

Isolierung und Charakterisierung ligninolytischer Enzyme zur Nutzung als Biokatalysatoren

vom Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)

der Bergischen Universität Wuppertal

genehmigte Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

-Doktor der Naturwissenschaften-

(Dr. rer. nat.)



vorgelegt von

Ann-Kathrin Galle

(staatl. gepr. Lebensmittelchemikerin)

aus Wuppertal

Wuppertal, Dezember 2014

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20150429-123531-2

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20150429-123531-2>]

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2011 bis August 2014 auf

Anregung von

HERRN PROF. DR. HANS-WILLI KLING

im Arbeitskreis

Kommunikation und Management chemischer Prozesse in der Industrie
der Bergischen Universität Wuppertal.

Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt von der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR).



Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig im Arbeitskreis Kommunikation und Management chemischer Prozesse in der Industrie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Willi Kling durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wuppertal, 17.12.2014

Ann-Kathrin Galle

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Hans-Willi Kling** für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die interessante Themenstellung und seine Unterstützung in Form von Diskussionen und Ratschlägen.

Herrn Prof. Dr. Heiko Hayen danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei **Herrn Dr. Tim Malolepszy** bedanke ich mich sehr für die Einarbeitung in den Umgang mit den Pilzmycelien und seine Unterstützung bei der Einarbeitung in das Themengebiet.

Frau Akad. Dir. Dr. Helga Mölleken danke ich für ihre stete Diskussionsbereitschaft und viele fachliche Ratschläge.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Frau Ilka Lehmann** und **Frau Sabrina Laun** für das außerordentlich gute Arbeitsklima und viele anregende Diskussionen.

Ebenso danke ich **Herrn Andreas Conradt** und **Frau Simone Kloss** für ihre engagierte Unterstützung durch ihre wissenschaftlichen Abschlussarbeiten.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppen „Kommunikation und Management chemischer Prozesse in der Industrie“ und „Analytische Chemie“ für die sehr gute Arbeitsatmosphäre, Diskussionen und Gespräche im Laufe der Jahre.

Der Arbeitsgruppe „Chemische Mikrobiologie“ der Bergischen Universität danke ich für das Autoklavieren der Nährmedien und Glasgeräte.

Außerdem danke ich meiner Familie, deren Unterstützung in vielen Bereichen für mich von unschätzbarem Wert ist.

Abstract

In this work ligninolytic enzymes from several fungi were expressed, characterized and their applicability for biocatalysis was investigated.

For this purpose at first a growth medium for white rot fungi based on a sulfite spent liquor was developed. The highest growth rate was achieved on an agar-medium containing 2.5% sulfite spent liquor (relating to dry matter). Due to the sugar content of the spent liquor only the addition of a nitrogen source was necessary for the growth of the fungi. Here the use of a complex nitrogen source (peptone) resulted in the highest growth rate.

In the course of a laboratory screening several fungal cultures were incubated on this medium containing 2.5 % sulfite spent liquor, 10 g/L peptone at pH 5.6. Due to the lignin fragments in the spent liquor ten fungi were stimulated for the release of ligninolytic enzymes.

During the incubation of *Calocera viscosa* the included monosaccharides (glucose, galactose, mannose, arabinose, xylose and rhamnose) of the medium were metabolised progressively.

The mycelia of *Agaricus brasiliensis*, *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* expressed two laccases, while *Clitocybe maxima*, *Hericium coralloides*, *Hericium erinaceus*, *Hypsizygus tessulatus*, *Pleurotus eryngii* and *Trametes versicolor* produced a single laccase. The mycelium of *C. viscosa* expressed a manganese peroxidase, which had not been described to the best of the authors' knowledge in the scientific literature before.

After successful cultivation of white rot fungi on the medium described above a purification protocol for the isolation of enzymes was developed. This protocol includes an ammonium sulfate precipitation, the use of an aqueous two-phase system with polyethylene glycol 6000, as well as anion exchange chromatography.

Following the successful isolation the enzymes were characterized. The characterization of the enzymes included the determination of the molecular weight by SDS-PAGE, an isoelectric focussing, and photometric assays to examine the pH optimum, the temperature optimum, the kinetic parameters and the influence of various metal salt solutions and inhibitor on enzyme activity.

The isolated laccase showed typical molecular masses and isoelectric points. In contrast, the manganese peroxidase of *C. viscosa* showed a relatively high molecular weight of 65 kDa compared to other manganese peroxidases, but a typical isoelectric point of 3.2. The spectral analysis of the manganese peroxidase showed a "red-shift" of the Soret band by the addition of hydrogen peroxide.

With regard to the influence of temperature, large differences among the enzymes were observed. Although some enzymes showed a high activity at elevated temperatures, this activity decreased quickly. In contrast, temperature below 40 °C led to no or little loss of enzymatic activity. The pH optima of the laccases and the manganese peroxidase of *C. viscosa* were in the acidic range.

The influence of various metal salts and inhibitors on the isolated enzymes depended on the concentration of the metal cation or the inhibitor and the considered enzyme. This was observed for both, laccases and the manganese peroxidase.

After successful isolation and characterization of the enzymes, a laccase from *A. brasiliensis* and the manganese peroxidase from *C. viscosa* were selected for a first application on lignin model compounds and spent liquors from the pulp and paper industry. This was confirmed for model compounds as well as for spent liquors.

The biocatalytic decomposition of the model compounds led to monomeric aromatic compounds with partially oxidized side chain.

By the incubation of spent liquors from the sulfite and the sulfate pulping process with these enzymes monomeric aromatic compounds were formed, which could be successfully identified by GCxGC-(ToF)MS.

Abkürzungsverzeichnis

4CL	4-Cumarinsäure: Coenzym A-Lyase
AAD	Aryl-Alkohol-Dehydrogenase
AAO	Aryl-Alkohol Oxidase
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure
APS	Ammoniumpersulfat
Ara	Arabinose
BSA	Rinderserumalbumin
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
bzw.	beziehungsweise
C4H	Cinnamat-4-Hydrolase
ca.	circa
CAD	Cinnamylalkohol-Dehydrogenase
CCoAOMT	Kaffeoyl-Coenzym A-Reduktase
CCR	Cinnamoyl-Coenzym A-Reduktase
CDH	Cellobiose Dehydrogenase
COMT	Kaffeesäure- <i>O</i> -Methyl-Transferase
DAD	Diodenarray-Detektion
DHDV	Dehydrodivanillin
DMP	2,6-Dimethoxyphenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
eV	Elektronenvolt
FID	Flammenionisationsdetektor
Gal	Galactose
GC	Gaschromatographie
GCxGC	comprehensive zweidimensionale Gaschromatographie
Glc	Glucose
GLOX	Glyoxal Oxidase
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Hz	Hertz
IC	Ionenaustauschchromatographie
ID	Innendurchmesser
IEF	isoelektrische Fokussierung
K	Kelvin
k.A.	keine Angabe
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
K _m	Michaelis-Konstante
Lac	Laccase
LCC	Lignin-Kohlenhydrat-Komplex
LiP	Ligninperoxidase
LMS	Laccase-Mediator-System
<i>m</i>	<i>meta</i>
M	Mol pro Liter
<i>m/z</i>	Masse/Ladungsverhältnis
Man	Mannose
min	Minuten
MJ	Megajoule
mM	Millimol pro Liter
MnP	Manganperoxidase
MS	Massenspektrometrie
MWCO	molecular weight cut-off
NIST	National Institute of Standards and Technology
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
<i>p</i>	<i>para</i>
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PEG	Polyethylenglycol
pI	isoelektrischer Punkt
PP	Polypropylen
ppm	parts per million
PTFE	Polytetrafluorethylen
QR	Chinon Reduktase
QTof	Quadrupol-time of flight
Rha	Rhamnose

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
spez.	spezifische
t	Tonnen
TAL	Tyrosin-Ammoniak-Lyase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
Tof	time of light
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit(s)
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
VIS	sichtbares Licht
v_{\max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
VP	versatile Peroxidase
w/v	Massenprozent
Xyl	Xylose
z. B.	zum Beispiel
ϵ	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen.....	3
2.1	Zusammensetzung von Holz	3
2.1.1	Cellulose	4
2.1.2	Hemicellulosen	4
2.1.3	Lignin	7
2.1.3.1	Biosynthese der Monolignole	8
2.1.3.2	Polymerisation der Monolignole zum Ligninpolymer	10
2.2	Biologischer Abbau von Lignin	14
2.2.2	Laccasen.....	16
2.2.1	Ligninperoxidasen.....	17
2.2.3	Manganperoxidasen.....	18
2.2.4	Versatile Peroxidasen.....	20
2.3	Zellstoffgewinnung.....	21
2.3.1	Sulfatverfahren	22
2.3.2	Sulfitverfahren	25
2.3.3	Weitere Aufschlussverfahren	28
2.3.4	Stoffliche Nutzung von Lignin.....	29
2.4	Einsatz von Weißfäulepilzen und deren Enzymen in der Zellstoff- und Papierindustrie	31
3	Problemstellung und Zielsetzung	33
4	Ergebnisse und Diskussion.....	35
4.1	Optimierung des Anzuchtmediums für Pilzmycelien	35
4.1.1	Variation der Dicklaugekonzentration.....	36
4.1.2	Variation der Stickstoffquelle	38
4.1.3	Variation der Peptonkonzentration	39
4.2	Laborscreening auf ligninolytische Aktivität.....	40
4.2.1	Auswirkungen der Kupfer(II)-Zugabe zum „Anzuchtmedium Dicklauge“	41
4.2.2	Auswirkungen der Mangan(II)-Zugabe zum „Anzuchtmedium Dicklauge“	42
4.2.3	Zusammenhang zwischen Enzymausschüttung und Zuckerabbau.....	43
4.2.4	Vergleich der Enzymausschüttung zwischen der Anzucht auf dem „Anzuchtmedium Dicklauge“ und auf Holzspänen.....	44

4.3	Entwicklung eines Protokolls zur Isolierung und Aufreinigung der ligninolytischen Enzyme.....	45
4.4	Charakterisierung der Laccasen.....	51
4.4.1	Bestimmung der Molekülgrößen der Laccasen mittels SDS-PAGE.....	51
4.4.2	Ermittlung des isoelektrischen Punktes.....	52
4.4.3	pH-Optimum und pH-Stabilität der Laccasen.....	53
4.4.4	Temperaturoptimum und Temperaturstabilität der Laccasen.....	58
4.4.5	Einfluss von Metallsalzen auf die Aktivität der Laccasen.....	64
4.4.6	Einfluss von Inhibitoren auf die Aktivität der Laccasen.....	67
4.4.7	Bestimmung der kinetischen Parameter der Laccasen.....	69
4.5	Charakterisierung der Manganperoxidase von <i>Calocera viscosa</i>	73
4.5.1	UV/VIS-Spektrum der Manganperoxidase.....	73
4.5.2	Molekulargewicht und isoelektrische Fokussierung.....	74
4.5.3	pH-Optimum und pH-Stabilität.....	74
4.5.4	Temperaturoptimum und Temperaturstabilität.....	76
4.5.5	Einfluss von Metallsalzen.....	78
4.5.6	Einfluss von Inhibitoren.....	79
4.5.7	Kinetische Parameter.....	81
4.6	Anwendung der isolierten Enzyme.....	83
4.6.1	Abbau von Ligninmodellsubstanzen mittels der isolierten Enzyme.....	83
4.6.1.1	Synthese der Modellsubstanz Dehydrodivanillin (6,6'-Dihydroxy-5,5'-dimethoxy-biphenyl-3,3'-dicarbaldehyd).....	84
4.6.1.2	Abbau der Modellsubstanzen mit einer Laccase von <i>A. brasiliensis</i>	86
4.6.1.3	Abbau der Modellsubstanz 1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-ethanon (Dimer=O) mit der Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i>	92
4.6.2	Abbau der Prozessablaugen mit den isolierten Enzymen.....	97
4.6.2.1	Abbau der Prozessablaugen mit der Laccase von <i>A. brasiliensis</i> (<i>A. brasiliensis</i> - 1).....	97
4.6.2.2	Abbau der Dicklauge mit der Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i>	104
5	Ausblick.....	106
6	Zusammenfassung.....	107
7	Experimenteller Teil.....	110
7.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	110
7.1.1	Ablaugen aus der Zellstoffindustrie.....	110
7.1.2	Chemikalien für die Pilzanzucht.....	110
7.1.3	Chemikalien für die Enzymisolierung.....	111

7.1.4	Chemikalien für die Enzymtests	111
7.1.5	Chemikalien für gelelektrophoretische Arbeiten	112
7.1.6	Chemikalien zur Zuckeranalytik	112
7.1.7	Chemikalien für die Synthese von Modellsubstanzen.....	113
7.1.8	Lösungsmittel für die Kernspinresonanzspektroskopie.....	113
7.1.9	Chemikalien für die Chromatographie	113
7.1.10	Verbrauchsmaterial.....	114
7.2	Geräteparameter.....	115
7.2.1	Ionenaustauschchromatographie.....	115
7.2.2	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID).....	116
7.2.4	Comprehensive zweidimensionale Gaschromatographie gekoppelt mit einem Flugzeitmassenspektrometer (GCxGC-(ToF)MS).....	118
7.2.5	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Diodenarray-Detektor.....	119
7.2.6	weitere Geräte	120
7.3	Nährmedien und Kultivierung	121
7.3.1	Zusammensetzung der Nährmedien zur Optimierung der Anzuchtbedingungen	121
7.3.2	Kultivierung der Pilzmycelien in Flüssigmedien zur Enzymgewinnung.....	122
7.3.3	verwendete Pilzmycelien	123
7.4	Puffer und Lösungen.....	124
7.4.1	Puffer.....	124
7.4.2	Substratlösungen zur Bestimmung der Enzymaktivität.....	124
7.4.3	Metallsalzlösungen	125
7.4.4	Inhibitorlösungen.....	126
7.4.5	Bradford-Reagenz.....	126
7.4.6	Lösungen für gelelektrophoretische Bestimmungen	126
7.4.7	Lösungen für die Analytik der Monosaccharide	127
7.5	Enzym-Assays zur Bestimmung der Enzymaktivität im Laborscreening, während der Inkubation und bei der Charakterisierung.....	128
7.5.1	ABTS-Assay.....	129
7.5.2	DMP-Assay.....	129
7.5.3	Mn(II)-malonat-Assay.....	130
7.6	Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford	130
7.7	Isolierung der ligninolytischen Enzyme.....	131
7.8	Charakterisierung der ligninolytischen Enzyme.....	132

7.8.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	132
7.8.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	132
7.8.3	Bestimmung des pH-Optimums	133
7.8.4	Bestimmung der pH-Stabilität.....	133
7.8.5	Bestimmung des Temperaturoptimums	133
7.8.6	Bestimmung der Temperaturstabilität	133
7.8.7	Einfluss verschiedener Metallsalze auf die Enzymaktivität	134
7.8.8	Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Enzymaktivität.....	134
7.8.9	Bestimmung der kinetischen Parameter	134
7.8.10	Aufnahme von UV/VIS-Spektren	134
7.9	Kernspinresonanzspektroskopie	134
7.10	Synthese der Modellsubstanz 6,6'-Dihydroxy-5,5'-dimethoxy-biphenyl- 3,3'-dicarbaldehyd (Dehydrodivanillin).....	135
7.11	Durchführung der Abbauprobversuche	135
7.11.1	Abbauprobversuche mit der Laccase und 1-Hydroxybenzotriazol.....	135
7.11.2	Abbauprobversuche mit der Manganperoxidase.....	135
7.12	Probenvorbereitung zur Analyse der Abbauprobversuche mittels GCxGC-(Tof)MS	136
7.13	Quantifizierung der Monosaccharide	136
8	Literaturverzeichnis.....	138
9	Anhang	152
9.1	Ergänzende Abbildungen und Tabellen.....	152
9.2	Abbildungsverzeichnis	162
9.3	Tabellenverzeichnis	166

1 Einleitung

Mit der Entwicklung der Petrochemie Mitte des letzten Jahrhunderts wurde eine Plattform für die Gewinnung einer Vielzahl von Chemikalien aus fossilen Rohstoffen, wie Erdöl, für die chemische Industrie geschaffen. Diese bilden bis heute die Grundlage verschiedenster Wertschöpfungsketten weltweit [1].

Aufgrund der steigenden Nachfrage nach chemischen Rohstoffen und der begrenzten Verfügbarkeit fossiler Rohstoffe, ist einer Verknappung und eine damit einhergehende Verteuerung derartiger Plattformchemikalien zu erwarten [1].

Daher rücken nachwachsende Rohstoffe verstärkt in den Fokus verschiedenster Forschungsbemühungen. In Deutschland lag der Marktanteil der aus diesen Rohstoffen gewonnenen Grundstoffe im Jahr 2007 bei etwa 10 % (bezogen auf die eingesetzte Rohstoffbasis), wobei jährlich etwa 2,0 Mio. t nachwachsende Rohstoffe, genutzt werden. Hauptsächlich handelt es sich hierbei um pflanzliche Öle (z.B. Rapsöl, Sonnenblumenöl, Leinöl) und das Polysaccharid Stärke [2].

Diese nachwachsenden Rohstoffe stehen jedoch in direkter Konkurrenz zur Nahrungs- und Futtermittelproduktion. Daher sind vor allem Ressourcen interessant, die zu Ernährungszwecken nicht geeignet sind. Insbesondere ist hier der nachwachsende Rohstoff Holz mit einer jährlichen Biosyntheseleistung von $1,7 - 2,0 \times 10^{11}$ t und damit verbunden die holzbildenden Makromoleküle Cellulose, Hemicellulosen und Lignin zu nennen [3-5]. Während die Polysaccharide Cellulose und Hemicellulosen bereits technisch genutzt werden, existieren für Lignin bisher nur wenige Verwendungsmöglichkeiten. So stellt das Lignin vor allem ein Abfallprodukt des industriellen Prozesses der Zellstoffgewinnung in Form von sogenannten Ablaugen dar. Diese Ablaugen werden bisher zur Energiegewinnung verbrannt. Aufgrund des einzigartigen Aufbaus des Polymers stellt das Lignin jedoch besonders für die Gewinnung verschiedenster Plattformchemikalien, die bisher aus der Petrochemie gewonnen werden, eine interessante Alternative dar. Von besonderem Interesse ist hierbei das aromatische System der drei Grundbausteine, die eine direkte Synthese weiterer Stoffe mit industrieller Relevanz erlauben. Beim Vorliegen dieser aromatischen Grundbausteine ist eine weitere Nutzung als Rohstoff in der chemischen Industrie unter Nutzung von bekannten und etablierten Verfahren (z.B. Verfahren wie sie in der Petrochemie genutzt werden) von besonderem Interesse. Viele Industriechemikalien und Wirkstoffe (PU-, PET-Kunststoffe, Pigmente, etc.) werden über Synthesewege aufgebaut, die auf einem ein- oder mehrfach-substituiertem Benzolkern basieren.

