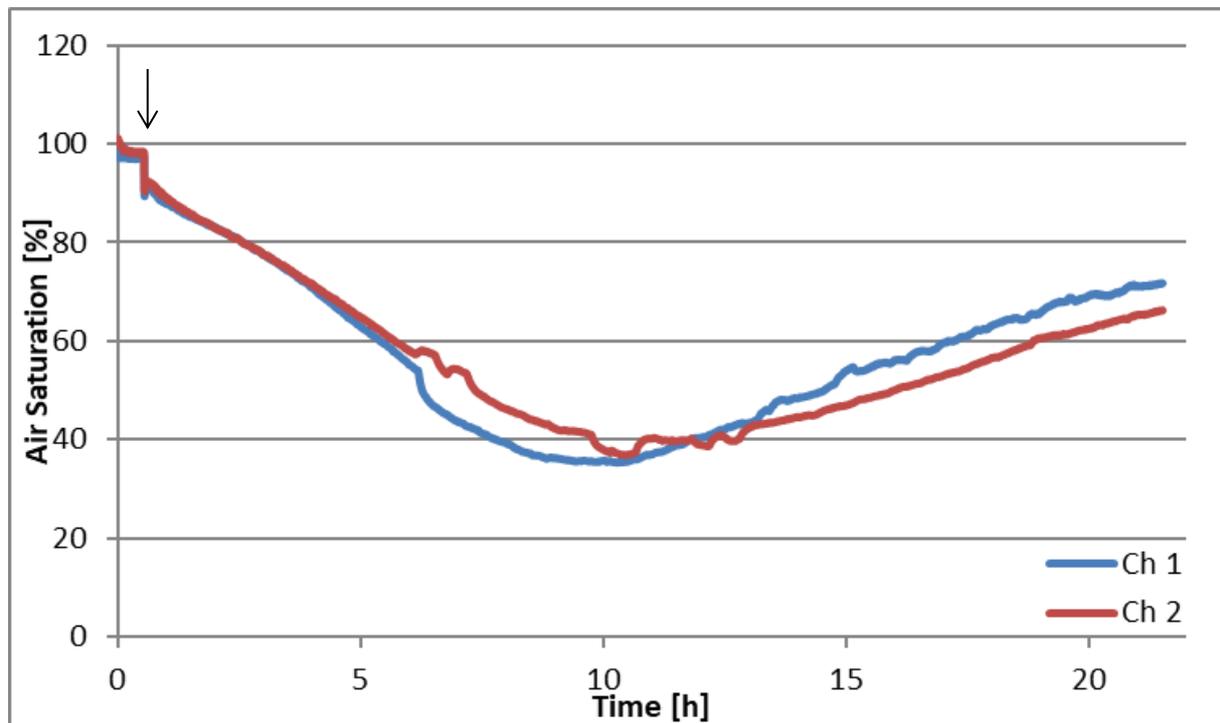


Abbildung 37: Sauerstoffverbrauchsmessung mit CotA und Ethylvanillin als Mediator

Der Sauerstoffverbrauch bei der Voroxidation des Mediators ist nicht sehr hoch, dies ist aber bei Ethylvanillin nicht unüblich. Nach Zugabe des Harzes (in den Abbildungen mit einem Pfeil markiert) sinkt die Sauerstoffsättigung in der Probe. Dies macht klar, dass das Harz PWL 819 mit dem Mediator Ethylvanillin ein Substrat für die CotA darstellt. Im Vergleich mit der MtL sinkt jedoch die Kurve nur bis zu einer Sauerstoffsättigung von ungefähr 40% ab (vgl. Abbildung 6).

Zusätzlich wurde eine Sauerstoffverbrauchsmessung im Alkydharzfilm mit der CotA angesetzt, um zu testen ob diese Laccase auch mit einer niedrigeren Wasseraktivität in der Probe aktiv bleibt.

