

Entwicklung eines enzymbasierten Verfahrens zur Dekontaminierung von schimmelpilzbefallenen Papierobjekten

Development of an enzyme-based method for the decontamination of mould-infested paper objects

Projektleiterin

IHD-Teilprojekt

Project leader:

Katharina Plaschkies

Projektbearbeiter

Person in charge:

Kordula Jacobs,
Janine Schneider,
Anke Borrmann

Fördermittelgeber

Co-funded by:

Deutsche Bundesstiftung
Umwelt (DBU)

Projektpartner

Project partners:

Sächsische Landesbibliothek – Staats- und Universitätsbibliothek Dresden (SLUB),
Fraunhofer-Institut für Silicatforschung (ISC),
Zentrum für Bucherhaltung GmbH (ZFB)

AUSGANGSSITUATION UND ZIELSTELLUNG

Der sich vollziehende Klimawandel stellt den Kulturgutschutz vor neue Herausforderungen, die sich auch in der konservatorischen und restauratorischen Bearbeitung von Objekten bemerkbar machen. Für Schriftgut sind Schimmelpilzschäden infolge von Wasser- bzw. Feuchtigkeitseinträgen ein ernstes Problem, das zu komplexen Schadensbildern an Papierobjekten führt. Derzeit existiert keine Behandlungsmethode, die eine schadstofffreie, objektschonende Abtötung und vor allem tiefenwirksame Entfernung von Schimmelpilzbestandteilen auf Papierobjekten bewirkt. Ziel des Projektes unter Leitung der SLUB war daher die Entwicklung einer neuen, praxistauglichen und umweltfreundlichen Methode zur Auflösung und Entfernung von Schimmelpilzen mit Hilfe von Enzymgemischen.

VORGEHENSWEISE

Zunächst wurden Schadensbilder an historischen und modernen Papierobjekten untersucht und kategorisiert. Dabei wurde das Probenahmeverfahren durch die Verwendung von Schwammtupfern optimiert, um die wertvollen und meist fragilen Objekte nicht weiter zu schädigen. Die auftretenden Pilzarten wurden mittels Mikroskopie, Kultivierung und molekularbiologischer

INITIAL SITUATION AND OBJECTIVE

The ongoing climate change poses new challenges for the protection of cultural assets, which are also noticeable in the conservation and restoration treatment of artefacts. Mould damage due to water and moisture ingress is a serious problem for written documents, leading to complex damage patterns on paper objects. There has been no treatment method up to now being able to kill off and, above all, remove mould components from paper objects in a way that is free of harmful substances and gentle on the object. Hence, the aim of the project led by the SLUB was to develop a new, practical and environmentally friendly method for dissolving and removing mould using enzyme mixtures.

APPROACH

At first, damage patterns on historical and modern paper objects were examined and categorised. The sampling procedure was optimised by using sponge swabs to avoid further damage to the valuable and usually fragile objects. The fungal species found were analysed using microscopy, cultivation and molecular biological methods (PCR, sequencing). These analyses and research into the structure of fungal cell walls formed the basis for the selection of the model organisms *Aspergillus nidulans*,



Abb. 1: *Aspergillus nidulans* nach Behandlung mit Chitinase und β -1.3-Glucanase: Hyphen teilweise aufgelöst (Durchlichtmikroskopie, Baumwollblaufärbung)

Fig. 1: *Aspergillus nidulans* after treatment with chitinase and β -1.3-glucanase: hyphae partially dissolved (Transmitted light microscopy, cotton blue staining)

Verfahren (PCR, Sequenzierung) analysiert. Diese Analysen sowie Recherchen zum Aufbau von pilzlichen Zellwänden bildeten die Grundlage für die Auswahl der Modellorganismen *Aspergillus nidulans*, *Scopulariopsis brevicaulis* und *Chaetomium madrasense* sowie der Enzympräparate mit Chitinase-, β -1.3-Glucanase- und Proteinase-Aktivität. Die Wirkung der Enzyme wurde zunächst an Schimmelpilzen auf Glasobjektträgern unter Variation von Konzentration, Temperatur, pH-Wert und Einwirkzeit erprobt und durch licht- und fluoreszenzmikroskopische Verfahren bewertet. Die aussichtsreichsten Kombinationen wurden dann bei den Kooperationspartnern SLUB und ZFB auf bewachsenem Hadernpapier aus 100 % Leinenfaser in einem wässrigen Tauchverfahren und einem wasserarmen Kompressenverfahren getestet und optimiert. Bei der Bewertung wurden neben der Effektivität auch Handhabung, mögliche Papierschädigung, Wirt-

Scopulariopsis brevicaulis and *Chaetomium madrasense* as well as the enzyme preparations with chitinase, β -1.3-glucanase and proteinase activity. The effect of the enzymes was initially tested on mould fungi on glass slides by varying the concentration, temperature, pH value and exposure time and evaluated using light and fluorescence microscopy methods. The most promising combinations were then tested and optimised by the cooperation partners SLUB and ZFB on overgrown rag paper made of 100% linen fibre applying an aqueous dipping process and a low-water compress process. In addition to effectiveness, the handling, possible paper damage, economic efficiency and transferability into practice were also considered in the evaluation. Scanning electron microscopic and spectroscopic images taken by the ISC supplemented the analyses to prove the fungal degradation. Moreover, an accompanying long-term study

schaftlichkeit und Übertragbarkeit in die Praxis berücksichtigt. Rasterelektronenmikroskopische und spektroskopische Aufnahmen durch das ISC ergänzten die Analysen zum Nachweis des Pilzabbaus. Außerdem konnten in einer begleitenden Langzeitstudie an Papieren praxisähnliche Schadensbilder erzeugt werden.