Verschiedene Ansätze beschäftigen sich mit der thermochemischen Konversion von Biomasse zu Synthesegas, aus welchem unterschiedlichste Folgeprodukte synthetisiert werden können. Hierbei stellt sich jedoch die Frage, inwieweit es sinnvoll ist, das Lignin unter hohem Energieeinsatz vollständig zu vergasen, um im Anschluss wieder neue Verbindungen zu synthetisieren. Vielmehr ist ein Abbau des Polymers in die aromatischen Grundstrukturen anzustreben.

Von besonderem Interesse ist hier der Abbau von Lignin in der Natur. Beim natürlichen Abbau des Lignins zum Humus laufen verschiedene Degradationsvorgänge ab. Eine wichtige Rolle spielen dabei Pilze, die durch Exozytose das Lignin-Makromolekül degradieren und so erst die Bruchstücke zur weiteren Verwertung dem Pilz zugänglich machen. So sind Weißfäulepilze in der Lage, selektiv Lignin abzubauen, während die Cellulosefasern weitgehend intakt bleiben. Die Strukturen der Abbauprodukte beinhalten einen aromatischen Ring und weitere funktionelle Gruppen, die dann eine Folgechemie ermöglichen. Ähnliche Moleküle werden bei der Aufbereitung von rohem Erdöl separiert und dienen der chemischen Industrie als Rohstoffquelle für die Aromatenchemie. Die Abbauprodukte des Lignins in monomerer bzw. dimerer Form, die durch biokatalytische Abbauprozesse mittels ligninolytischer Enzyme erhalten werden, könnten somit ebenfalls als Rohstoff dienen und petrochemische Stoffe substituieren.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Zusammensetzung von Holz

Der Begriff Holz bezeichnet das feste Gewebe der Sprossachsen von Bäumen. Hierbei handelt es sich um das vom Kambium aus nach innen gebildete sekundäre Xylem als Verbindung zwischen Wurzeln und Blättern von Bäumen und Sträuchern [6-8]. Durch die Einlagerung von Lignin in die Zellwände kommt es zur Verholzung des Gewebes [9,10]. Das Holz erfüllt dabei mechanische Aufgaben der Stützung und Festigung sowie die physiologische Aufgabe der Wasserleitung mitsamt der darin gelösten Mineralien und der Speicherung von Reservestoffen [8].

Die jährliche Biosyntheseleistung von Holz beträgt weltweit $1,7 - 2,0 \times 10^{11}$ Tonnen [3-5]. Holz setzt sich hauptsächlich aus den drei Polymeren Cellulose, Hemicellulosen und Lignin zusammen [11-13]. Diese Hauptkomponenten bilden die Zellwände im Holz und machen einen Anteil von 90 - 95 % der Trockenmasse aus [8,13-15]. Je nach Holzspezies variieren die Anteile der drei Bestandteile erheblich. Nadelhölzer enthalten durchschnittlich weniger Hemicellulosen als Laubhölzer. Dafür enthalten die im mehr Lignin (Tabelle 1). Zwischen Hölzern der gleichen Art und innerhalb eines Baumes kann es ebenfalls zu leichten Unterschieden in der Zusammensetzung kommen [8].

Tabelle 1: Zusammensetzung der Hauptkomponenten in Nadel- und Laubholz [8]

*Gehalte bezogen auf das extraktfreie Holz

Polymer	Nadelholz	Laubholz
Cellulose*	42 - 49 %	42 - 51 %
Hemicellulosen*	24 - 30 %	27 - 40 %
Lignin*	24 - 30 %	18 - 24 %

Neben den Zellwandbestandteilen sind im Holz Nebenkomponenten enthalten, bei denen es sich um niedermolekulare Extraktstoffe und Mineralstoffe handelt, die insbesondere im Lumen lokalisiert sind [13,15]. Der Gehalt an Nebenkomponenten variiert stark, sodass vor allem in tropischen Hölzern der Gehalt an Extraktstoffen mit einem Anteil von bis zu 30 % relativ hoch ist [8,15]. In Hölzern der gemäßigten Zone sind zwischen 1 und 10 % Extraktstoffe enthalten [8]. Bei den Nebenkomponenten handelt es sich zum einen um aliphatische Bestandteile wie Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Fette und Wachse. Zum anderen finden sich aromatische Verbindungen wie Phenole, Stilbene, Flavonoide, Tannine, Chinone und Lignane sowie Terpene und Kohlenhydrate im Holz [8].

2.1.1 Cellulose

Holz besteht zu etwa 50 % aus Cellulose [8] und stellt mit einer jährlichen Biosyntheseleistung von etwa 10^{11} Tonnen das häufigste Biopolymer auf der Erde dar [6,13,16]. Cellulose ist ein lineares Polymer aus 1,4-glycosidisch verknüpfter β -D-Glucose mit einem durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von etwa $n = 10.000$ (Abbildung 1) [8,13,15,17,18]. Durch die Verknüpfung zweier Glucoseeinheiten unter Abspaltung von Wasser wird die eigentliche Untereinheit der Cellulose, die Cellobiose, gebildet [13,19,20]. Das Polymer wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hydroxylgruppen benachbarter Glucosereste und durch van-der-Waals-Kräfte stabilisiert [8,13,15,19].

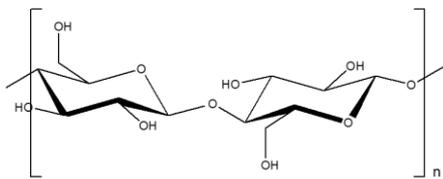


Abbildung 1: Ausschnitt aus dem Cellulose-Polymer - Cellobiose-Einheit nach [20]

In stark saurer Lösung werden die glucosidischen Bindungen schon bei niedrigen Temperaturen leicht hydrolysiert, während eine Hydrolyse in alkalischer Lösung erst bei höheren Temperaturen erfolgt [18].

2.1.2 Hemicellulosen

Hemicellulosen sind im Gegensatz zur Cellulose heterogene Polymere [12,13]. Sie sind nahezu linear, mit kurzen Seitenketten aufgebaut und werden ebenfalls durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert [8]. Sie sind jedoch wesentlich kleiner als Cellulose ($n = 15 - 200$) [8,18,21]. Bei den monomeren Grundbausteinen der Hemicellulosen handelt es sich um Pentosen (D-Xylose, L-Arabinose), Hexosen (D-Mannose, D-Galactose, D-Glucose), Hexuronsäuren (D-Glucuronsäure, D-4-O-Methylglucuronsäure, D-Galacturonsäure) und Desoxyzucker (L-Rhamnose, L-Fucose) [8,13,15,19]. Im Holz existieren abhängig von der Holzart unterschiedliche Hemicellulosen.

In Laubhölzern liegen fast ausschließlich O-Acetyl-4-O-methylglucuronoxylan und Glucomannan vor [12] (Abbildung 2).

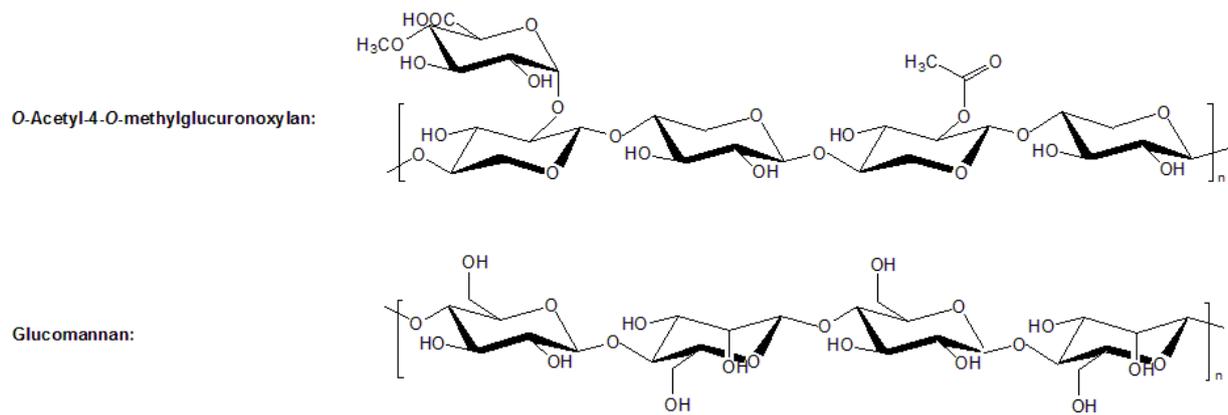


Abbildung 2: Hemicellulosen im Laubholz nach [13,20]

Die dominierende Hemicellulose ist das *O*-Acetyl-4-*O*-methylglucuronoxylan, das 95 % der Hemicellulosen im Laubholz ausmacht [5,15,18]. Es besteht aus β -1,4-verknüpfter D-Xylopyranose mit Seitenketten von 4-*O*-Methyl- α -D-Glucopyranuronsäure, die an einigen C2-Atomen der Xylose substituiert sind. Die Sauerstoffatome der Xylose am C2- oder C3-Atom können teilweise acetyliert sein [8,18,22-26]. *O*-Acetyl-4-*O*-methylglucuronoxylan weist einen Polymerisierungsgrad von $n = 100 - 200$ auf [22,23,27-32]. Im Gegensatz dazu besteht das in Mengen von 3 - 5 % auftretende Glucomannan aus einer linearen Kette β -1,4-verknüpfter D-Mannopyranose- und β -1,4-verknüpfter D-Glucopyranose-Einheiten. Die Monomereinheiten sind willkürlich angeordnet [8,18] und weisen einen Polymerisationsgrad von nur $n = 60 - 70$ auf [33-35].

Charakteristisch für Hemicellulosen im Nadelholz sind Arabino-4-*O*-methylglucuronoxylan und *O*-Acetyl-galactoglucomannan (Abbildung 3) [8,12,36].

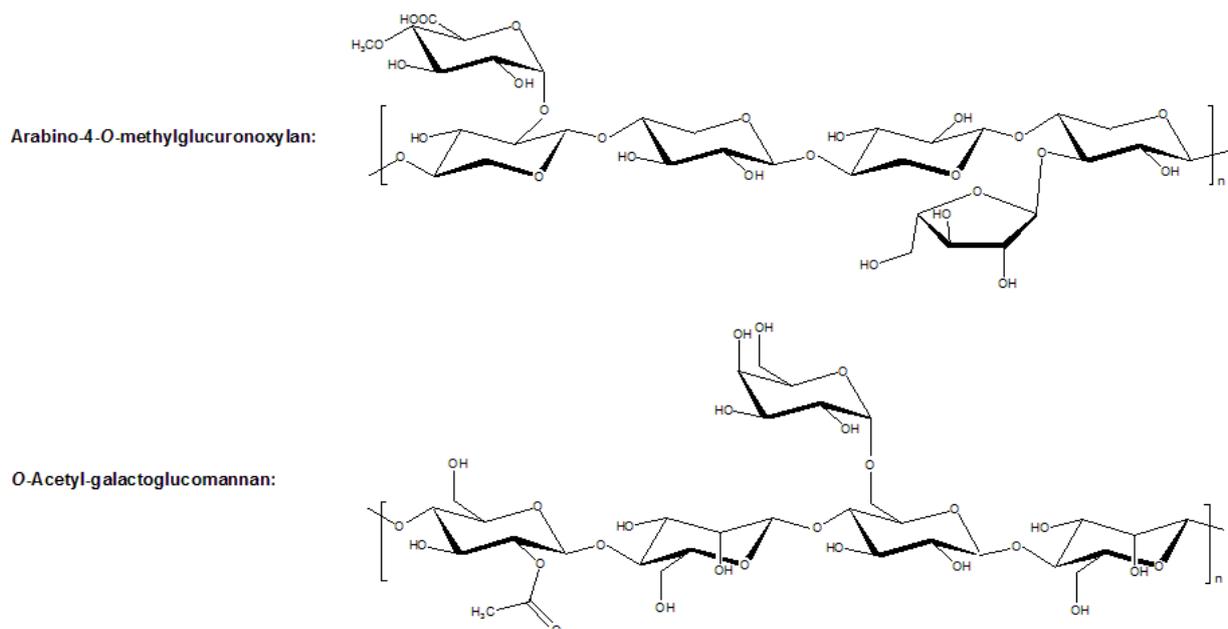


Abbildung 3: Hemicellulosen im Nadelholz nach [13,20]

Nadelholz besteht zu 75 – 80 % aus Arabino-4-*O*-methylglucuronoxylan und zu 20 – 25 % aus *O*-Acetyl-galactoglucomannan [5,13], sodass der Mannananteil im Nadelholz wesentlich höher ist als im Laubholz. Die Hemicellulose Arabino-4-*O*-methylglucuronoxylan weist einen höheren Gehalt an 4-*O*-Methylglucuronsäure und einen geringeren Polymerisationsgrad ($n = 70 - 130$) als das *O*-Acetyl-4-*O*-methylglucuronoxylan im Laubholz auf [13,36-38]. Sie besteht ebenfalls aus β -1,4-verknüpfte D-Xylopyranose mit Seitenketten von 4-*O*-methyl- α -D-Glucopyranuronsäure, die an einigen C2-Atomen der Xylose zu finden sind. Jedoch treten statt der Acetylgruppen α -1,3-verknüpfte L-Arabinofuranosen am C3-Atom der Xylose auf [12,13,36,37]. *O*-Acetyl-galactoglucomannan ist die kürzeste Hemicellulose im Holz mit einem Polymerisationsgrad von $n = 15 - 100$ [39-45]. Die lineare Kette aus β -1,4-verknüpfte D-Mannopyranose und β -1,4-verknüpfte D-Glucopyranose ist teilweise acetyliert und mit D-Galactopyranose α -1,6-glycosidisch verknüpft [39-41,43,44,46,47]. Aus den unterschiedlichen Hemicellulosen in Laub- und Nadelholz ergeben sich signifikante Unterschiede in den Monosaccharidzusammensetzungen verschiedener Hölzer (Tabelle 2).

Tabelle 2: Monosaccharidzusammensetzungen von Laub- und Nadelhölzern [48-50]

(Anteile bezogen auf das extraktfreie Holz; Glc: Glucose; Gal: Galactose; Man: Mannose; Ara: Arabinose; Xyl: Xylose; Rha: Rhamnose; k.A.: keine Angabe)

Spezies	Uron-säuren [%]	Glc [%]	Gal [%]	Man [%]	Ara [%]	Xyl [%]	Rha [%]
Laubholz							
Rotahorn - <i>Acer rubrum</i>	4,9	42,3	1,0	3,3	1,0	18,1	k.A.
Hängebirke - <i>Betula verrucosa</i>	3,6	35,8	0,7	3,2	0,4	24,9	0,6
Rotbuche - <i>Fagus sylvatica</i>	4,8	43,8	1,4	0,9	0,7	19,0	0,5
Gemeine Esche - <i>Fraxinus excelsior</i>	6,0	39,8	0,9	3,8	0,6	18,3	0,5
Amerikanische Zitterpappel - <i>Populus tremuloides</i>	3,7	44,4	1,1	3,5	0,9	21,2	k.A.
Amerikanische Ulme - <i>Ulmus americana</i>	4,7	50,2	0,9	3,4	0,4	15,1	k.A.
Nadelholz							
Balsamtanne - <i>Abies balsamea</i>	4,8	44,5	1,0	10,0	1,1	5,2	k.A.
Europäische Lärche - <i>Larix decidua</i>	4,8	46,1	2,0	10,5	2,5	6,3	k.A.
Gemeine Fichte - <i>Picea abies</i>	5,3	43,3	2,3	9,5	1,4	7,4	k.A.
Schwarzfichte - <i>Picea mariana</i>	5,1	44,2	2,0	9,4	1,5	6,0	k.A.
Weymouthkiefer - <i>Pinus strobus</i>	5,2	43,6	3,8	8,1	1,7	7,0	k.A.
Waldkiefer - <i>Pinus sylvestris</i>	5,6	43,5	3,1	9,5	1,6	7,6	k.A.
Kanadische Hemlocktanne - <i>Tsuga canadensis</i>	4,7	43,1	1,8	10,6	1,0	3,3	k.A.

Die hohen Gehalte an Glucose beruhen vor allem auf dem hohen Cellulosegehalt des Holzes. Die weiteren Monosaccharide sind auf die Hemicellulosen zurück zu führen.

2.1.3 Lignin

Lignin ist ein komplexes, optisch inaktives, aromatisches, dreidimensionales Heteropolymer, welches den Raum zwischen Cellulose-Myofibrillen und Hemicellulosen bei der Verholzung im Gewebe ausfüllt (Abbildung 4) [19]. Es dient nicht nur als Füll- und Stützmaterial, sondern fixiert auch die beiden Polymere Cellulose und Hemicellulosen aneinander, sodass eine stabile und starre Struktur entsteht. Außerdem sorgt das Lignin dafür, dass die Zellwand hydrophob wird, sodass die Zellen nicht durch Anwesenheit von Wasser aufquellen. Des Weiteren dient das Lignin der Pflanze als Schutz gegen Mikroorganismen oder andere Fressfeinde [17,51-53]. Aufgrund der festen Verbindung zu den Polysacchariden ist es kaum möglich, Lignin in nativer Form zu isolieren, sodass keine genaue Aussage über das Molekulargewicht des Lignins in Pflanzen gemacht werden kann [54].