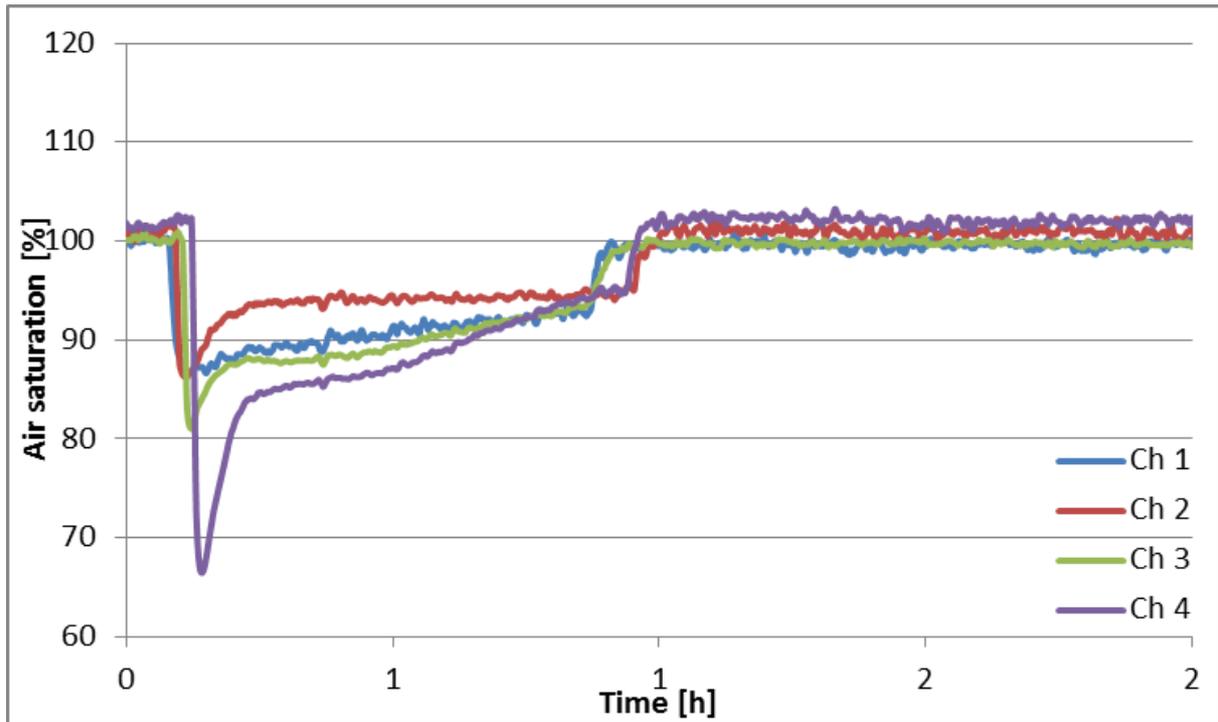


Abbildung 38: Sauerstoffverbrauchsmessung im Alkydharzfilm mit CotA

Durch den Einsatz der CotA zeigt sich keine nennenswerte Verbesserung der Trocknung gemessen im offenen Film (Abbildung 38).

10.2 *Trametes hirsuta* Laccase

Um festzustellen, ob die Laccase von *Trametes hirsuta* (ThL) besser für die Polymerisation von Alkydharzen geeignet ist, wurden auch mit diesem Enzym Experimente durchgeführt. Von dieser Laccase wurden zwei Chargen mit unterschiedlicher Aktivität getestet. Da beide Chargen eine niedrigere Aktivität als die normalerweise verwendete MtL aufwiesen, wurde jeweils entsprechend mehr Enzym eingesetzt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Dosierung der ThL Charge 1 und Charge 2

	Aktivität [U/mL]	Eingesetztes Volumen [μ L]
MtL	1000	13 (1/10)
ThL 1	1	1300
ThL 2	2,5	520