ERGEBNISSE

Es hat sich gezeigt, dass für eine Auflösung bzw. Schädigung von Pilzzellwänden eine kombinierte Behandlung durch Chitinase und β -1.3-Glucanase erforderlich ist (Abb. 1), deren Wirkung durch eine vorgeschaltete Anwendung einer Proteinase noch gesteigert werden kann. Mikroskopisch wurden nach Anfärbung mit Baumwollblau sowie den Fluoreszenzfarbstoffen Blankophor und Propidiumiodid in den Testansätzen ohne Papier deutliche Auflösungserscheinungen an den Strukturen ohne Melanineinlagerungen erkannt. Am effektivsten erwies sich die Behandlung mit Proteinase K über eine Stunde, anschließende Einwirkung von Chitinase über 18 Stunden und abschließende sechsstündige Behandlung mit β -1.3-Glucanase bei einer Temperatur von jeweils 50 °C. Zwischen den Behandlungsschritten war jeweils ein Spülen mit deionisiertem Wasser notwendig. Da diese lange Behandlungszeit der Chitinase jedoch nicht praxistauglich war, wurde sie auf zwei Stunden verkürzt. Dabei wurde zwar kein vollständiger Abbau mehr, jedoch noch deutliche Angriffsspuren an den Zellwänden beobachtet. Dies wurde durch Anfärbung mit Propidiumiodid bestätigt, wo sich in Hyphen und Sporen eine deutliche Fluoreszenz zeigte, die an der Kon-

on papers produced damage patterns similar to those seen in practice.

RESULTS

It appeared that a combined treatment with chitinase and β -1.3-glucanase is necessary for the dissolution or damage of fungal cell walls (Fig. 1), the effect of which can be further enhanced by the upstream application of a proteinase. Microscopically, after staining with cotton blue and the fluorescent dyes blankophore and propidium iodide, clear signs of dissolution were recognised in the test preparations without paper on the structures without melanin inclusions. Treatment with proteinase K for one hour, followed by exposure to chitinase for 18 hours and a final six-hour treatment with β -1.3-glucanase at a temperature of 50 °C proved to be the most effective.

Rinsing with deionised water was necessary between each treatment step. As this long treatment time of the chitinase was not practical, it was reduced to two hours. Although complete degradation was no longer observed, there were still clear traces of attack on the cell walls. This was confirmed by staining with propidium iodide, which showed a clear fluorescence in hyphae and spores that was not present in the check sample. This was an indication that the fluorescent dye was able to penetrate through the damaged cell wall and stain the cell nuclei. When the process was transferred and optimised on rag paper, the clearest effects were achieved with the aqueous immersion process using the following treatment: Pre-soaking with deionised water – two-hour exposure to

trollprobe nicht vorhanden war. Das war ein Indiz dafür, dass der Fluoreszenzfarbstoff durch die beschädigte Zellwand eindringen und die Zellkerne anfärben konnte. Bei der Verfahrensübertragung und -optimierung auf Hadernpapier wurden bei dem wässrigen Tauchverfahren die deutlichsten Effekte durch folgende Behandlung erzielt: Vorwässerung mit deionisiertem Wasser – zweistündige Einwirkung von Proteinase K bei 50 °C/pH 7,6 – Zwischenwässerung – vierstündige Einwirkung von Chitinase und Glucanase bei 50 °C/pH 5,6. Dabei wirkte sich der Zusatz von Tween 80 zu allen Lösungen positiv aus. Im Vergleich zur Referenzprobe ohne Enzym war der Reinigungseffekt meist deutlich verbessert. Auch durch die Kompressenanwendung, die für die Enzymbehandlung von wertvollen Objekten zu bevorzugen ist, konnte die Wirkung des Vorzugsverfahrens bei Raumtemperatur sowohl an präpariertem Hadernpapier als auch an einer befallebenen Originalschrift bestätigt werden. Insgesamt wurde der Funktionsnachweis einer kombinierten Enzymbehandlung zur Entfernung bzw. Reduzierung von Schimmelpilzschäden an Papieren erbracht. Vor der Übertragung in die Praxis sind allerdings noch weitere Anstrengungen zur Verfahrensoptimierung und -validierung sowie zur Risikoanalyse notwendig. Pilzsporen, Dauerformen und melaninhaltige Strukturen wurden erwartungsgemäß nicht abgebaut, jedoch leichter abgewaschen, was auf biochemische Veränderungen an der Sporenoberfläche schließen lässt.

proteinase K at 50 °C/pH 7.6 – intermediate soaking – four-hour exposure to chitinase and glucanase at 50 °C/pH 5.6. Thereby, the addition of Tween 80 to all solutions had a positive effect. Compared to the reference sample without enzyme, the cleaning effect was in most cases significantly improved. The use of compresses, which is preferable for the enzyme treatment of valuable objects, also confirmed the effect of the preferential process at room temperature both on prepared rag paper and on an affected original writing.

Altogether the functionality of a combined enzyme treatment for the removal or reduction of mould damage on paper was demonstrated. However, further efforts must be made to optimise and validate the process and to analyse the risks before it can be put into practice. As expected, fungal spores, permanent moulds and melanin-containing structures were not degraded, but were washed off more easily, which hints at biochemical changes on the spore surface.