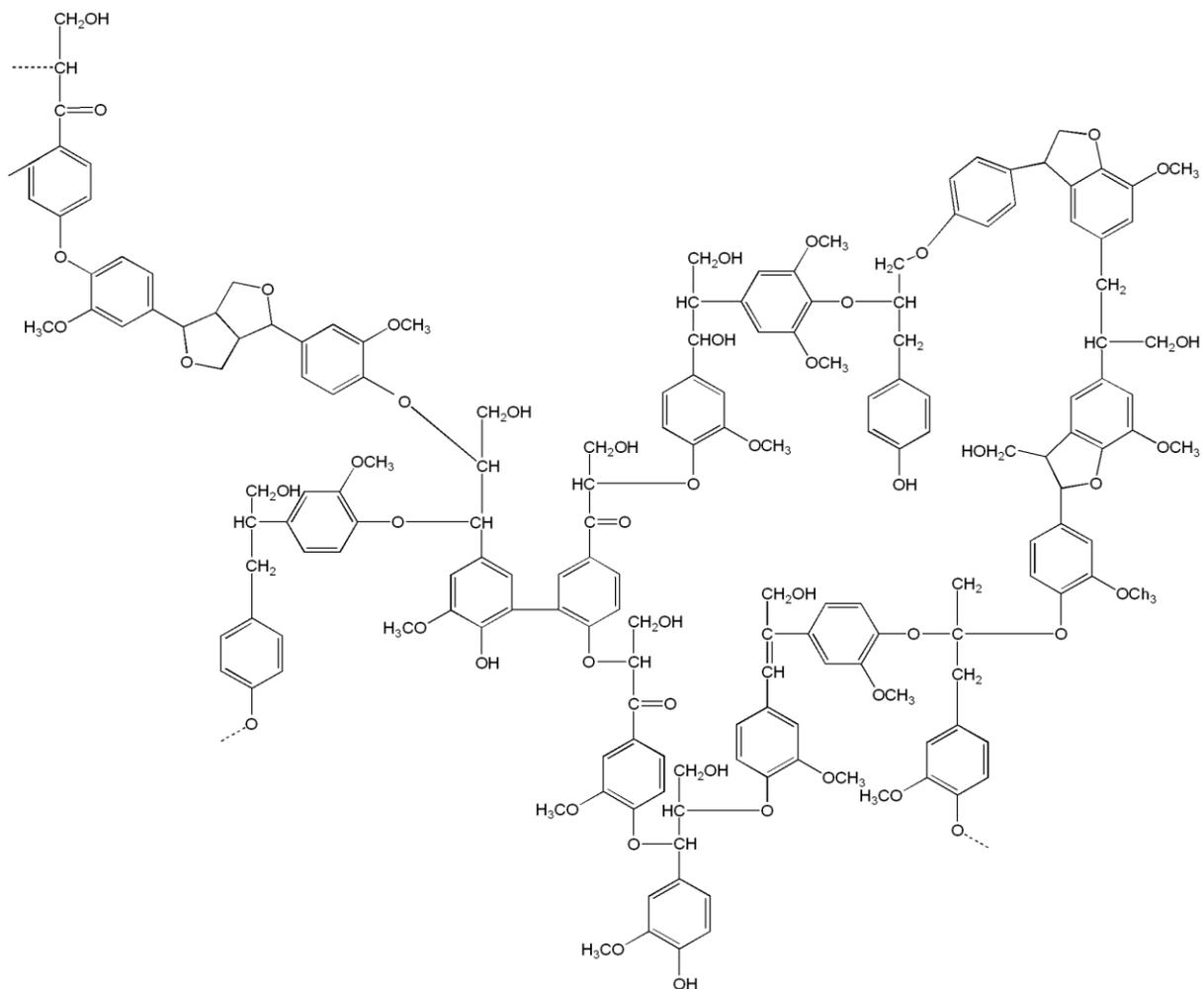


Abbildung 4: Ausschnitt aus einem Ligninpolymer [13,55,56]

Die Verteilung von Lignin in den Zellwänden sowie der Ligningehalt in unterschiedlichen Teilen des Baumes variieren [13,51]. Mit einem Anteil von 18 - 30 % im Holz (vgl. Kapitel 2.1 Tabelle 1) ist es das zweithäufigste Biopolymer auf der Erde und somit der mit Abstand größte nachwachsende aromatische Rohstoff mit einer jährlichen Biosynthese von etwa 2×10^{10} t weltweit [57].

Das Ligninpolymer ist hauptsächlich aus drei Phenylpropanoid-Einheiten, den sogenannten Monolignolen *p*-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol aufgebaut. Diese Einheiten unterscheiden sich nur im Grad ihrer Methoxylierung (Abbildung 5) [11,13-15,51,58,59].

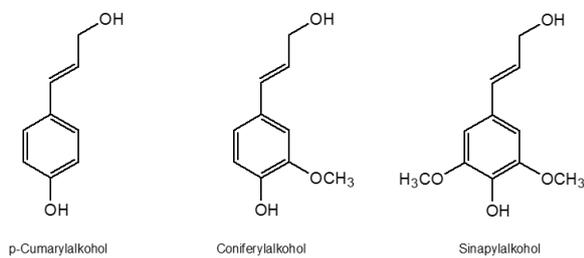


Abbildung 5: Strukturen der Monolignole nach [13]

2.1.3.1 Biosynthese der Monolignole

Die Biosynthese der drei Monolignole erfolgt im Phenylpropanoidstoffwechsel aus den beiden aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin [12,60,61].

Diese werden aus Glucose, dem Endprodukt der Photosynthese, im Shikimatweg synthetisiert [11,12,58,61,62].

In der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg wird die Glucose zu Phosphoenolpyruvat bzw. Erythrose-4-phosphat umgesetzt. Hieraus entsteht im Shikimatweg über die Shikimisäure die Prephensäure, die die Ausgangssubstanz der Synthesewege aromatischer Aminosäuren ist, umgesetzt. Die Bildung der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin erfolgt über Phenylpyruvat nach Wasserabspaltung und Decarboxylierung bzw. über *p*-Hydroxyphenylpyruvat nach oxidativer Decarboxylierung mit anschließender Transaminierung (Abbildung 6) [11,58,59,61].

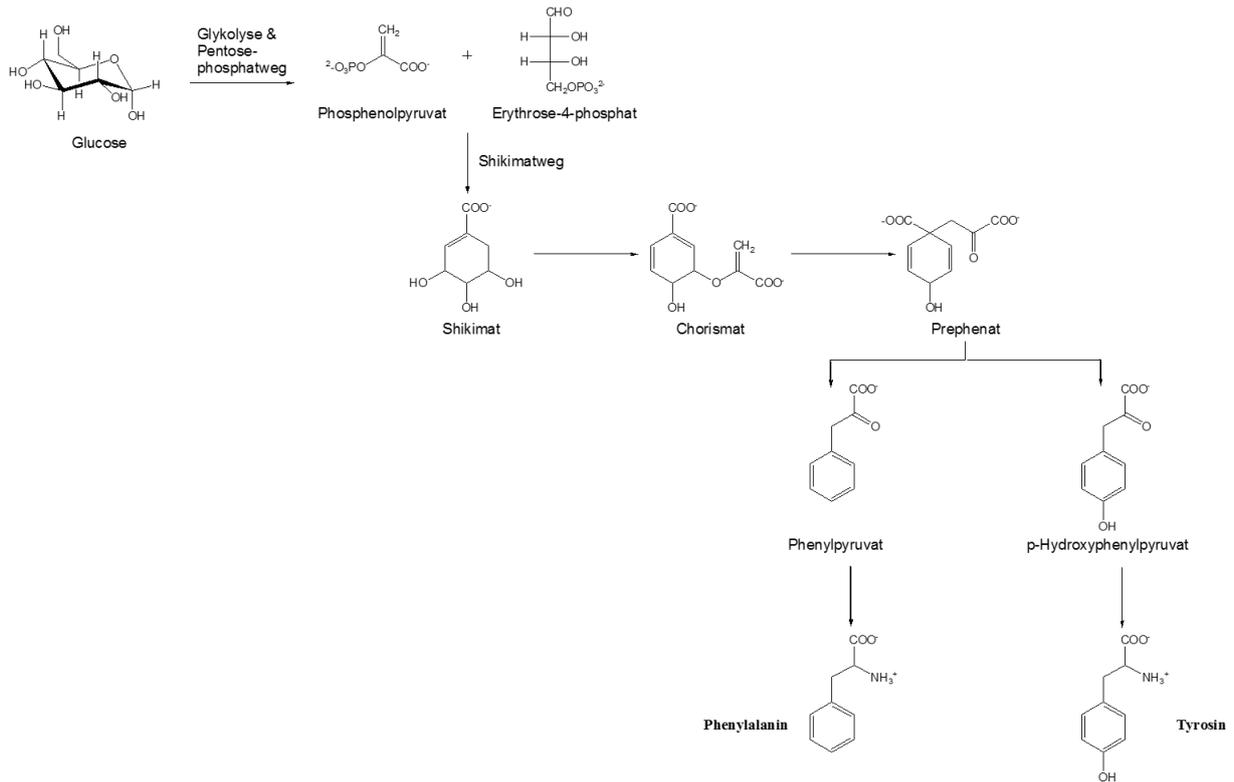


Abbildung 6: Bildung der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin aus Glucose nach [11,58,59]

Phenylalanin und Tyrosin stellen die Ausgangsverbindungen des Phenylpropanoid-Stoffwechsels dar. Im ersten Schritt erfolgt eine Desaminierung von Phenylalanin oder Tyrosin durch Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) bzw. Tyrosin-Ammoniak-Lyase (TAL) zur Zimtsäure. Danach folgt eine sukzessive Hydroxylierung durch Phenolasen sowie Methylierungen durch *O*-Methyltransferasen. Katalysiert durch die Cinnamat-4-Hydrolase (C4H) wird eine Hydroxylgruppe in *para*-Position eingeführt, sodass die *p*-Cumarsäure entsteht, die nach Aktivierung mittels des Enzyms 4-Cumarinsäure: Coenzym A-Lyase (4CL) durch die Cinnamoyl-Coenzym A-Reduktase (CCR) zum *p*-Cumarylaldehyd reduziert wird. Dieser wird anschließend mittels Cinnamylalkohol-Dehydrogenase (CAD) zu *p*-Cumarylalkohol, dem ersten Monolignol, reduziert. Des Weiteren erfolgt die Einführung einer weiteren Hydroxylgruppe, sodass Kaffeoyl-CoA gebildet wird. Kaffeoyl-CoA wird durch Kaffeesäure-*O*-Methyl-Transferase (COMT) und Kaffeoyl-Coenzym A-Reduktase (CCoAOMT) zum Feruloyl-CoA umgesetzt, indem die Hydroxylgruppe in *meta*-Position methyliert wird. Hieraus wird durch die CCR der Coniferylaldehyd gebildet, der dann durch CAD zum Coniferylalkohol, dem zweiten Monolignol, reduziert wird. Durch eine Hydroxylierung mittels Ferulasäure-5-Hydroxylase (F5H) und anschließender Methylierung durch COMT wird aus dem Coniferylaldehyd der Sinapylaldehyd gebildet, der dann mittels CAD zum dritten Monolignol, dem Sinapylalkohol reduziert wird (Abbildung 7) [61,63,64].

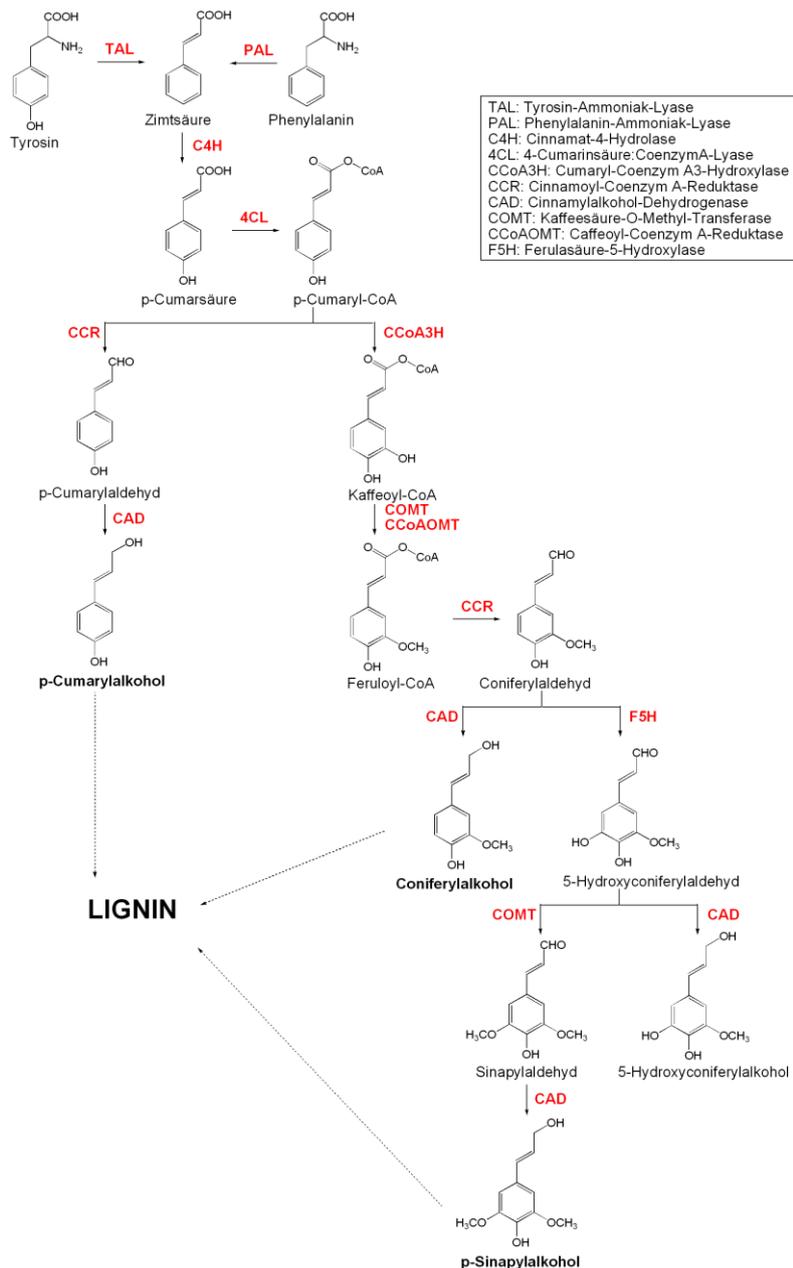


Abbildung 7: Synthese der Monolignole im Phenylpropanoidstoffwechsel nach [51,65]

2.1.3.2 Polymerisation der Monolignole zum Ligninpolymer

Die Polymerisation der Monolignolbausteine, die meist glucosidisch gebunden in der Zelle vorliegen, um zu den Zellwänden transportiert werden zu können [11,13], zu hochkomplexem Lignin erfolgt in Form einer dehydrogenierenden Polymerisation. Nach enzymatischer Spaltung der Glucoside mittels β -Glucosidasen erfolgt eine enzymatische Dehydrogenierung des Monomers, sodass ein mesomeriestabilisiertes Phenoxyradikal entsteht [13,15,60,61,66,67] (Abbildung 8).

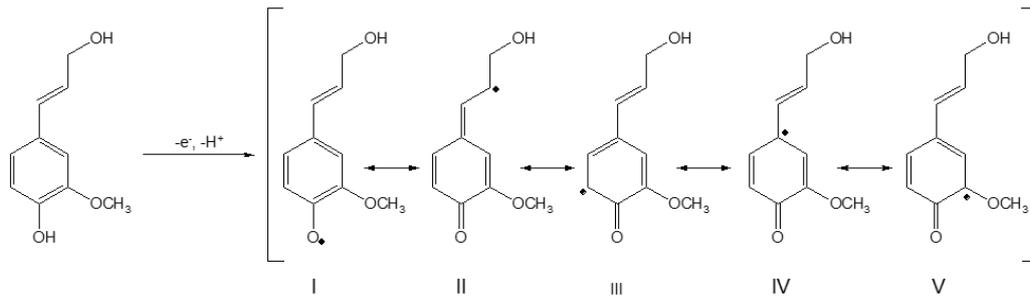


Abbildung 8: Mesomerie der Phenoxyradikale nach [13]

Bei den Enzymen handelt es sich sowohl um Laccasen als auch um Peroxidasen. Hierbei agieren die Peroxidasen mit Wasserstoffperoxid als Co-Substrat. Die in Abbildung 8 gezeigte Grenzstruktur V tritt durch die sterische Hinderung praktisch nicht auf [13,51,60,61,68].

Aufgrund der Mesomerie ergeben sich verschiedene Möglichkeiten der Kopplung von zwei Monomeren zu einem Dimer. Bei der Benennung der Verknüpfungen wird die in Abbildung 9 gezeigte Nomenklatur verwendet.

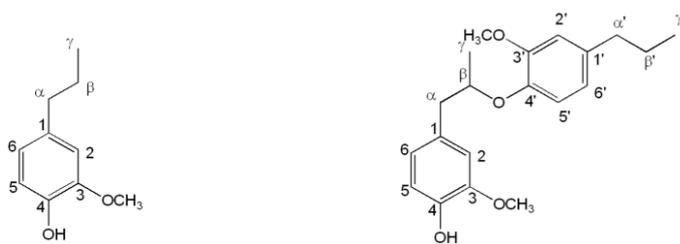


Abbildung 9: Nomenklatur der Verknüpfungsmöglichkeiten im Lignin
(links: Monomer; rechts: Dimer)

Die Dimerisierung kann zum einen direkt zwischen zwei aromatischen Ringen erfolgen. Zum anderen sind sowohl Kopplungen zwischen der Propanoid-Seitenkette und dem aromatischen Ring als auch zwischen zwei Seitenketten möglich, sodass es zur Ausbildung von C-C-Bindungen als auch zur Bildung von Ethern kommt. Einige dieser Verknüpfungsmöglichkeiten sind in Tabelle 3 dargestellt, wobei andere Möglichkeiten der Kopplung nicht ausgeschlossen sind [60,65,69,70].

Tabelle 3: Kopplungsmöglichkeiten zweier Monolignol-Phenoxyradikale [60]

mesomere Grenzstruktur				
	I	II	III	IV
I	Peroxid (instabil)	β -O-4'	4-O-5'	1-O-4'
II	β -O-4'	β - β'	β -5'	β -1'
III	4-O-5'	β -5'	5-5'	1-5'
IV	1-O-4'	β -1'	1-5'	1-1'

Die Kohlenstoffatome des Aromaten werden mit arabischen Ziffern bezeichnet, während die Kohlenstoffatome der Propanoidseitenkette mit griechischen Buchstaben benannt werden, wobei die Kohlenstoffe des zweiten Rings zusätzlich mit einem Strich gekennzeichnet werden. Die häufigsten Bindungstypen zwischen zwei Monolignolen im Ligninpolymer sind in Abbildung 10 zusammengefasst [11,69].

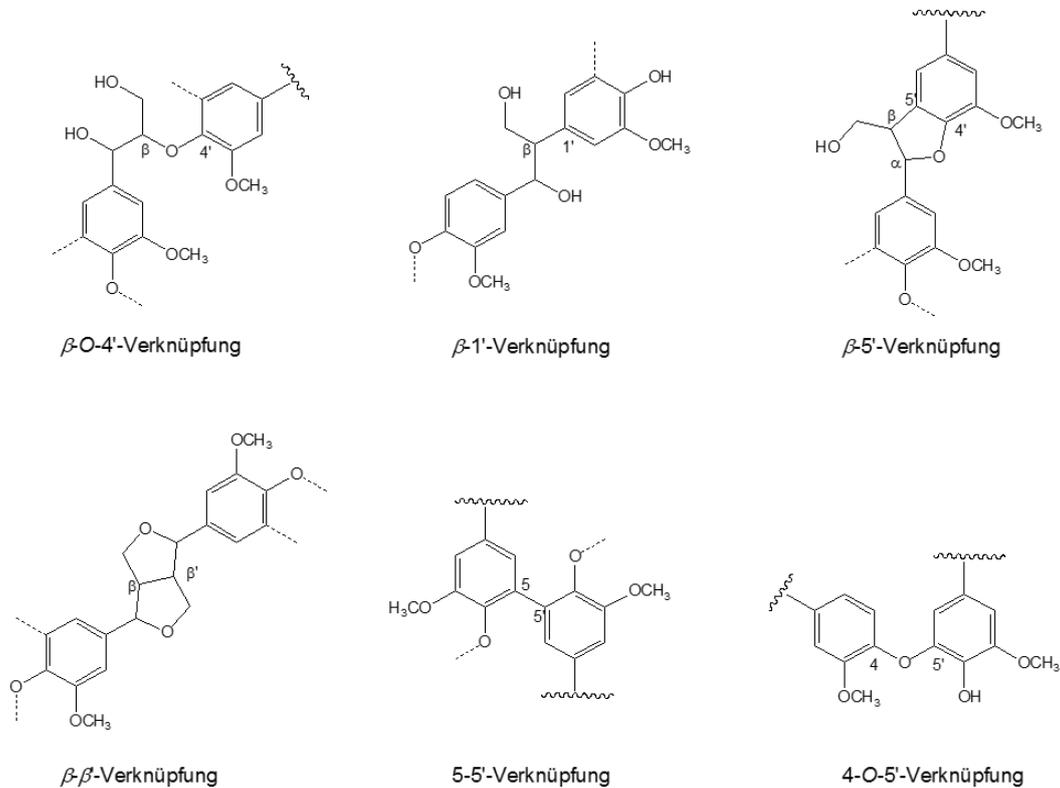


Abbildung 10: Bindungstypen im Lignin-Polymer nach [71]

Da die π -Elektronendichte am phenolischen Sauerstoffatom am höchsten ist, ist die Bildung einer Aryl-Ether-Bindung (z.B. β -O-4'-Verknüpfung) die häufigste Bindung im Lignin von Laub- und Nadelhölzern [13,51,60]. Tabelle 4 zeigt die Anteile der in Abbildung 10 dargestellten Bindungstypen im Holz von Laub- und Nadelhölzern.