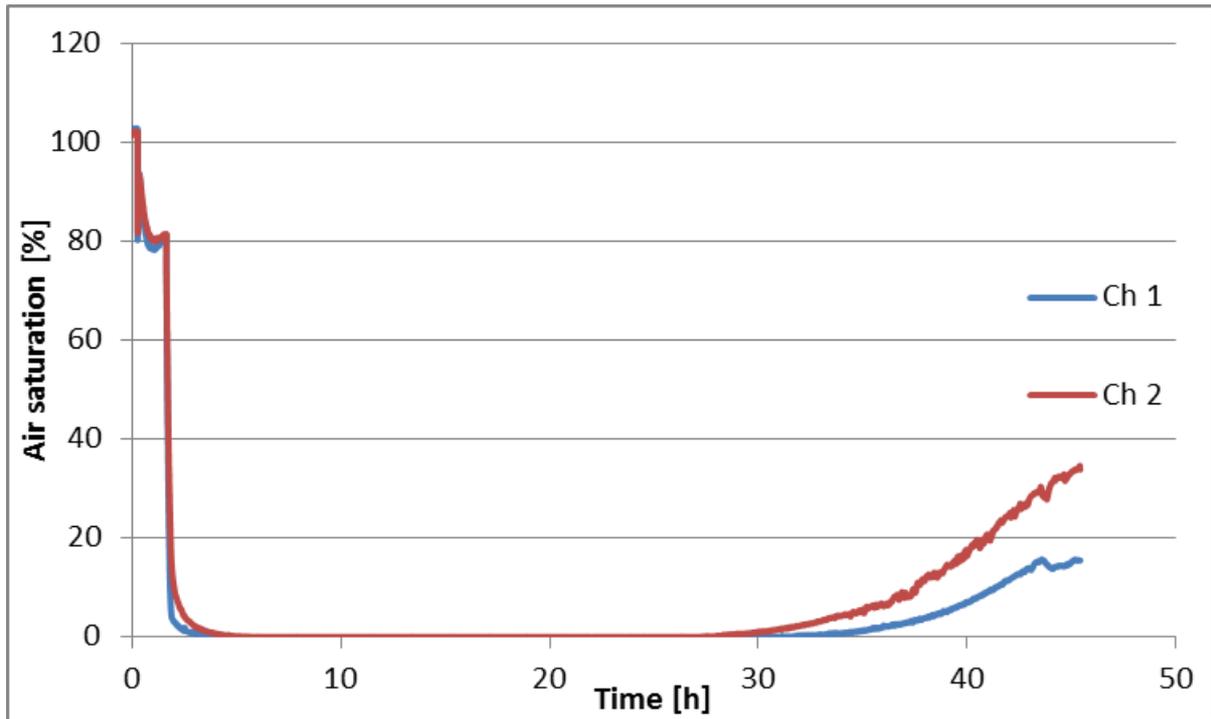


Abbildung 39: Firestingflüssigmessung mit ThL Charge 1

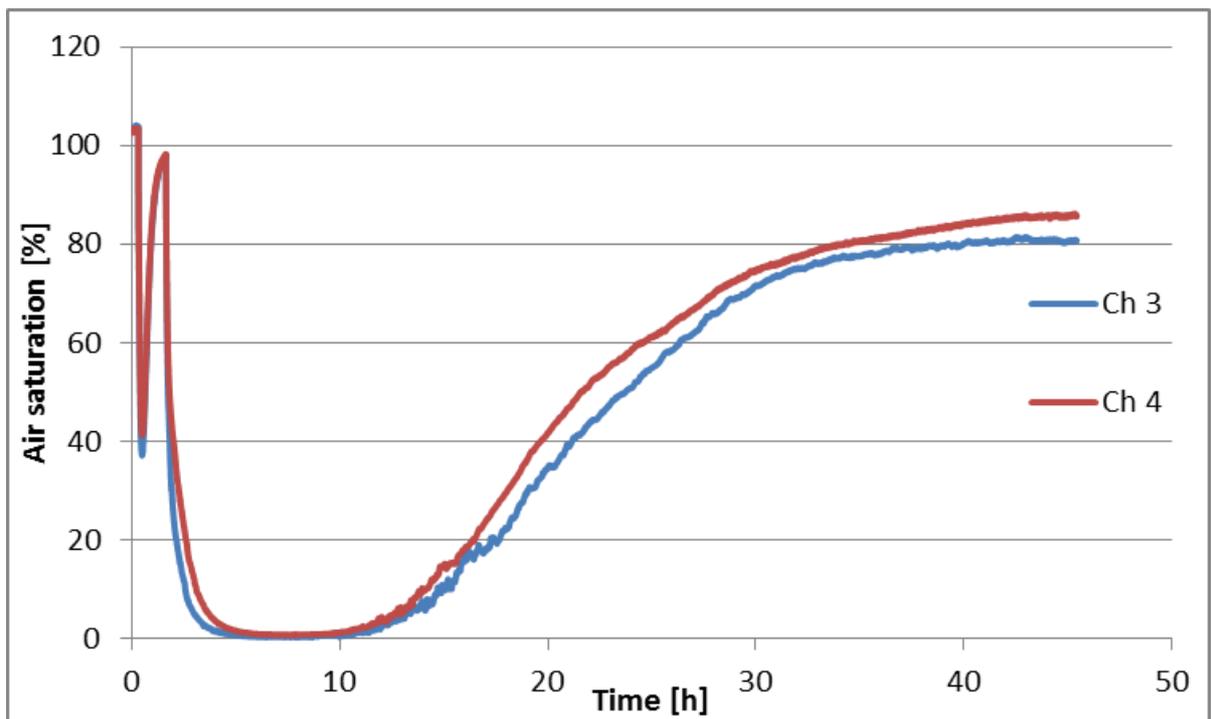


Abbildung 40: Firestingflüssigmessung mit ThL Charge 2

Trotz der verminderten Aktivität zeigen die beiden Enzym-Chargen zusammen mit dem Harz und Ethylvanillin einen deutlichen Sauerstoffverbrauch. Allerdings musste in beiden Fällen eine große Menge des Enzyms eingesetzt werden (Abbildung 39, Abbildung 40).

10.3 Mal1 Laccase

Eine weitere Laccase, die getestet wurde ist die *MaL1* des Organismus *Melanocarpus albomyces*. Die Eigenschaften der zur Verfügung stehenden *MaL1* sind in Tabelle 10 angeführt. Das Enzym ist noch relativ unerforscht, zeigt jedoch einige vielversprechende Charakteristiken.

Tabelle 10: Eigenschaften eingesetzte *Mal 1*

Bezeichnung	Proteinkonzentration	Enzymaktivität
Mal 1	0.54 mg/mL	0.58 U/mL

In einem weiteren Versuch wird die *MaL1* mit der *MtL* bei einer Firestingflüssigmessung verglichen. Da nicht bekannt ist, ob *Mal1* in der Lage ist die Alkydharze zu polymerisieren wird sie in 10 facher Menge der Nachweisbarkeitsgrenze des *MtL*-Harz Verhältnisses angewendet. Gleichzeitig wird in gleicher Menge eine Messung mit der *MtL* angesetzt um die beiden Enzyme vergleichen zu können. Für die Berechnung wird von einer Enzymaktivität der *MtL* von 1200 U/mL ausgegangen.