Tabelle 4: Anteile der Bindungstypen im Lignin des Laub- und Nadelholzes [72]

Bindung	Anteil in Laubholzlignin [%]	Anteil in Nadelholzlignin [%]
β -O-4'	60	46
α -O-4'	6 - 8	6 - 8
β -1'	7	7
β -5'	6	9 - 12
β - β'	3	2
5-5'	4,5	9,5 - 11
4-O-5'	6,5	3,5 - 4

Somit sind 50 - 66 % der Verknüpfungen im Lignin Etherbindungen. Die β -O-4'-Bindung ist die Bindung im Lignin, die am schnellsten und einfachsten chemisch gespalten werden kann, da C-C-Bindungen wesentlich stabiler sind. So kann es bei der hydrolytischen Spaltung von β -O-4'-Bindungen im Lignin durch Säuren zur Erhöhung der Anzahl der C-C-Bindungen kommen, da Kondensationsreaktionen der Spaltungsprodukte stattfinden [8].

Nach der Bildung von Dimeren erfolgt die Polymerisation durch erneute Ausbildung von Radikalen, die untereinander Verbindungen eingehen. Hierbei kann eine Polymerisation über die Addition weiterer Monolignole an Di-, Tri- oder Oligomere oder durch die Kupplung von Oligomeren untereinander erfolgen. Dieser Prozess wird auch als Lignifizierung oder Verholzung bezeichnet [11,13,54,55,60,67].

Das Ligninpolymer bildet mit den Polysaccharidkomponenten der Zellwand sogenannte Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe aus, bei denen Lignin, Cellulosen und Hemicellulosen chemisch verknüpft sind [14,15,60,73].

Das Verhältnis der Monomerbausteine im Polymer zueinander ist u.a. abhängig von der Pflanzenart, dem Gewebetyp, dem Alter des Gewebes und verschiedenen Umweltbedingungen. Prinzipiell lässt sich aber anhand der Mengenverhältnisse der drei Monolignole eine Unterscheidung zwischen Ligninen verschiedener Herkunft (Nadelholz, Laubholz, Gras) vornehmen (Tabelle 5) [65,71].

Tabelle 5: Anteile der Ligninmonomereinheiten in Nadel-, Laub- und Graslignin [8] (Durchschnittswerte)

	Nadelholzlignin	Laubholzlignin	Graslignin
<i>p</i> -Cumarylalkohol	14 %	4 %	30 %
Coniferylalkohol	80 %	53 %	50 %
Sinapylalkohol	6 %	43 %	20 %

Higuchi *et al.* [58,74] konnten zeigen, dass der höhere Gehalt an Sinapylalkoholeinheiten im Laubholz durch die höhere Affinität der 4-O-Methyltransferase für 5-Hydroxyferulasäure in Laubhölzern bedingt ist.

2.2 Biologischer Abbau von Lignin

In der Natur wird Lignin nur von Weißfäulepilzen, die überwiegend zur Abteilung der Basidiomyceten gehören, unter Verwendung spezieller Enzyme und unter aeroben Bedingungen effizient abgebaut [52,75-77]. Der Abbau des Lignins stellt dabei neben der Degradation von Cellulose eine zentrale Position im Kohlenstoffkreislauf der Erde dar [78-80]. Da es sich beim Lignin um ein großes wasserunlösliches Biopolymer mit einer Molmasse von 5000 - 10000 Da handelt (vgl. Kapitel 2.1.3), muss der Abbau extrazellulär ablaufen [81]. Die dabei erhaltenen Ligninbruchstücke, die vom Pilz aufgenommen werden können, dienen diesem als Energiequelle [75]. Somit umfasst der Abbau (i) die extrazelluläre Zersetzung des Ligninpolymers in wasserlösliche Fragmente, (ii) die Aufnahme der Bruchstücke durch die Zellmembranen in die Hyphen des Pilzes sowie (iii) deren vollständige Mineralisierung zu Kohlenstoffdioxid und Wasser [81].

Der Begriff Weißfäulepilz ist auf den weißen Rückstand zurückzuführen, der nach Abbau des Lignins in Form von Cellulose und Hemicellulosen zurück bleibt [82,83].

Grundsätzlich wird zwischen Weißfäulepilzen unterschieden, die Lignin selektiv abbauen ohne die Cellulose anzugreifen [83-86] und solchen, die das Lignin bevorzugt vor der Cellulose verwerten [76,86]. Selektive ligninabbauende Pilze sind z.B. *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Phlebia radiata*, *Dichomitus squaleus*, *Bjerkandera adusta* und *Gandoderma tsugae* [83,84,87-89].

Der biologische Ligninabbau erfolgt durch verschiedene Enzyme. Die vier wichtigsten, am biologischen Ligninabbau beteiligten Enzymgruppen sind Ligninperoxidasen (LiP), Manganperoxidasen (MnP), versatile Peroxidasen (VP) und Laccasen (Lac), wobei der Abbauprozess durch weitere Enzymgruppen unterstützt wird [71,80]. Eine Übersicht über das komplexe Enzymsystem der Weißfäulepilze ist in Abbildung 11 gezeigt.

Der enzymatische Ligninabbau erfolgt durch Phenoloxidasen und Häm-haltige Peroxidasen. Hierbei kommt es im ersten Schritt zur Bildung freier Radikale, die dann ohne Einwirken von Enzymen zu kleineren Molekülen zerfallen. Laccasen benötigen molekularen Sauerstoff, der zu Wasser reduziert wird, während Peroxidasen auf Wasserstoffperoxid als Co-Substrat angewiesen sind. Dieses wird durch zusätzliche Enzyme (H₂O₂-bildende Oxidasen) gebildet [90,91]. Während Ligninperoxidasen direkt am Substrat wirken, oxidieren Manganperoxidasen Mn(II) zu Mn(III), welches dann die Radikalbildung am Lignin initiiert. Versatile Peroxidasen sind Hybrid-Enzyme aus Lignin- und Manganperoxidasen, die die Eigenschaften beider Enzyme besitzen [71,80,92].

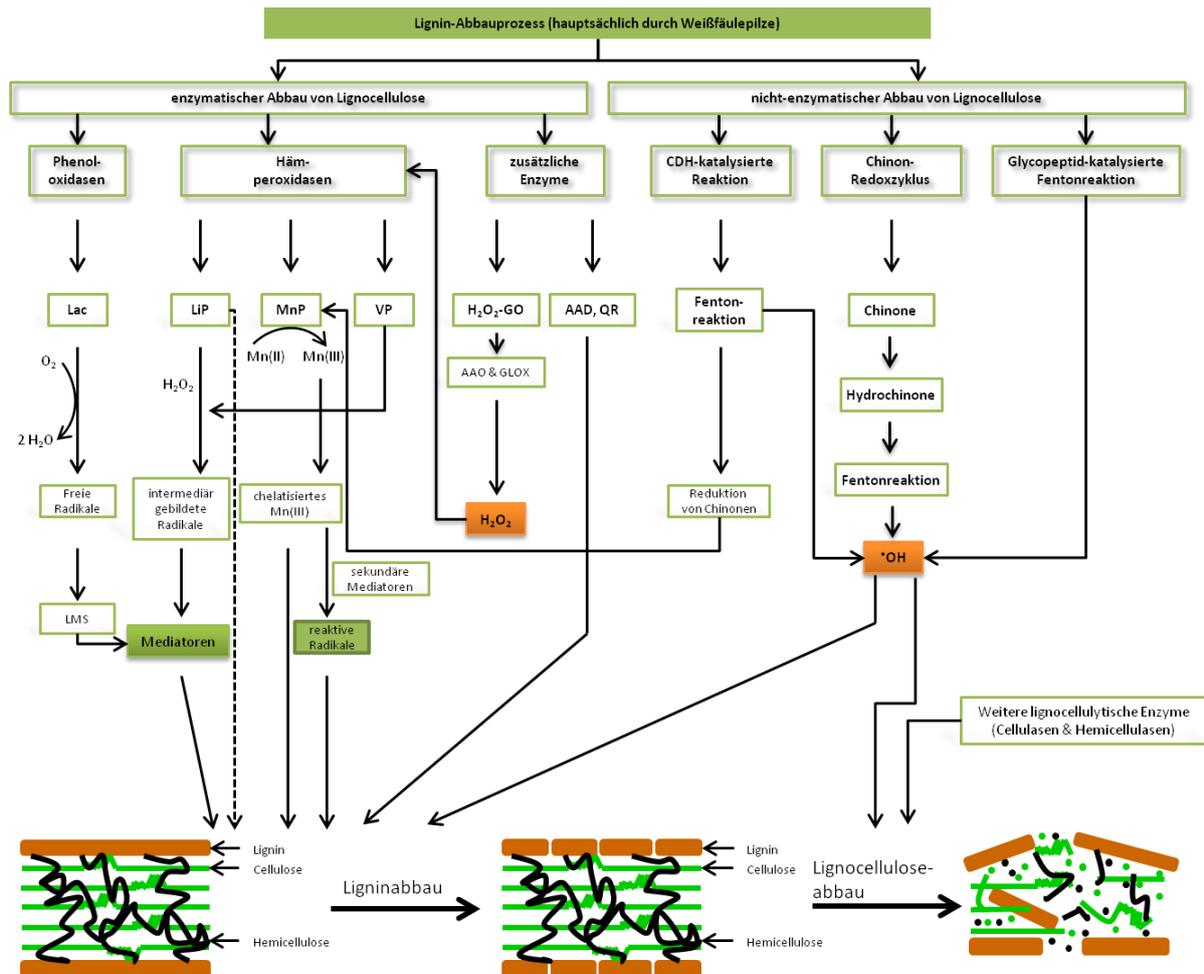


Abbildung 11: Enzymsystem der Weißfäulepilze nach [92]

(Lac: Laccase; LMS: Laccase-Mediator-System; LiP: Ligninperoxidase; MnP: Manganperoxidase; VP: versatile Peroxidase; H₂O₂-GO: H₂O₂-bildende Oxidase; AAO: Aryl-Alkohol Oxidase; GLOX: Glyoxal Oxidase; H₂O₂: Wasserstoffperoxid; AAD: Aryl-Alkohol-Dehydrogenase; QR: Chinon Reduktase; *OH: freie Hydroxylradikale; CDH: Cellobiose Dehydrogenase)

Nicht jeder Weißfäulepilz sezerniert alle ligninolytischen Enzyme. Die meisten Spezies produzieren Laccasen und Manganperoxidasen. Ligninperoxidasen werden von deutlich weniger Spezies ausgeschüttet. Aufgrund der unterschiedlichen Abbaumechanismen erfolgt der Ligninabbau daher meist durch verschiedene Enzyme, die sich gegenseitig unterstützen [93-95].

Neben dem enzymatischen Ligninabbau finden bei Weißfäulepilzen zusätzlich über Hydroxylradikale ablaufende nicht-enzymatische Abbauprozesse statt. Hierzu gehören Reaktionen, die durch das Enzym Cellobiose Dehydrogenase katalysiert werden, Glycopeptid-katalysierte Fentonreaktionen oder Fentonreaktionen, die auf dem Chinon-Redoxzyklus basieren [92,96,97].

2.2.2 Laccasen

Laccasen (EC 1.10.3.2; benzenediol:O₂ oxidoreductase) sind extrazelluläre kupferhaltige Glycoproteine mit einem Kohlenhydratanteil von 15 - 20 % [71]. Sie gehören zur Familie der "blauen Kupfer-Oxidase" [71,120]. Ihre Molekülmassen liegen zumeist bei 60-80 kDa [121]. Laccasen sind ubiquitär in allen Weißfäulepilzen zu finden und bauen Lignin meist in Synergie mit Ligninperoxidase und Manganperoxidase ab [122,123], wobei Laccasen üblicherweise vom Pilz als erste Enzyme in seine Umgebung sezerniert werden [119]. Im aktiven Zentrum des Enzyms sind vier Kupferatome lokalisiert, die im Grundzustand als Cu²⁺-Ionen vorliegen. In Abbildung 12 ist der katalytische Kreislauf der Laccasen schematisch dargestellt. Laccasen katalysieren die relativ unspezifische Oxidation phenolischer Verbindungen unter Bildung freier Phenoxyradikale [71].

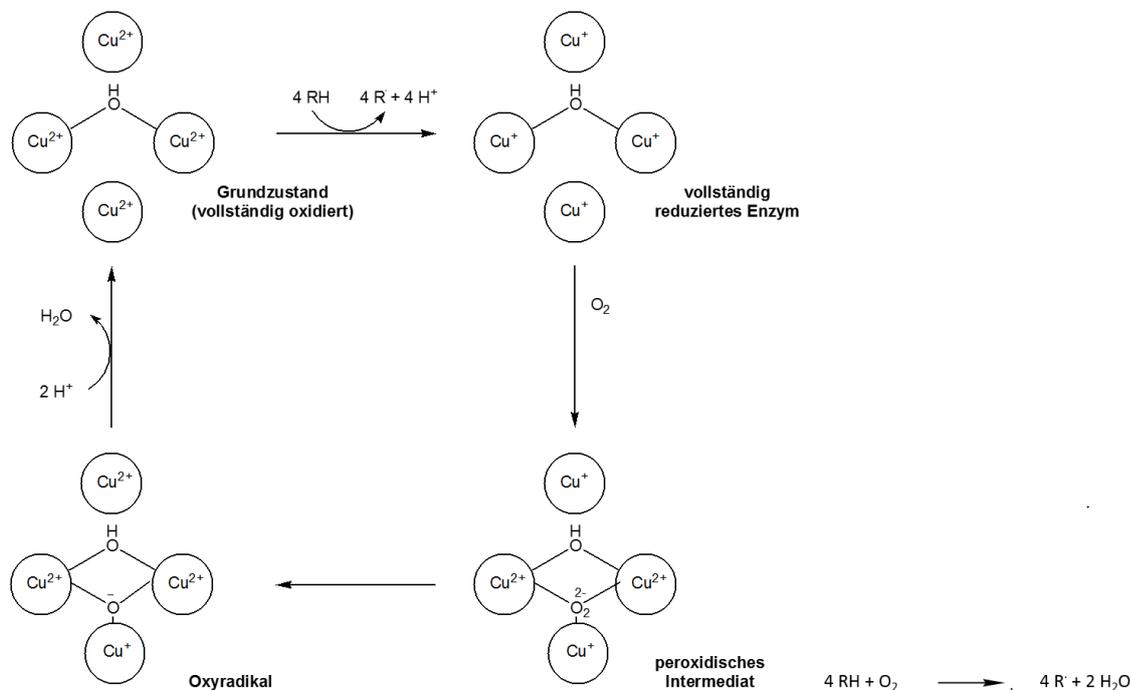


Abbildung 12: Schema des Katalysezyklus der Laccase nach [63]

Wegen der niedrigen Redoxpotentiale der Laccasen findet keine direkte Oxidation nicht-phenolischer Substrate statt [124]. Es sind verschiedene niedermolekulare organische Substanzen beschrieben, die als Mediatoren wirken. Hierzu gehören beispielsweise die künstlichen Mediatoren 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure (ABTS) sowie die natürliche, bereits in Weißfäulepilzen nachgewiesene, 3-Hydroxyanthranilsäure [124-130]. Abbildung 13 zeigt die Oxidation von HOBt und ABTS zum korrespondierenden Radikal bzw. Radikalkation.

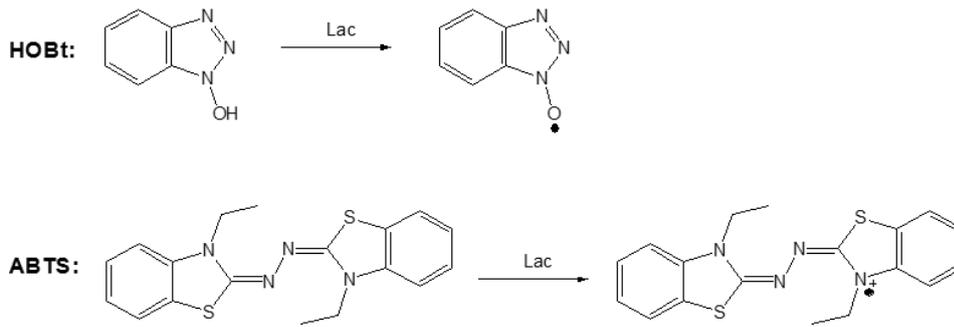


Abbildung 13: Oxidation von 1-HOBt (oben) und ABTS (unten) durch Laccasen nach [71,131]

Diese Redoxketten werden als Laccase-Mediator-Systeme (LMS) bezeichnet [124,128,132-134].

2.2.1 Ligninperoxidasen

Ligninperoxidasen (LiP; EC 1.11.1.14; 1,2-bis(3,4-dimethoxyphenyl)propane-1,3-diol: hydrogen-peroxide oxidoreductase) sind Häm-haltige Glycoproteine [66,93]. Sie katalysieren die H_2O_2 -abhängige oxidative Depolymerisierung einer Vielzahl von nicht-phenolischen und phenolischen Ligninkomponenten bis zu einem Redoxpotential von 1,4 V [71,98,99]. Der initiale Schritt der Depolymerisierung verläuft über einen mehrstufigen Elektronentransfer, bei dem es im letzten Schritt zur Radikalbildung am Substrat kommt (Abbildung 14) [71,100-102].

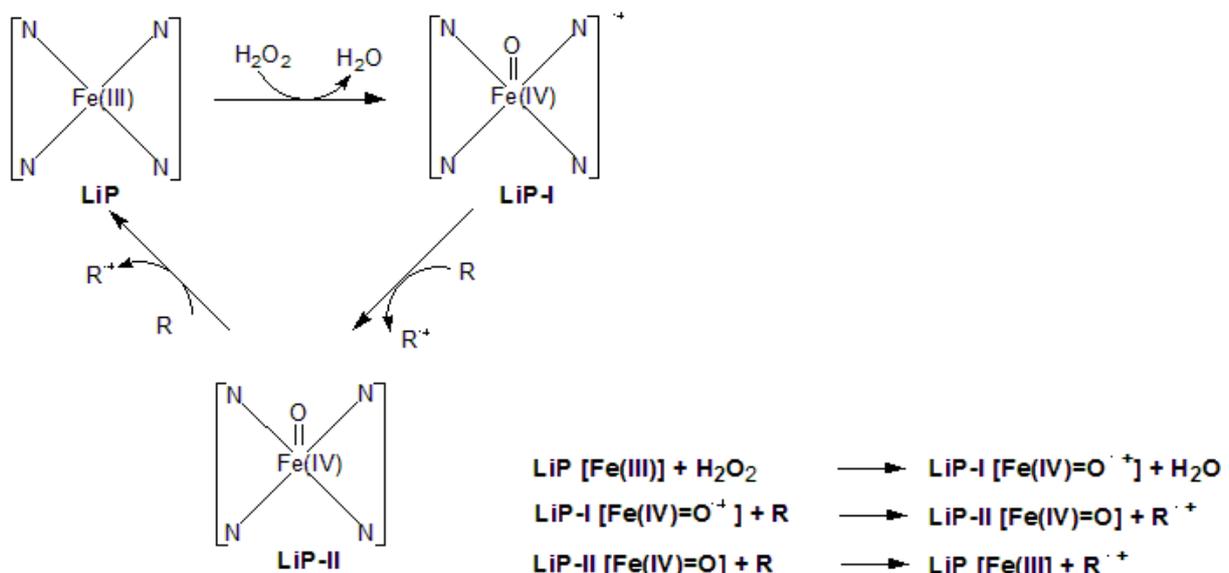


Abbildung 14: Schema des Katalysezyklus der Ligninperoxidasen nach [71]

[Fe(III)]: Dreiwertiges Häm-Eisen; [Fe(IV)=O⁺]: Radikalkationische Häm-Spezies; [Fe(IV)=O]: Oxyferryl-Intermediat des Häms; R: Substratmolekül; R⁺: Radikalkation des Substrats

Unter Spaltung von H_2O_2 bildet sich aus der nativen Form der Ligninperoxidase (LiP) die zweifach oxidierte Komponente LiP-I. Diese Komponente wird anschließend mittels zweier Ein-Elektronen-Transferprozesse über das Zwischenprodukt LiP-II zur Ausgangsform LiP

reduziert. Gleichzeitig werden zwei Substratmoleküle zu Radikalkationen oxidiert. Die gebildeten Radikale gehen nicht-enzymatische Reaktionen, wie z.B. radikalische Kopplungen und Polymerisationen, Spaltung von Seitenketten, Demethylierungen oder intramolekulare Additionen und Umlagerungen ein [71,81,100,103].

Entdeckt wurde die erste Ligninperoxidase 1983 im Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* [79,104,105]. Die Kristallstruktur konnte zehn Jahre später aufgeklärt werden [98,106]. Mittlerweile sind verschiedene Isoformen in diesem Pilz als auch in anderen Pilzspezies bekannt [66]. Diese weisen ein Molekulargewicht zwischen 38 und 46 kDa und einen pI zwischen 3,2 und 4,0 auf. Das pH-Optimum liegt mit 3,0 relativ niedrig [66,81].

Jedes Enzymmolekül enthält ein Eisenprotoporphyrin IX (Häm) als prosthetische Gruppe. Die Hämgruppe des Enzyms liegt verborgen im Inneren des Proteins. Sie ist über Kanäle mit dem äußeren Medium verbunden. Diese Kanäle sind zu klein, als dass das Ligninpolymer diese passieren könnte, sodass nur kleinere Moleküle die Bindungsstelle erreichen können. Das Ligninmolekül muss daher vorerst durch andere Enzyme, wie Manganperoxidasen oder Laccasen, degradiert werden, bevor die Ligninperoxidase den weiteren Abbau kleinerer Bruchstücke des Polymers katalysieren kann [98,99,105].

2.2.3 Manganperoxidasen

Manganperoxidasen (MnP; EC 1.11.1.13; Mn(II):hydrogen-peroxide oxidoreductase) sind extrazelluläre Glycoproteine, die ebenso wie Ligninperoxidasen, ein Eisenprotoporphyrin IX (Häm) als prosthetische Gruppe enthalten [71,92,93]. Sie weisen jedoch im Vergleich zu LiP eine zusätzliche fünfte Disulfidbrücke im Molekül auf, die entscheidend für die Ausbildung einer Bindungsstelle für Manganionen ist [71]. Somit katalysieren Manganperoxidasen ausschließlich die H₂O₂-abhängige Oxidation von Mn(II), das ubiquitär im Holz vorhanden ist, zu Mn(III), welches dann chelatisiert mit Oxalat oder anderen Chelatbildnern als ein reaktiver niedermolekularer und diffundierbarer Redoxmediator bei phenolischen Substraten wirkt und dafür von der Oberfläche des Enzyms abgegeben wird (Abbildung 15) [107].

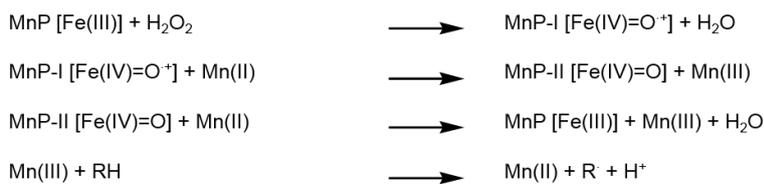


Abbildung 15: Schema der Katalyse der Manganperoxidasen nach [66]

[Fe(III)]: Dreiwertiges Häm-Eisen; [Fe(IV)=O⁺]: Radikalkationische Häm-Spezies; [Fe(IV)=O]: Oxyferryl-Intermediat des Häms; RH: Substratmolekül; R ·: Radikal des Substrats

Im ersten Schritt erfolgt die Oxidation des nativen Enzyms (MnP) mit H_2O_2 zur Komponente MnP-I. Diese Komponente oxidiert ein Mol Mn(II) zu Mn(III), wobei die Komponente MnP-II entsteht. Diese oxidiert wiederum ein Mol Mn(II), sodass das native Enzym zurückgebildet wird und somit in einem Katalysezyklus zwei Mol Mn(III) gebildet werden, die dann das eigentliche Substrat oxidieren [66]. Es wird davon ausgegangen, dass Manganperoxidasen eine entscheidende Rolle beim ersten Angriff auf das Lignin spielen. Dies liegt darin begründet, dass die im Gegensatz zum Enzym relativ kleinen Mn(III)-Ionen leicht in das Ligninpolymer hineindiffundieren können und zu ihrem Angriffsort vordringen können, sodass ein Abbau des Polymers erfolgen kann [107].

Chelatisierte Mn(III)-Ionen können aufgrund ihres geringen Oxidationspotentials ausschließliche phenolische Einheiten spalten. In Abbildung 16 ist die Spaltung einer phenolischen β -O-4-verknüpften Ligninmodellsubstanz dargestellt [71].

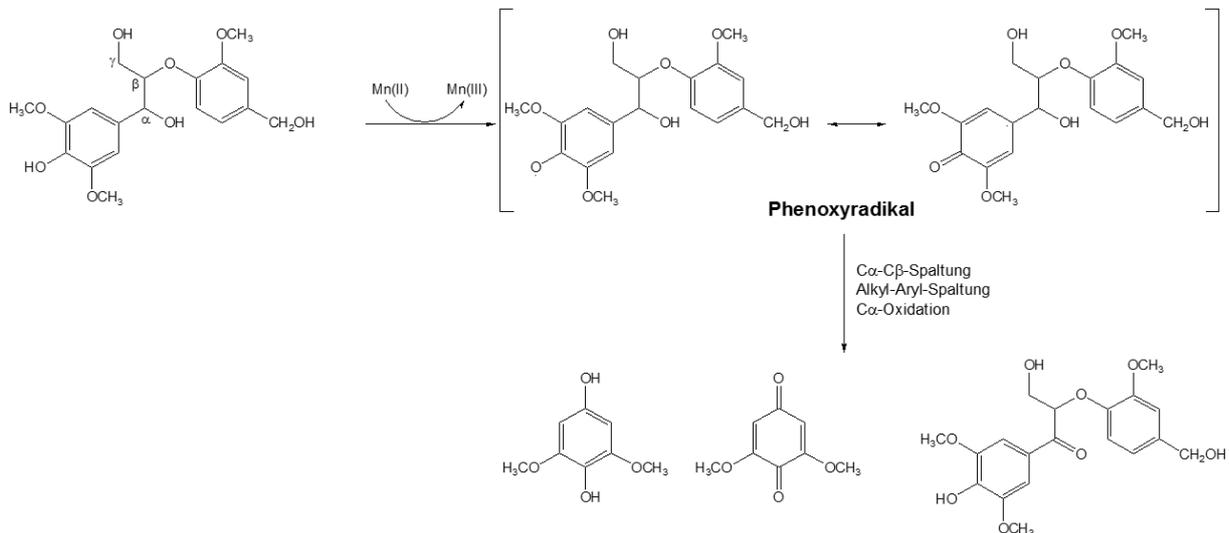


Abbildung 16: Manganperoxidase-katalysierte Spaltung einer phenolischen β -O-4-verknüpften Ligninmodellsubstanz nach [71]

Durch die Oxidation eines sekundären Mediators können auch nicht-phenolische Substrate oxidiert werden (Abbildung 17) [71,92,108,109]. Zu diesen Mediatoren zählen organische Säuren (Oxalat, Malonat), die zu Acetatradikalen, ($\text{COOH-C}\cdot\text{H}_2$), Peroxylradikalen ($\text{COOH-CH}_2\text{OO}\cdot$), Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und Formiatradikalen ($\text{CO}_2^{\cdot-}$) oxidiert werden oder zu Thiolen (z.B. Glutathion) umgesetzt werden [108-110]. In Abwesenheit von H_2O_2 können diese Radikale von der Manganperoxidase ebenfalls als Peroxidquelle verwendet werden [92,111].

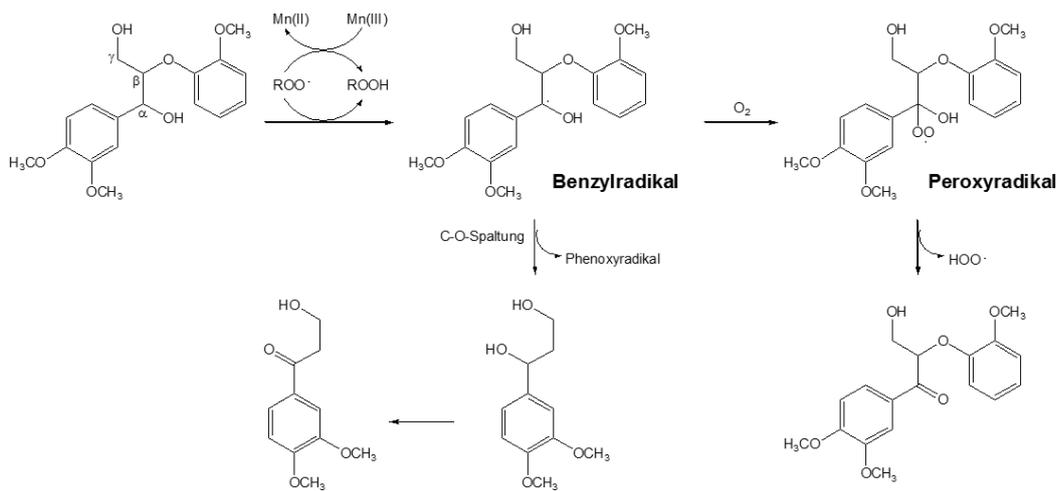


Abbildung 17: Manganperoxidase-katalysierte Spaltung einer nicht-phenolischen β -O-4-verknüpften Ligninmodellsubstanz nach [71]

Manganperoxidasen sind seit 1984 bekannt und wurden wie die Ligninperoxidasen im Weißfäulepilz *P. chrysosporium* entdeckt [112,113], sind aber seitdem auch in verschiedenen anderen Spezies nachgewiesen und charakterisiert worden [66,107]. Die Kristallstruktur wurde 1994 aufgeklärt [114]. Manganperoxidasen weisen Molekülmassen von 38 - 62,5 kDa, meist von etwa 45 kDa auf [107,115]. Ihr isoelektrischer Punkt (pI) und ihr pH-Optimum liegen im sauren Bereich [107,116].

2.2.4 Versatile Peroxidasen

Seit 1999 ist eine weitere Gruppe von Häm-haltigen Peroxidasen bekannt [117,118], bei denen es sich um Hybride aus Lignin- und Manganperoxidasen handelt, sodass die Eigenschaften beider Enzymgruppen in einem Enzym vereinigt sind. Sie können somit nicht-phenolische und phenolische Substrate sowie Mn(II) oxidieren. Diese Enzyme werden als versatile Peroxidasen (VP; EC 1.11.1.16) bezeichnet. Sie gleichen in ihrer Struktur eher den Ligninperoxidasen, weisen jedoch multiple Bindungsstellen auf [71,81,116,119].

2.3 Zellstoffgewinnung

Holz ist ein wichtiger Rohstoff in der Zellstoff- und Papierindustrie. So werden in Deutschland etwa 8 % des gewonnenen Rohholzes für die Zellstoff- und Papierherstellung genutzt. In anderen Ländern wie Skandinavien, Kanada und Brasilien ist der Anteil wesentlich größer. In der Zellstoff- und Papierindustrie werden dabei 20 % Rohholz und 80 % Sägereestholz verwendet [135]. Das Holz wird zu Holzchips zerhackt, die bei der Zellstoffherstellung verarbeitet werden. Die Chips sollten eine einheitliche Größe aufweisen, da die Prozessführung beim Aufschluss stark abhängig von der Chiplänge ist und die Ausbeute bei ungleichmäßigen Chips stark verringert wird. So führt eine Verdoppelung der Chipbreite zu vierfachen Imprägnier- bzw. Kochzeit [20,136-139].

Der Aufschluss des Holzes kann durch mechanische oder chemische Verfahren erfolgen, wobei das Ziel die Abtrennung der Cellulose (Zellstoff) von den anderen Holzbestandteilen ist. Hierbei erfolgt vor allem ein Abbau des Lignins, das dadurch in Lösung gebracht wird [20,138,140]. Beim mechanischen Aufschluss wird das Holz mit Wasserdampf oder wässriger Sulfitlösung vorbehandelt [20]. Danach erfolgt die mechanische Behandlung des Holzes durch rotierende Schleifsteine oder Scheibenrefiner unter Überdruck und bei erhöhter Temperatur unter Anwesenheit von Wasser. Hierbei wird sogenannter Holzstoff erhalten, der aus Fasern und nichtfaserigen Bestandteilen besteht, der in weiteren Schritten sortiert und gereinigt wird [135,136,139,141].

Der chemische Holzaufschluss beruht auf dem Abbau und der Auflösung von Lignin durch chemische Reaktionen bei erhöhter Temperatur (130 °C - 170 °C) und unter hohem Druck, wobei möglichst geringe Anteile der Cellulose und Hemicellulose in Lösung gebracht werden sollen. Damit die Fasern verwendet werden können, müssen 90 % des Lignins entfernt werden. Neben der Entfernung des Lignins werden auch Hemicellulosen und Cellulose teilweise abgebaut, sodass die Faserausbeute, abhängig vom verwendeten Holz und vom Kochprozess, bei 45 - 55 % liegt. Die Prozessführung muss daher so gestaltet werden, dass der Ligningehalt niedrig genug ist, sodass die Fasern abgetrennt werden können und gleichzeitig eine akzeptable Zellstoffausbeute erreicht wird. Die weitere Ligninentfernung aus dem gewonnenen Zellstoff erfolgt im Anschluss an den Kochprozess durch Bleichung [20,138,142]. Hierbei werden peroxidische Bleichmittel, Chlordioxid, Ozon, Sauerstoff oder Peressigsäure eingesetzt [139].

Beim chemischen Holzaufschluss werden verschiedene Verfahren angewendet. Das weltweit wichtigste Verfahren ist das Sulfatverfahren mit einem Anteil von 89 %. 5,3 % des Zellstoffs werden im Sulfitverfahren gewonnen. Einen geringeren Anteil machen das Sodaverfahren

sowie das Organosolv-Verfahren aus [20,135,139]. In Deutschland weist das Sulfitverfahren jedoch einen Marktanteil von 41 % (Stand 2009) auf [143].

Bei allen Aufschlussverfahren fallen neben dem Zellstoff die sogenannten Ablaugen an, die einen Trockenmassegehalt von etwa 14 - 18 % aufweisen. Hauptbestandteil dieser Ablaugen sind Abbauprodukte des Lignins, die durch die verwendeten Aufschlusschemikalien in Lösung gegangen sind. Die Ablaugen werden in einer Eindampfungsanlage bis zu einer Trockenmasse von ca. 62 - 64 % aufkonzentriert, um dann im Anschluss zur Energieerzeugung und zur Chemikalienrückgewinnung verbrannt zu werden [139,144].

2.3.1 Sulfatverfahren

Das Sulfatverfahren wird weltweit am häufigsten beim chemischen Holzaufschluss angewandt [20,139], da es für alle Holzarten geeignet ist und ein Zellstoff mit hoher Festigkeit entsteht. [139]. Aufgrund der hohen Festigkeit wird das Verfahren auch als „Kraftverfahren“ bezeichnet [139,145]. Weitere Vorteile dieses Prozesses sind kurze Aufschlusszeiten, eine effiziente Chemikalienrückgewinnung und die Toleranz gegenüber einem erheblichen Rindenanteil [145]. Nachteilig sind geringere Zellstoffausbeuten und eine aufwändigere Bleichung als beim Sulfitverfahren [139].

Der Aufschluss erfolgt mithilfe von Natronlauge und Natriumsulfid bei Temperaturen von 170 °C und einem Druck von 7 - 10 bar. Die reaktiven Spezies sind Hydroxid- (OH⁻) und Hydrogensulfidanionen (HS⁻) [20,72,136,139]. Der Prozess gliedert sich in drei Phasen, wobei in der ersten Phase (Anfangsphase) vor allem die α -Aryl- und β -Aryl-Etherbindungen in den phenolischen Einheiten des Lignins gespalten und Kohlenhydrate abgebaut werden. In der zweiten Phase (Hauptphase) liegt nur noch ein geringer Kohlenhydratabbau vor und es kommt zur Spaltung von β -Aryl-Bindungen in nicht-phenolischen Einheiten. Während der dritten Phase (Schlussphase) kommt es zum Abbau von 10 - 15 % der Bindungen im Lignin [20,139].

Während des Aufschlusses können prinzipiell zwei Reaktionstypen am Lignin ablaufen. Dies sind Spaltungen des Polymers in kleinere wasserlösliche Fragmente sowie Kondensationsreaktionen, bei denen alkalistabile Verknüpfungen entstehen [20,72].