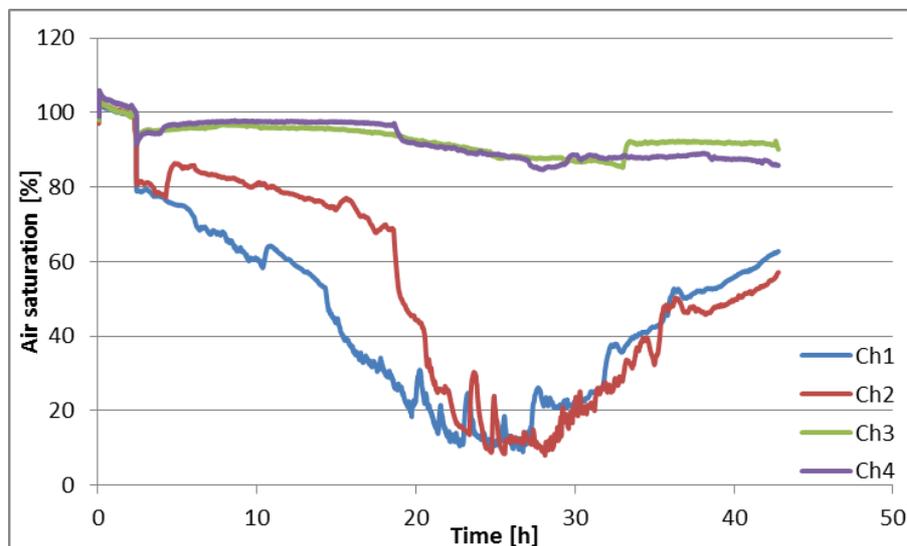


Abbildung 41: Sauerstoffverbrauchsmessung *Mal1* (Ch 3 und Ch 4) vs *MtL* Laccase (Ch 1 und Ch 2)

Bei der Messung, die in Abbildung 41 dargestellt ist, zeigte sich, dass bei den Proben mit der verdünnten *MtL* Lösung Sauerstoff verbraucht wurde, während die *Mal1* kaum einen nachweislichen Effekt verursachte. Das leichte Absinken der Sauerstoffsättigung könnte auch nur durch die Zugabe vom Harz entstanden sein.

11. Verfärbung des Holzes nach Behandlung mit Enzym/Mediator-hältigem Bindemittel

Laut IRSA hat sich in Anwendungstests herausgestellt, dass die Holzmuster nach der Behandlung mit dem Enzym/Mediator-hältigen Bindemittel starke Verfärbungen aufweisen.

Eine nicht-reversible Verfärbungsreaktion des Holzes stellt selbstverständlich ein Problem dar und muss untersucht werden.

In Bezug auf ABTS wird in der Dissertation von Potthast (Potthast, 1998) beschrieben, dass sich die blaugrüne Farbe des ABTS-Kationenradikals in Anwesenheit von gesteigertem Ligningehalt in Zellstoff intensiviert, da sich ABTS bzw. ABTS-Bruchstücke vermutlich an Lignin koppelt. Eine Verfärbungsreaktion eines Mediators in Kombination mit Laccasen wird auch für andere Mediatoren berichtet (Hager, 2003).

Weiters zeigen Aracri et al (Aracri et al, 2010) eine Veränderung der Farbe von zwei unterschiedlichen Fasern nach einer enzymatischen Kopplung der beiden phenolischen Substanzen Sinapinsäure und Sinapaldehyd an die Fasern.

Eine eingehende Untersuchung der Verfärbungsreaktion ist notwendig. Zum einen muss geklärt werden, inwiefern die Laccase in Abwesenheit eines Mediators eine Verfärbungsreaktion hervorruft, zum anderen ist es notwendig, unterschiedliche Mediatoren nicht nur in Bezug auf ihre Trocknungsfähigkeit, sondern auch in Bezug auf eine unerwünschte Holzverfärbung zu evaluieren.

12. Fazit

Es bleibt festzuhalten, dass das eingesetzte Laccase-Mediator-System prinzipiell in der Lage ist Alkydharze zu polymerisieren. Dies konnte wiederholt sowohl über den Sauerstoffverbrauch bei der Firestingflüssigmessung, als auch mittels FTIR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Diese Reaktion ist meist in unter 24 Stunden abgeschlossen und kommt mit ressourcenschonenden Mengen an Mediator und Enzym aus.

Die vollständige Trocknung der Harze in Form von Filmen konnte nicht erreicht werden. Dies liegt primär an der mangelnden Aktivität der *MtL* in hydrophobem Milieu. Auch die weiteren untersuchten Laccasen *CotA*, *ThL*, und *MaL1* zeigten hier das gleiche Verhalten und kommen somit in dieser Form nicht als Ersatz für die deutlich aktivere *MtL* in Frage.

Gerade bei der Erhaltung der Enzymaktivität in hydrophoben organischen Phasen handelt es sich um ein Thema mit hoher Relevanz für viele Bereiche in der Biotechnologie an dem weltweit geforscht wird. Viele Anwendungen, wie auch die enzymatische Trocknung von Alkydharzen, würden hier von einem weiteren Durchbruch profitieren. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es hier zukunftssträchtige Entwicklungen geben wird

Eine reduzierte Diffusionsmöglichkeit von Enzym, Sauerstoff und Mediator, sowie eine geringe Wasseraktivität im Alkydharzfilm spielen eine nicht zu unterschätzende Rolle. Immerhin konnte gezeigt werden, dass eine feuchte Umgebungsluft einen höheren Sauerstoffverbrauch bewirkt und die Trocknungszeit beschleunigt. Dies ist für die Anwendung jedoch nur schwierig handzuhaben.

Eine Deglykosylierung des verwendeten Enzyms *MtL* verbesserte die Leistung in wasserfreien Proben nicht eindeutig und ist hinsichtlich der Ressourcen wenig effizient. Außerdem zeigte der Einsatz von Crosslinkern und Lignosulfonaten nicht den erhofften positiven Effekt, das könnte daran liegen, dass diese Substanzen womöglich als Radikalfänger agieren und die Reaktion dadurch verzögern.

In Anwendungstests durch die Firma IRSA konnte das Laccase-Mediator-System nicht die gewünschte Trocknung katalysieren, zusätzlich dazu wurde eine starke Verfärbung der verwendeten Holzplatten sichtbar, die bis zum Projektende nicht gelöst werden konnten.

13. Literatur

J.R. Bucher, J.R. Hailey, J.R. Roycroft, J.K. Haseman, R.C. Sills, S.L. Grumbein, P.W. Mellick, B.J. Chou. Inhalation toxicity and carcinogenicity studies of cobalt sulfate. *Toxicol. Sci.* 1999, 49, 56-67

D. Lison, M. De Boeck, V. Verougstraete, M. Kirsch-Volders. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup. Environ. Med.* **2001**, 58, 619-625

Greimel K., Perz V., Koren K., Feola R., Temel A., Sohar C., Herrero Acero E., Klimant I., Guebitz G.M. (2013) Banning toxic heavy-metal catalysts from paints: enzymatic cross-linking of alkyd resins. *Green Chem* 15:1463–9262.

Thurston C. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.

Potthast A. (1998): Untersuchungen zum Laccase-Mediator-System. Dissertation an der Universität Dresden, Fakultät Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften.

Hager A. (2003): Zum Effekt von Laccasen beim Altpapier-Deinking. Dissertation an der Universität Hamburg, Fachbereich Biologie.

Aracri E., Fillat A., Colom J., Gutierrez A., del Rio J., Martinez A., Vidal T. (2010) Enzymatic grafting of simple phenols on flax and sisal pulp fibres using laccases. *Bioresource Technology* 101: 8211-8216.