Der Spaltungsprozess des Lignins während des Sulfataufschlusses ist in Abbildung 18 für eine phenolische β -O-4-Bindung dargestellt. Nach der Deprotonierung des Phenols zum Phenolat kommt es zur Abspaltung der α -Aryl-Etherbindung, sodass als Zwischenprodukt eine Chinonmethidstruktur entsteht. Danach kann eine nucleophile

Addition der HS⁻-Ionen an der α -Position der Seitenkette erfolgen, wobei ein α -Thiolation entsteht, das das β -C-Atom angreift. Dadurch kommt es zur Spaltung der β -O-4-Bindung und zur Ausbildung eines Thiirans, das unter Abspaltung von elementarem Schwefel eine Vinylarylverbindung ausbildet. Des Weiteren können Eliminierungsreaktionen auftreten. Dabei kommt es zur Freisetzung von Formaldehyd, das die Bildung von Diarylmethanen begünstigt [20,139,142,146].

Durch die Anwesenheit reduzierender Substanzen in der Kochlösung kann es außerdem zu Elektronentransferreaktionen kommen. Hierbei wird das Chinonmethid soweit reduziert, dass coniferyl-ähnliche Strukturen entstehen [20].

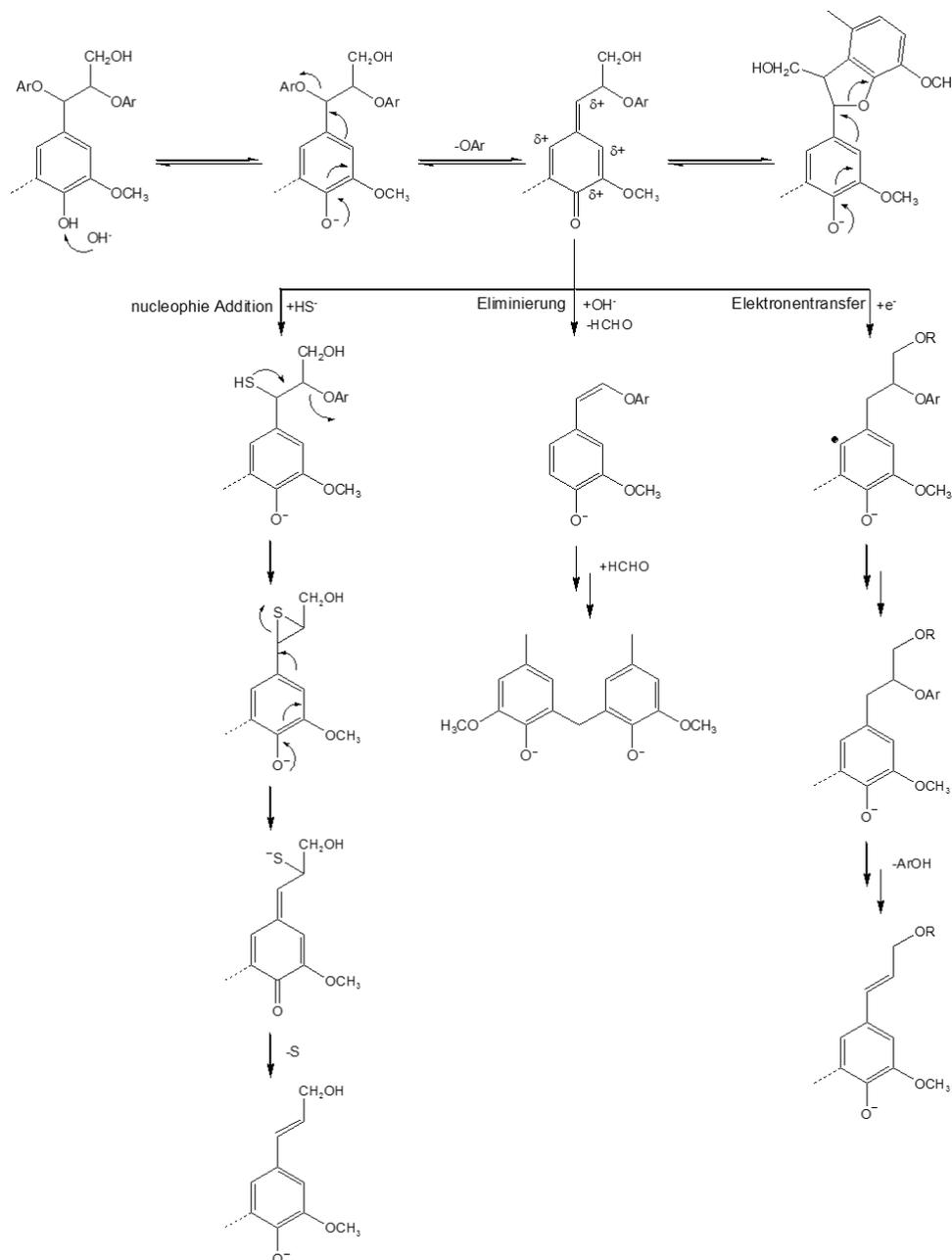


Abbildung 18: Reaktionen an phenolischen Gruppen des Lignins während des Sulfatprozesses nach [20]

Nicht-phenolische β -O-4-Bindungen können ebenfalls gespalten werden, jedoch ist die Reaktionsgeschwindigkeit wesentlich geringer [139]. Nach Ausbildung eines Epoxids, bei der es zur Spaltung des Moleküls kommt, sind zwei Reaktionswege möglich (Abbildung 19). Zum einen kann der Oxiranring durch einen nucleophilen Angriff von Hydroxyl- oder Hydrogensulfidanionen geöffnet werden (A). Zum anderen ist eine Ringöffnung durch Kohlenhydrate möglich, sodass es zur Ausbildung stabiler Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe (LCC) kommt (B) [20].

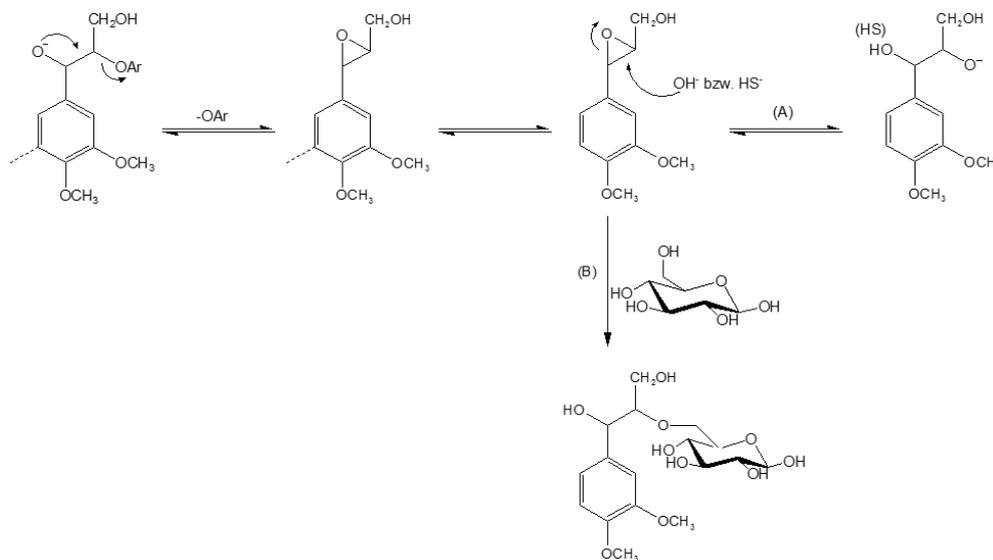


Abbildung 19: Reaktionen an nicht-phenolischen Gruppen des Lignins während des Sulfatprozesses nach [20]

Eine weitere wichtige Reaktion während des Kochprozesses ist die Demethylierung der Methoxygruppen, wobei es zur Ausbildung verschiedener leichtflüchtiger Schwefelverbindungen kommt (Abbildung 20), die für den spezifischen Geruch der Sulfatablaugen verantwortlich sind [20,139].

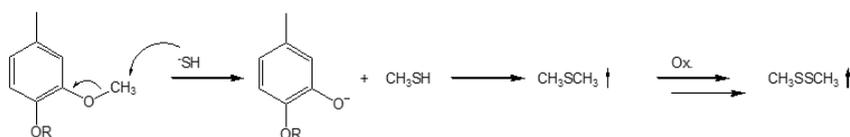


Abbildung 20: Demethylierung der Methoxygruppe im Lignin während des Sulfatprozesses nach [20]

Nach dem Aufschluss erfolgt die Abtrennung der Cellulosefasern von der Ablauge durch einen mehrstufigen Waschprozess. Nach Aufkonzentrierung der Ablauge auf einen Trockenmassegehalt von 68 – 70 % erfolgt die Verbrennung. Hierbei wird zum einen Energie gewonnen, die den Energiebedarf des Zellstoffwerkes deckt. Zum anderen erfolgt die Rückgewinnung der Kochchemikalien. Hierbei wird Natriumsulfat zu Natriumsulfid

reduziert, welches dann mit zugesetztem Natriumcarbonat eine Sodaschmelze ausbildet. Diese wird im Anschluss bei der Kaustifizierung mit Kalkmilch zu Natronlauge umgesetzt. Der Name Sulfatverfahren leitet sich vom Natriumsulfat ab, das bei der Chemikalienrückgewinnung zur Kompensation der Natrium- und Schwefelverluste eingesetzt wird. Das entstandene Calciumcarbonat wird im Anschluss zu Calciumoxid umgesetzt, das wiederum als Kalkmilch gelöst werden kann [139,147].

Die Ablauge, die direkt nach dem Kochprozess erhalten wird, wird als Schwarzlauge bezeichnet. Sie weist eine Trockenmasse von 14 - 18 % und einen pH-Wert von etwa 12 auf, der auf eine verbleibende Hydroxidkonzentration von ca. 0,25 mol/L zurückzuführen ist. Des Weiteren enthält die Schwarzlauge neben den Abbauprodukten des Lignins anorganische Komponenten, die auf die Kochchemikalien zurückzuführen sind, sowie geringe Anteile weiterer Holzkomponenten (Harze, Fettsäuren, Kohlenhydrate) [20,139].

Eine Abtrennung des Lignins aus der Sulfatablauge kann durch die Absenkung des pH-Werts erreicht werden [20].

Pro Jahr entstehen im Zuge des Sulfatverfahrens 50 Millionen t Lignin weltweit, wobei 98 - 99 % verbrannt und somit nicht stofflich genutzt werden [144].

2.3.2 Sulfitverfahren

Beim Sulfitverfahren, dem wichtigsten Verfahren bis zur Einführung des Sulfatverfahrens, erfolgt der Aufschluss des Holzes mit einer sulfithaltigen Kochchemikalie im sauren, neutralen oder alkalischen Milieu [140,144]. Der dominierende Prozess ist hierbei das saure Bisulfitverfahren, bei dem meist ein Gemisch aus Magnesiumbisulfit ($\text{Mg}(\text{HSO}_3)_2$) und schwefeliger Säure (H_2SO_3) als Kochsäure eingesetzt wird. Der pH-Wert der Kochsäure liegt zwischen 1,5 und 3,0 [20,137,139,144].

Nach Dämpfung und Imprägnierung der Hackschnitzel mit der Kochsäure findet der Kochprozess in einem Hochdrucksäurebehälter bei ca. 140 °C und einem Druck von 8 - 10 bar für sechs bis acht Stunden statt. Die Dämpfung erfolgt zur Austreibung von Wasser und Luft aus dem Holz, sodass die Imprägnierung wirksamer ist [137,139].

Abbildung 21 zeigt das Gleichgewicht von SO_2 in Wasser, das in der Kochlösung vorliegt. Das Gleichgewicht liegt beim sauren Bisulfitverfahren bei den reaktiven Spezies Bisulfitionen (HSO_3^-) und Wasserstoffionen (H^+). Diese Spezies lösen das Lignin durch Sulfonierung aus dem Faserverband heraus und es so in Lösung bringen.

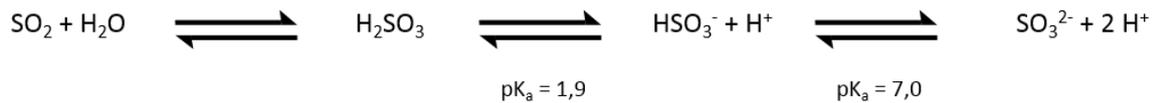


Abbildung 21: Gleichgewichtsreaktion von SO₂ in Wasser [20,54,137]

Durch die Einführung einer hydrophilen Sulfonsäuregruppe am *a*-C-Atom kommt es u.a. zur Fragmentierung von *a*-O-4-Bindungen (Abbildung 22) [20,139].

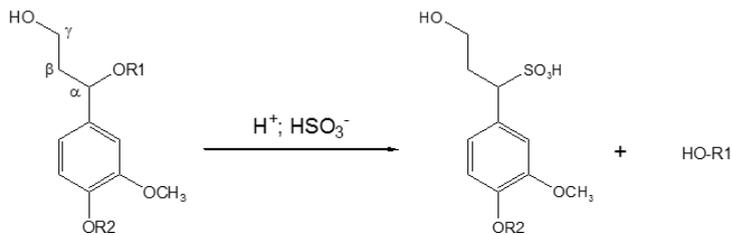


Abbildung 22: Fragmentierung des Lignins während des Sulfitprozesses nach [139]

Ebenso kommt es zu Sulfonierungen von *a*-Carbonylgruppen und aldehydischen Endgruppen in γ -Position. Die entstehenden Ligninabbauprodukte werden daher als Ligninsulfonate bezeichnet. Des Weiteren sind aber Kondensationsreaktionen am *a*-C-Atom möglich [139,146]. Die β -O-4-Verknüpfung ist unter sauren Bedingungen etwas stabiler als die *a*-O-4-Verknüpfung und wird daher kaum durch Sulfonierung gespalten [20]. Es treten jedoch häufig hydrolytische Spaltungen dieser Bindung auf [144].

Aufgrund der sauren Prozessbedingungen kommt es neben dem Ligninabbau durch Hydrolyse der O-glycosidischen Verknüpfungen in den Hemicellulosen und in der Cellulose zum Herauslösen der Hemicellulosen und zur Verkürzung der Celluloseketten. Hierbei spielen die Chemikaliendosierung und die Temperaturführung eine zentrale Rolle im Kochprozess, da die Aktivierungsenergien für die Lignin- und die Kohlenhydratherauslösung unterschiedlich sind. Somit können diese Vorgänge durch Veränderungen in der Reaktionstemperatur beeinflusst werden, da der Kohlenhydratabbau bei hohen Temperaturen stärker beschleunigt wird als die Degradation des Lignins [137,139,140].

Die beim Sulfitverfahren erhaltene Ablauge enthält somit im Gegensatz zur Ablauge aus dem Sulfatverfahren neben den Ligninsulfonaten einen hohen Gehalt an Monosacchariden. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der beiden Ablaugen ist in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6: Zusammensetzung einer Fichtenablage [140]
 Anteile bezogen auf die Trockenmasse

Sulfitablage		Sulfatablage	
Ligninsulfonate	52 %	Kraftlignin	41 %
Poly- und Oligosaccharide	6 %	Hydroxysäuren und Lactone	28 %
Aldonsäuren	4 %	Natrium	16 %
Zuckersulfonate	3 %	Essigsäure	5 %
Extraktstoffe	3 %	Ameisensäure	3 %
Essigsäure	2 %	Schwefel	3 %
Glucuronsäure	1 %	Extraktstoffe	3 %
Methanol	1 %	Methanol	1 %
Monosaccharide	23 %		
Mannose	11 %		
Xylose	5 %		
Galactose	3 %		
Glucose	3 %		
Arabinose	1 %		

Des Weiteren beeinflusst die Temperatur während des Kochprozesses die Wasserstoffionenkonzentration sowie die Löslichkeit von SO_2 , sodass es bei einer Temperaturerhöhung zu einer Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration und damit zu einer Erhöhung des pH-Werts kommt. Außerdem verringert sich die Löslichkeit des SO_2 , wodurch der SO_2 -Druck über der Kochlösung ansteigt. So kann es zur Bildung nicht herauslösbarer Kondensationsprodukte des Lignins kommen, wenn das SO_2 ins Holz eindringt und dort eine hohe lokale Acidität erzeugt [137].

Nach Eindampfen der Ablage bis zu einer Trockenmasse von 62 - 64 %, erfolgt die Verbrennung. Hierbei werden die Kochchemikalien als MgO und SO_2 zurückgewonnen. Mg^{2+} -Verluste werden durch Zugabe von MgO ausgeglichen, während durch die Verbrennung von elementarem Schwefel SO_2 -Verluste kompensiert werden [20,137,139].

Im Gegensatz zum Sulfatverfahren können beim Sulfitverfahren nicht alle Holzarten eingesetzt werden. Für das Verfahren sind nur die Hölzer von Fichte, Tanne, Hemlock, Buche, Eukalyptus, Pappel und Birke geeignet. Bei anderen Hölzern stört der hohe Anteil phenolischer Verbindungen (z.B. Pinosylvin) den Holzaufschluss, da diese mit dem Lignin unlösliche Kondensationsprodukte bilden. Des Weiteren dürfen im Sulfitprozess nur vollständig entrindete Hölzer eingesetzt werden [137,139].

Sulfitzellstoffe zeichnen sich im Gegensatz zu Sulfatzellstoffen durch relativ hohe Ausbeuten und gute Bleichbarkeit aus, während Zellstoffe aus dem Sulfatverfahren eine höhere Festigkeit aufweisen [137,139].

2.3.3 Weitere Aufschlussverfahren

In der Zellstoff- und Papierindustrie werden neben den schwefelhaltigen Prozessen auch Aufschlüsse ohne Schwefelkomponenten angewandt. Das Sodaverfahren spielt als ältester Aufschluss nur noch eine untergeordnete Rolle [138]. Ebenso wie beim Sulfatverfahren dient NaOH als Kochchemikalie, jedoch werden keine schwefelhaltigen Verbindungen zum Aufschluss eingesetzt [145]. Das Verfahren wird heutzutage ausschließlich für den Aufschluss von einjährigen Pflanzen (Rohrzucker, Flachs, Getreide) verwendet, da das Verfahren nicht so effektiv wie der Sulfat- oder der Sulfitprozess beim Aufschluss von Holz ist [144].

Mit dem Begriff Organosolv-Verfahren wird eine Gruppe von Holzaufschlüssen zusammengefasst bei denen niedrig-siedende organische Lösungsmittel verwendet werden. Meist werden 50 %ige wässrige Alkohollösungen (Methanol oder Ethanol), organische Säuren (Ameisen-, Essigsäure) sowie Gemische aus organischen Lösungsmitteln mit anorganischen, alkalischen Chemikalien eingesetzt. Der Aufschluss erfolgt ebenfalls bei hohen Temperaturen (170 - 200 °C) und bei erhöhtem Druck [72,144]. Die Organosolv-Verfahren konnten sich als Alternative für die konventionellen Verfahren bisher nicht durchsetzen, da das Sulfit- und das Sulfatverfahren über viele Jahre optimiert wurden. Somit ist das Ziel von Organosolv-Verfahren heute nicht die Gewinnung des Zellstoffs, sondern eine vollständige Nutzung des nachwachsenden Rohstoffs Lignocellulose in einer Bioraffinerie. Es werden relativ reine Lignine erhalten, die frei von Schwefel sind. Des Weiteren entfällt eine aufwendige Chemikalienrückgewinnung [148].

2.3.4 Stoffliche Nutzung von Lignin

Durch die Zellstoffindustrie fallen jährlich etwa 50 Millionen t Lignin an, wovon zur Zeit lediglich 1 - 2 % stofflich genutzt werden [144,149]. Aufgrund ihrer weiten Größenverteilung (wenige hundert bis hin zu 19000 Dalton und größer) und ihrer physikalischen Eigenschaften (Wasserlöslichkeit über einen großen pH-Bereich, oberflächenaktiv, dispergierend) werden vor allem Ligninsulfonate vielfältig verwendet. Tabelle 7 zeigt verschiedene industrielle Anwendungen der Ligninabbauprodukte.

Tabelle 7: Stoffliche Nutzung von Lignin [144,148,150-152]

Anwendung	Anwendungsbereich
Dispergiermittel	Beton Zement Farben und Lacke
Bindemittel/Trägerstoff	Pellets für <ul style="list-style-type: none"> - Futtermittel - Düngemittel - Agrochemikalien - Spanplatten
Aromastoffe	Gewinnung von Vanillin
Spritzguss	Biowerkstoffe/ Polymere Werkstoffe
Zuschlagstoff	Gips Gerbstoffe
Additive	Carbonfasern (Nanotubes) Batterien
Kondensationspartner für Polymere	Phenol-Formaldehyd-Harze

Nach aktuellem Stand der Technik werden die in der Papier- und Zellstoffindustrie anfallenden Ablaugen, die eine Trockenmasse von 14 - 18 % aufweisen, jedoch nahezu ausschließlich der energetischen Nutzung durch Verbrennung zugeführt. Die Verbrennung kann allerdings erst nach einer Aufkonzentrierung der Ablaugen bis zu einer Trockenmasse von 62 - 64 % erfolgen. Im Zuge der Verbrennung werden die Kochchemikalien weitestgehend zurückgewonnen [139,153].

Bei diesem Prozess wird elektrische Energie gewonnen, die in das öffentliche Netz eingespeist wird. Durch die Einspeisung von Strom erneuerbarer Quellen ins Stromnetz werden nach Erneuerbare-Energien-Gesetz feste Einspeisevergütungen an den Erzeuger entrichtet. Anschließend wird der Strom zur Deckung des eigenen Energiebedarfs für die Zellstoffproduktion wieder eingekauft.

Trotz der gut etablierten Chemikalienrückgewinnung und der Energieerzeugung bei der Verbrennung der eingedickten Ablagen ist der hohe Energiebedarf, der bei der Eindickung der Ablagen als Verdampfungswärme notwendig ist, kritisch zu bewerten [153].

Unter der Annahme, dass 100 kg Ablage mit einer Trockenmasse von 15 %, die nach Verlassen des Kochers eine Temperatur von 80 °C aufweist, auf eine Trockenmasse von 60 % eingedampft werden, sodass 75 kg Wasser entfernt werden, ergibt sich aus der Wärme- und der Verdampfungswärme ein Energieaufwand von

$$\Delta Q = c \cdot m_1 \cdot \Delta T + r \cdot m_2$$

$$\Delta Q = 4,2 \frac{\text{kJ}}{\text{kg} \cdot \text{K}} \cdot 100 \text{ kg} \cdot 20\text{K} + 2257 \frac{\text{kJ}}{\text{kg}} \cdot 75\text{kg}$$

$$\Delta Q = 8400 \text{ kJ} + 169275\text{kJ} = 177,7 \text{ MJ}$$

ΔQ : Wärmeenergie [MJ]

c: spezifische Wärmekapazität von Wasser [kJ]/(kg · K)]

m_1 : zu erhitzende Wassermenge [kg]

m_2 : zu verdampfende Wassermenge [kg]

ΔT : Temperaturdifferenz von 80 °C (353 K) bis zum Sieden (373 K) [K]

r: spezifische Verdampfungsenthalpie [kJ/kg]

Somit werden für die Aufkonzentrierung von 100 kg Prozessablage 177,7 MJ benötigt.

Der Heizwert von wasserfreiem Lignin beträgt 26 MJ/kg. Durch die hohen Verdampfungsenergien, die notwendig sind, liegt der Heizwert der eingedickten Ablagen jedoch nur noch bei ca. 17 MJ/kg [153].

Damit liegt der Heizwert der eingedickten Ablage im Bereich des Heizwertes von luftgetrockneten Hölzern. Die Verbrennung von Kraftstoffen, die aus nachwachsenden Rohstoffen hergestellt werden, liefern wesentlich höhere Energiemengen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Heizwerte von Sulfatablage und weiteren Brennstoffen [154,155]

Brennstoff	Heizwert [MJ/kg]
Buchenholz -lufttrocken-	14,7
Fichtenholz -lufttrocken-	15,0
Rapsöl	37,6
Biodiesel	37,1
Biogas	18,2
Bioethanol	26,7

2.4 Einsatz von Weißfäulepilzen und deren Enzymen in der Zellstoff- und Papierindustrie

Der selektive Abbau von Lignin im Holz ist vor allem für die Zellstoff- und Papierindustrie von großem Interesse [66].

Dieser wird in der Natur von Weißfäulepilzen gewährleistet, die mithilfe ihres Enzymsystem in der Lage sind Lignin in kleinere Bruchstücke abzubauen, während die Cellulose- und Hemicellulosefasern weitgehend intakt bleiben. Somit kommen Weißfäulepilze oder deren Enzyme als Alternative für mechanische und chemische Holzaufschlüsse, Zellstoffbleichungen sowie weitere Anwendungen in Betracht [156].

Weißfäulepilze wurden bereits mehrfach zur Vorbehandlung von Holzchips vor dem chemischen oder mechanischen Aufschluss eingesetzt. Dieser Prozess wird als Biopulping bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass Aufschlusschemikalien bei derartigen Prozessen ersetzt bzw. eingespart werden können. Weitere wichtige Faktoren sind die Einsparung von Energie sowie eine Erhöhung der Papierstärke, da die Cellulosefasern nicht so stark angegriffen werden. Eine vollständig biologische Delignifizierung zur Zellstoffgewinnung konnte bisher noch nicht erreicht werden [156-158].

Der Einsatz ligninolytischer Enzyme erfolgt bisher nur zur Bleichung von Zellstoff. Dieser Prozess wird als Biobleaching bezeichnet. Hierbei kommen sowohl Manganperoxidasen als auch Laccase-Mediator-Systeme (LMS) zum Einsatz [124,133,156,158,159]. So konnte die Menge an Wasserstoffperoxid bei der Bleichung mit einem LMS um den Faktor 3-4 gesenkt werden [159].

Vorteile des Biobleachings gegenüber anderen Bleichmitteln wie Chlor, Sauerstoff, Wasserstoffperoxid und Ozon sind die Bildung umweltfreundlicher Abbauprodukte, eine gute Kosteneffizienz sowie eine einfache Anwendung [159]. Meist erfolgt der Einsatz von LMS in Synergie mit Xylanasen, sodass bessere Resultate erreicht werden [156,159].

Neben dem Biobleaching werden Laccase-Mediator-Systeme außerdem zur Entharzung des Zellstoffes, zur Zellstoffveredelung, zur Entfernung von Druckerfarben in Altpapier und zur Entfärbung und Entgiftung von Prozessabwässern der Zellstoff- und Papierindustrie eingesetzt [159].

Bei der Entharzung erfolgt der Abbau lipophiler Extraktstoffe, die im Holz enthalten sind und beim Aufschluss im Zellstoff verbleiben. Hierbei handelt es sich um Fettsäuren, Fettalkohole, Harzsäuren, Steroide und Triglyceride, die die Wasseraufnahmefähigkeit des Zellstoffes nachteilig beeinflussen und zur Bildung von Löchern und Rissen im Zellstoff führen [151,157,159]. Im Zuge der Zellstoffveredelung erfolgt eine Funktionalisierung des Zellstoffes

zur Erhöhung der Hydrophobizität. Bei Entfärbungs- und Entgiftungsprozessen erfolgt ein Abbau dieser Substanzen zu ungefärbten, nicht-toxischen Verbindungen [159].

3 Problemstellung und Zielsetzung

Lignin stellt neben Cellulose das zweithäufigste Biopolymer in der Natur dar. Die geschätzte „Jahresproduktion“ der Natur liegt bei ca. 2×10^{10} t. Trotz dieser hohen Bio-Synthese-Leistung und somit auch hoher Verfügbarkeit, werden Lignin bzw. dessen Abbauprodukte in Form von Ablaugen aus der Zellstoffindustrie nur in einem sehr eingeschränkten Maß genutzt [142].

Lignin bietet jedoch aufgrund seines einzigartigen Aufbaus eine interessante Quelle für aromatische Verbindungen aus nachwachsenden Rohstoffen. Um eine Nutzung der Aromaten des Lignins zu gewährleisten, muss das Ligninpolymer in kleinere Bruchstücke, bevorzugt in Monomere, gespalten werden. Aufgrund der hohen Stabilität des Polymers gegen den Einfluss von Chemikalien, bietet sich hier der Einsatz ligninolytischer Enzyme der Weißfäulepilze an.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen verschiedene Weißfäulepilze auf ligninhaltigen Medien kultiviert werden und somit zur Ausschüttung der Enzyme angeregt werden. Als Ligninkomponenten für die Anzuchtmedien kommen sowohl Holz als auch Ablaugen verschiedener Zellstoffgewinnungsverfahren in Frage.

Nach erfolgreicher Anzucht der Pilzmycelien sollen diese im Anschluss in Flüssigmedien kultiviert werden, die den zuvor verwendeten Anzuchtbedingungen entsprechen. Die Medien sollen auf ausgeschüttete ligninolytische Enzyme untersucht werden, die dann im Anschluss aus den Medien isoliert werden sollen. Hierbei müssen etablierte Aufreinigungsschritte an das verwendete Medium angepasst werden.

Nach der erfolgreichen Isolierung und Aufreinigung der isolierten Enzyme erfolgt die Charakterisierung der Enzyme. Die Charakterisierung umfasst die Abschätzung der Molekularmasse sowie die Bestimmung des isoelektrischen Punktes durch gelelektrophoretische Methoden. Des Weiteren werden mittels photometrischer Assays die kinetischen Parameter und der Einfluss des pH-Werts, der Temperatur sowie potentieller Inhibitor- und Metallsalzlösungen auf die Enzymaktivität untersucht.

Im Anschluss sollen verschiedene dimere Ligninmodellsubstanzen biokatalytisch mit besonders leistungsfähigen und robusten Enzyme gespalten werden. Die Modellsubstanzen weisen die Hauptbindungstypen, die im Ligninpolymer zu finden sind, auf und sollen durch die zuvor isolierten und charakterisierten Enzyme zu monomere Bausteinen gespalten werden. Die Charakterisierung der niedermolekularen Spaltprodukte erfolgt dabei durch comprehensive zweidimensionale Gaschromatographie gekoppelt mit einem Flugzeitmassenspektrometer (GCxGC-(ToF)MS).

Abschließend soll eine Inkubation verschiedener Prozessabläufe aus der Zellstoff- und Papierindustrie mit denselben Enzymen erfolgen. Aufgrund der komplexen Matrix sollen die inkubierten Lösungen zum einen mittels Flüssigchromatographie mit Diodenarray-Detektor (HPLC-DAD) auf Veränderungen im Retentionsverhalten untersucht werden, um erste Anhaltspunkte zu erhalten, ob die Enzyme Veränderungen der Ligninabbauprodukte katalysiert haben. Mittels GCxGC-(ToF)MS sollen dann monomere aromatische Verbindungen, die durch katalytische Spaltung der Ligninderivate gebildet wurden, identifiziert werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Optimierung des Anzuchtmediums für Pilzmycelien

Lignin wird in der Natur effizient von verschiedenen Weißfäulepilzen mittels Enzymen abgebaut. Es ist in Form von Abbauprodukten bzw. Derivaten in Ablaugen aus der Zellstoff- und Papierindustrie enthalten.

Daher sollten diese Ablaugen dazu verwendet werden, Weißfäulepilze zur Ausschüttung ligninolytischer Enzyme in ein ablaugehaltiges Flüssigmedium anzuregen.

Die Verwendung von Prozessablaugen aus der Zellstoff- und Papierindustrie stellt eine Neuerung bei der Kultivierung und Anregung der Enzymausschüttung von Weißfäulepilzen dar. Im Vergleich zu anderen Nährmedien, die bisher zur Anregung der Peroxidase- und Laccaseproduktion der Weißfäulepilze eingesetzt wurden, sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Nährmedien weniger komplex zusammengesetzt und somit relativ kostengünstig.

Durch die Anwesenheit der Ligninabbauprodukte, verschiedener Mineralstoffe und eines hohen Kohlenhydratanteils, ist lediglich die Zugabe einer Stickstoffquelle notwendig. Aufgrund der enthaltenen Ligninabbauprodukte werden die Pilze dazu angeregt, ligninolytische Enzyme auszuschütten, die im Anschluss aus dem Medium isoliert werden können.

Grundvoraussetzung für die Expression ligninolytischer Enzyme in Flüssigmedien, die Ablaugen aus der Zellstoff- und Papierindustrie enthalten, ist die Fähigkeit des eingesetzten Pilzes, auf diesen Medien zu wachsen.

Anhand von Wachstumsversuchen auf Agarplatten und der damit verbundenen Ermittlung der Wachstumskinetik lässt sich die optimale Zusammensetzung des Nährmediums ermitteln. Bei den zur Verfügung stehenden Ablaugen handelte es sich um eine Ablauge aus dem Sulfatverfahren („Schwarzlauge“) sowie um eine eingedickte Ablauge aus dem Sulfitverfahren („Dicklauge“). Zu näheren Angaben über die verwendeten Ablaugen wird auf Kapitel 7.3.1 verwiesen.

Aufgrund der sehr guten Wasserlöslichkeit der Dicklauge über einen weiten pH-Bereich wurde diese Ablauge in einem Konzentrationsbereich von 1 % bis 5 % (bezogen auf die Trockenmasse) als Lignin-Komponente im Nährmedium für die Anzucht der Pilzmycelien ausgewählt.

Die Verwendung der Schwarzlauge erwies sich als ungeeignet, da das Lignin beim Ansäuern aus der alkalischen Ablauge ausfällt und somit nicht homogen im Anzuchtmedien verteilt ist.

Ein weiterer Vorteil der Dickklauge ist der relativ hohe Kohlenhydratanteil von ca. 30 % (bezogen auf die Trockenmasse). Daher konnte auf eine zusätzliche Kohlenstoffquelle im Medium verzichtet werden. Die Kohlenhydrate liegen in Form von Monosacchariden in der Ablauge vor und können somit vom Pilz direkt aufgenommen werden, sodass keine Enzyme zum Abbau von Poly- oder Oligosacchariden ausgeschüttet werden müssen.

Des Weiteren ist die Zugabe einer Stickstoffquelle notwendig, um das Wachstum der Pilzmycelien anzuregen, bevor es zur Verwertung des Lignins kommt. Als Stickstoffquelle wurde daher Pepton mit einer Konzentration von 10 g/L für die ersten Anzuchtversuche verwendet. Der pH-Wert der Medien wurde auf 5,6 eingestellt, da die vorhandenen Pilzkulturen auf einem Malz-/Hefeextrakt-Medium vorkultiviert wurden, das diesen pH-Wert aufwies. Das Malz-/Hefeextrakt-Medium wurde in vorangegangenen Arbeiten für die vorhandenen Pilzkulturen optimiert [160].

Für die Kultivierung auf ligninhaltigen Agarplatten wurden stellvertretend für die im Arbeitskreis vorliegenden Weißfäulepilze fünf Vertreter ausgewählt (*A. brasiliensis*, *C. maxima*, *C. viscosa*, *P. ostreatus*, *T. versicolor*).

4.1.1 Variation der Dickklaugekonzentration

Abbildung 23 zeigt die Wachstumskinetiken der Pilze *C. maxima* und *C. viscosa* auf Agarplatten mit einer Dickklaugekonzentrationen von 1 - 5 % bezogen auf die Trockenmasse und einer Peptonkonzentration von 10 g/L bei einem pH-Wert von 5,6. Die Wachstumskurven der anderen Pilze sind im Anhang dargestellt.

Bei *C. maxima* wurde ebenso wie bei *A. brasiliensis*, *P. ostreatus* und *T. versicolor* ab einer Dickklaugekonzentration von 3 % eine deutliche Hemmung des Pilzmycelwachstums beobachtet. Die Konzentration der Dickklauge im Medium zeigte im betrachteten Konzentrationsbereich (1 - 5 %) keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von *C. viscosa*.

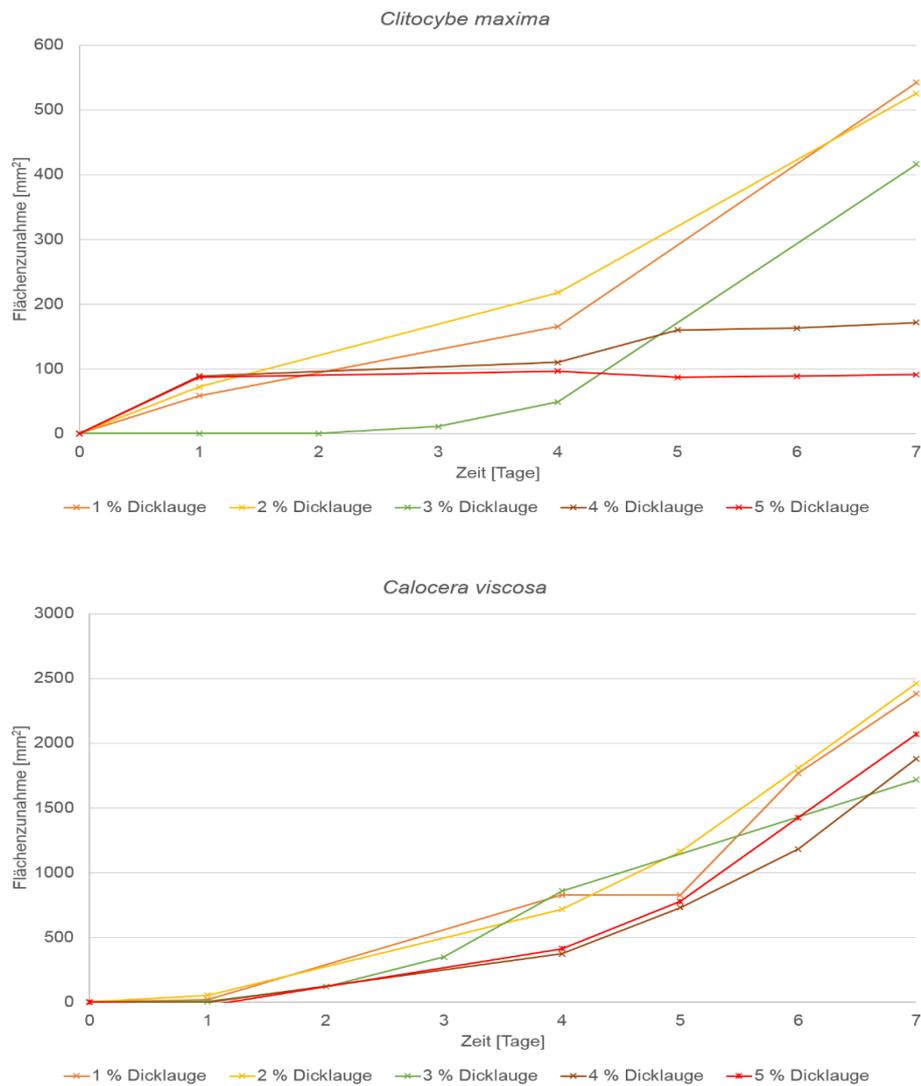


Abbildung 23: Wachstumskinetiken von *C. maxima* (oben) und *C. viscosa* (unten) bei verschiedenen Dicklaugenkonzentrationen

Für die weitere Kultivierung der Pilze wurde daher eine Konzentration von 2,5 % Dicklauge verwendet, sodass mit Blick auf die Enzymexpression der Pilze genügend Ligninabbauprodukte enthalten sind, um die Expression zu induzieren, aber auch sichergestellt ist, dass der Gehalt an inhibierenden Substanzen (Thiole, Sulfide etc.) gering genug ist, um ein Mycelienwachstum zu gewährleisten.