14. Anhang

Tabelle 11: Synthetische Mediatoren

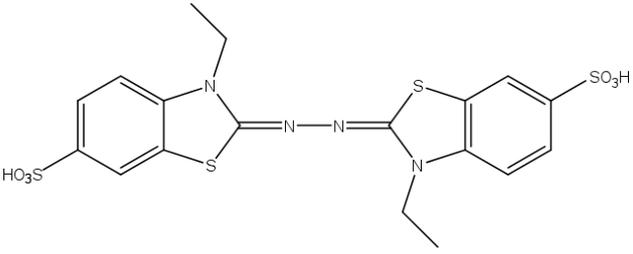
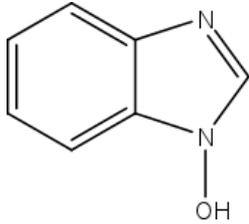
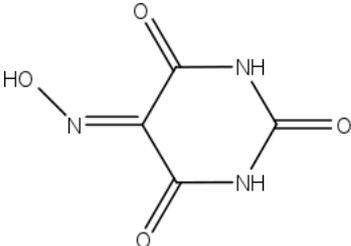
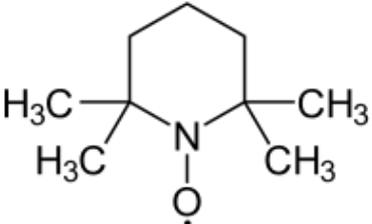
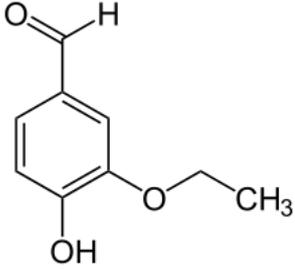
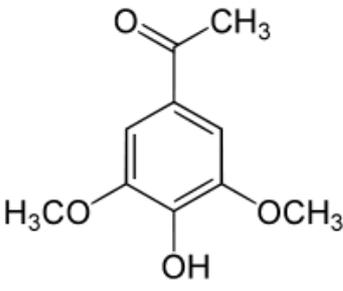
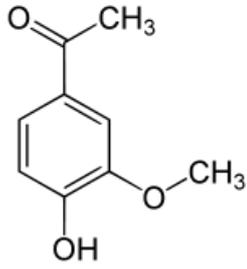
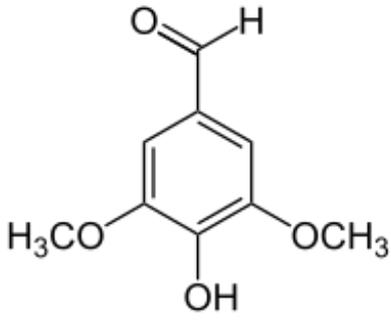
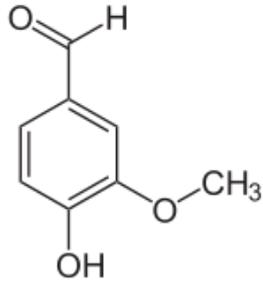
<p>ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure))</p>	 <p>The structure shows two 3-ethylbenzthiazolin-6-yl groups connected by an azo (-N=N-) bridge. Each benzthiazolin ring has an ethyl group on the nitrogen and a sulfonic acid group (-SO₃H) at the 6-position.</p>
<p>HBT (1-Hydroxybenzotriazol)</p>	 <p>The structure shows a benzene ring fused to a five-membered triazole ring. The nitrogen at the 1-position of the triazole ring is bonded to a hydroxyl group (-OH).</p>
<p>Violuric acid</p>	 <p>The structure shows a six-membered pyrimidine ring with two carbonyl groups (=O) at the 2 and 6 positions, and a hydroxylamino group (=N-OH) at the 4 position.</p>
<p>TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy)</p>	 <p>The structure shows a six-membered piperidine ring with a nitrogen atom bonded to an oxygen radical (O•). The 2 and 6 positions of the piperidine ring are each substituted with two methyl groups (-CH₃).</p>
<p>Ethylvanillin</p>	 <p>The structure shows a benzene ring with a formyl group (-CHO) at the 3-position, a hydroxyl group (-OH) at the 4-position, and an ethoxy group (-OCH₂CH₃) at the 1-position.</p>

Tabelle 12: Natürliche Mediatoren

Acetosyringone	 <chem>CC(=O)c1cc(OC)c(O)c(OC)c1</chem>
Acetovanillone	 <chem>CC(=O)c1cc(O)c(OC)cc1</chem>
Syringaldehyd	 <chem>CC1=CC(=C(C=C1)OC)C(O)C=O</chem>
Vanillin	 <chem>CC1=CC(=C(C=C1)OC)C(O)C=O</chem>