4.1.2 Variation der Stickstoffquelle

In Bezug auf die enthaltene Stickstoffquelle wurden weitere Wachstumsversuche mit unterschiedlichen stickstoffhaltigen Zusätzen durchgeführt. Als Stickstoffgehalt wurde eine Konzentration von 1,6 g/L verwendet. Die Wachstumskinetiken von *C. maxima* und *C. viscosa* mit unterschiedlichen Stickstoffquellen sind in Abbildung 24 dargestellt.

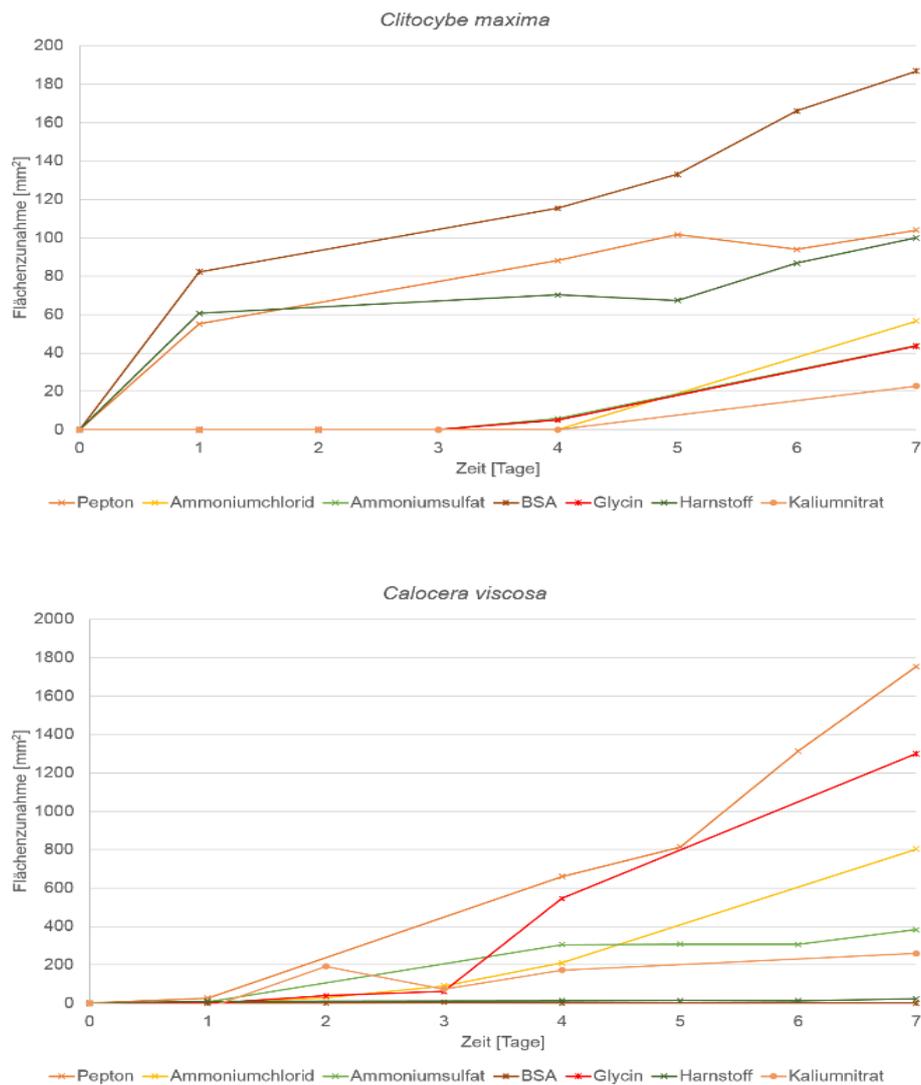


Abbildung 24: Wachstumskinetiken von *C. maxima* (oben) und *C. viscosa* (unten) mit verschiedenen Stickstoffquellen

Es wurde festgestellt, dass eine komplexe organische Quelle wie Pepton einen größeren positiven Einfluss auf das Wachstum der Pilze hat, als eine einfache organische Quelle (z.B. Glycin, Harnstoff) oder eine anorganische Stickstoffquelle (Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat, Kaliumnitrat). Diese Beobachtung steht im Einklang zu den Ergebnissen von Boyle et al. [161], die zeigten, dass komplexe Stickstoffquellen das Wachstum der Pilze *Flammulina velutipes* und *Lentinula edodes* signifikant steigern, während mit einfachen Quellen

wesentlich geringere Wachstumsraten erreicht werden konnten. Mit Rinderserumalbumin (BSA) wurde bei *A. brasiliensis*, *C. maxima*, *P. ostreatus* und *T. versicolor* eine gute Wachstumsrate beobachtet. *C. viscosa* zeigte auf diesem Medium jedoch nur geringes Wachstum. Somit sind BSA und Pepton als Stickstoffquellen in Anzuchtmedien, die als Ligninkomponente Ablaugen aus dem Sulfidverfahren enthalten, sehr gut geeignet. Aufgrund der Koagulation von BSA bei der Sterilisierung der Medien im Autoklav wurde Pepton als Stickstoffquelle ausgewählt.

4.1.3 Variation der Peptonkonzentration

Der Einfluss der Konzentration des Peptons auf das Wachstum von *C. maxima* und *C. viscosa* ist in Abbildung 25 dargestellt.

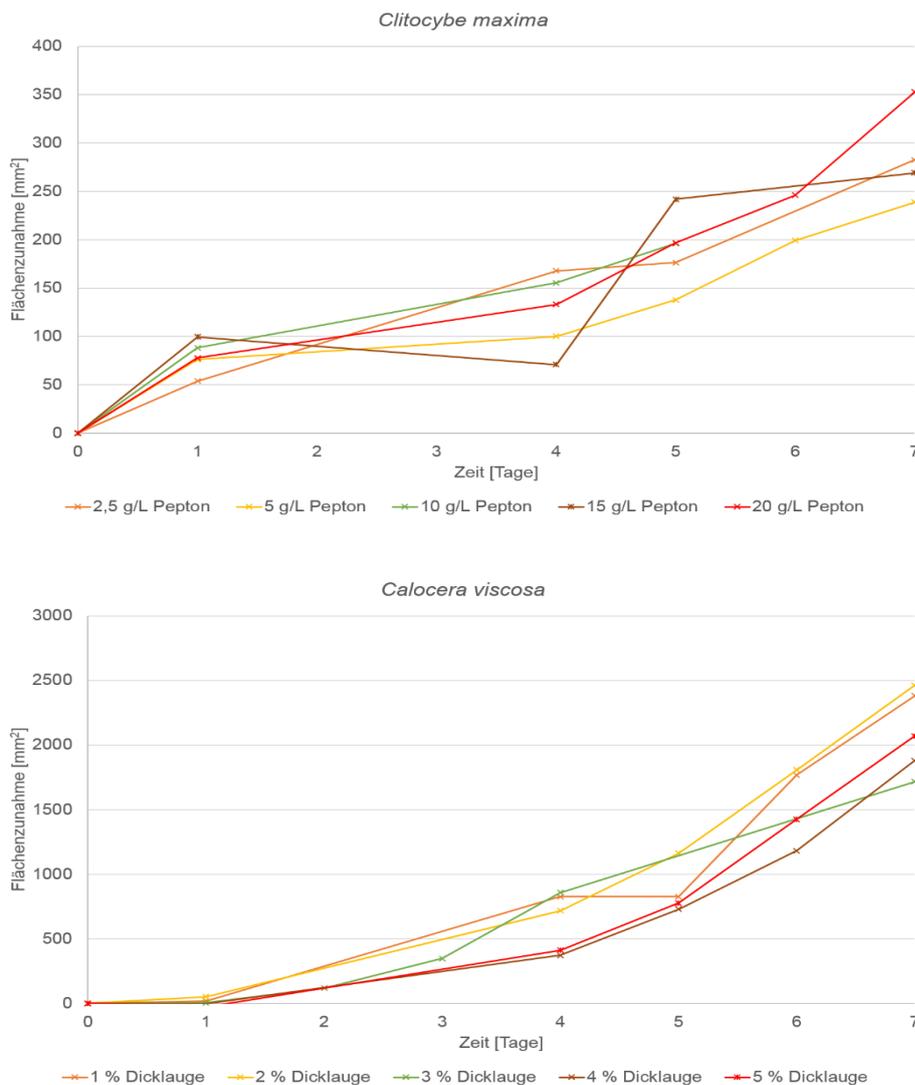


Abbildung 25: Wachstumskinetiken von *C. maxima* (oben) und *C. viscosa* (unten) bei verschiedenen Peptongehalten

Die Konzentration des Peptons hat nur einen geringen Einfluss auf das Wachstum der Weißfäulepilze, sodass die in Tabelle 9 dargestellte Zusammensetzung der Anzuchtmedien für die Kultivierung als auch für das Laborscreening und die Gewinnung von ligninolytischen Enzymen gewählt wurde.

Tabelle 9: Zusammensetzung des „Anzuchtmedium Dicklauge“

„Anzuchtmedium Dicklauge“	
Dicklauge	2,5 % (bezogen auf die Trockenmasse)
Pepton	10 g/L
pH	5,6

4.2 Laborscreening auf ligninolytische Aktivität

Im Rahmen eines Laborscreenings wurden verschiedene Mycelkulturen in Flüssigmedien („Anzuchtmedium Dicklauge“) kultiviert und auf die Ausschüttung ligninolytischer Enzyme mittels ABTS-Assay (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure-Assay) untersucht (vgl. Kapitel 7.5.1) [162]. Dieser Enzymtest kann zur Unterscheidung zwischen Laccasen und Peroxidasen eingesetzt werden. Während Laccasen Sauerstoff zur Oxidation des Substrates ABTS benötigen, muss bei der Oxidation mit Peroxidasen Wasserstoffperoxid zur Aktivierung des Enzyms zugegeben werden (vgl. Kapitel 2.2). Die Unterscheidung zwischen Peroxidasen (Ligninperoxidasen, Manganperoxidasen) durch den Mn(II)-malonat-Assay (vgl. Kapitel 7.5.3) [163] vorgenommen werden, da nur Manganperoxidasen das eingesetzte Mn(II)-malonat zum detektierten Mn(III)-malonat oxidieren können.

Das Wachstumsverhalten auf festen Nährmedien ist hierbei auf Flüssigkulturen übertragbar und hat den Vorteil, dass ligninolytische Enzyme vom Pilzmycel direkt ins Flüssigmedium abgegeben werden und somit durch einfache Probenahme mittels steriler Pipette Enzymtests vorgenommen werden können. Die Inkubation der Pilzmycelien auf den „Anzuchtmedien Dicklauge“ führte bei zehn von 18 Pilzmycelien zur Ausschüttung von ligninolytischen Enzymen. Dabei konnte ausschließlich bei *C. viscosa* eine Manganperoxidase-Aktivität nachgewiesen werden, während es sich bei den Enzymen der anderen Mycelien um Laccasen handelt. Ligninperoxidasen wurden im Zuge des Laborscreenings nicht nachgewiesen.

Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Weißfäulepilze, die im Rahmen des Laborscreenings ligninolytische Enzyme ausgeschüttet haben sowie über den Zeitpunkt der höchsten Enzymaktivität.

Tabelle 10: Übersicht über das Laborscreening (Lac: Laccaseaktivität; MnP: Manganperoxidaseaktivität)
 *erhöhter Dicklaugengehalt: 3,75 % (bezogen auf die Trockenmasse)

Weißfäulepilz		Enzym	maximale Aktivität	
<i>Agaricus bisporus</i>	Champignon	-	-	-
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Brasil. Mandelegerling	Lac	Tag 63	1178 U/L
<i>Bovista plumbea</i>	Bleigrauer Zwergbovist	-	-	-
<i>Clitocybe maxima</i>	Riesentrichterling	Lac	Tag 52	472 U/L
<i>Calocera viscosa</i>	Klebriger Hörnling	MnP	Tag 34	1032 U/L
<i>Flammulina velutipes</i>	Samtfußrübling	-	-	-
<i>Gandoderma lucidum</i>	Glänzender Lackporling	-	-	-
<i>Grifola frondosa</i>	Klapperschwamm	Lac	Tag 22	1143 U/L
<i>Hericiium coralloides</i>	Astiger Stachelbart	Lac	Tag 37	50 U/L
<i>Hericiium erinaceus</i>	Igelstachelbart*	Lac	Tag 21	31 U/L
<i>Hypsizygus tessulatus</i>	Buchenrasling „Schimeji“	Lac	Tag 58	84 U/L
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	Gemeines Stockschwämmchen	-	-	-
<i>Lentinula edodes</i>	Shiitake	-	-	-
<i>Morchella esculenta</i>	Speisemorchel	-	-	-
<i>Pleurotus eryngii</i>	Kräuterseitling	Lac	Tag 75	569 U/L
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Austernseitling	Lac	Tag 26	1326 U/L
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Lungenseitling	-	-	-
<i>Trametes versicolor</i>	Schmetterlingstramete	Lac	Tag 35	676 U/L

4.2.1 Auswirkungen der Kupfer(II)-Zugabe zum „Anzuchtmedium Dicklauge“

Laccasen weisen in ihrem aktiven Zentrum vier Kupferatome auf, die im Grundzustand als Cu^{2+} -Ionen vorliegen (vgl. Kapitel 2.2.2). Die Zugabe von Kupfer(II)-salzen zum „Anzuchtmedium Dicklauge“ führte jedoch nicht zur vermehrten Ausschüttung ligninolytischer Enzyme in das Medium während der Inkubation (Abbildung 26).

Vielmehr wird eine verzögerte Enzymausschüttung beobachtet, die ihr Maximum elf Tage später erreicht als im „Anzuchtmedium Dicklauge“. Des Weiteren ist die maximale Volumenaktivität im Nährmedium, dem ein Kupfer(II)-Salz zugesetzt wurde, geringer. Somit bewirkt eine Cu^{2+} -Zugabe während der Anzucht eine Hemmung der Enzyymbildung.

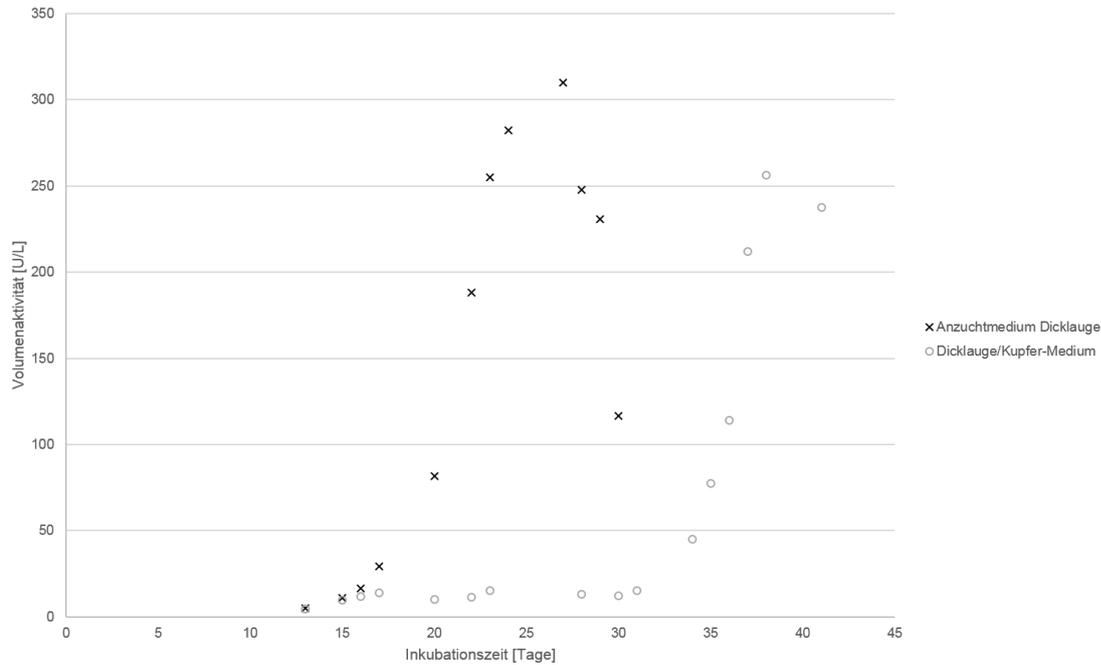


Abbildung 26: Vergleich der Anzuchtmedien „Anzuchtmedium Dickklauge“ und Dickklauge/Kupfer-Medium bei der Anzucht von *C. maxima*

4.2.2 Auswirkungen der Mangan(II)-Zugabe zum „Anzuchtmedium Dickklauge“

Manganperoxidasen katalysieren die Oxidation von Mangan(II) zu Mangan(III). Es wurde daher überprüft, ob die Zugabe eines Mangan(II)-salzes die Ausschüttung der Manganperoxidase in das Medium erhöht.

Abbildung 27 zeigt die Enzymaktivitäten der Manganperoxidase von *C. viscosa* im „Anzuchtmedium Dickklauge“ und in einem Medium, das zusätzlich ein Mn(II)-Salz enthielt. Ein Zusatz von Mn^{2+} zum Anzuchtmedium führte zu keiner erhöhten Ausschüttung der Manganperoxidase. Innerhalb der ersten 25 Tage wurden in beiden Medien nahezu dieselben Enzymaktivitäten gemessen. Im „Anzuchtmedium Dickklauge“ wurden jedoch in den folgenden Tagen um bis zu 58 % höhere Enzymaktivitäten erreicht. Somit konnte durch Zugabe von Mn(II)-Salzen zum Anzuchtmedium keine erhöhte Enzymausschüttung erzielt werden.

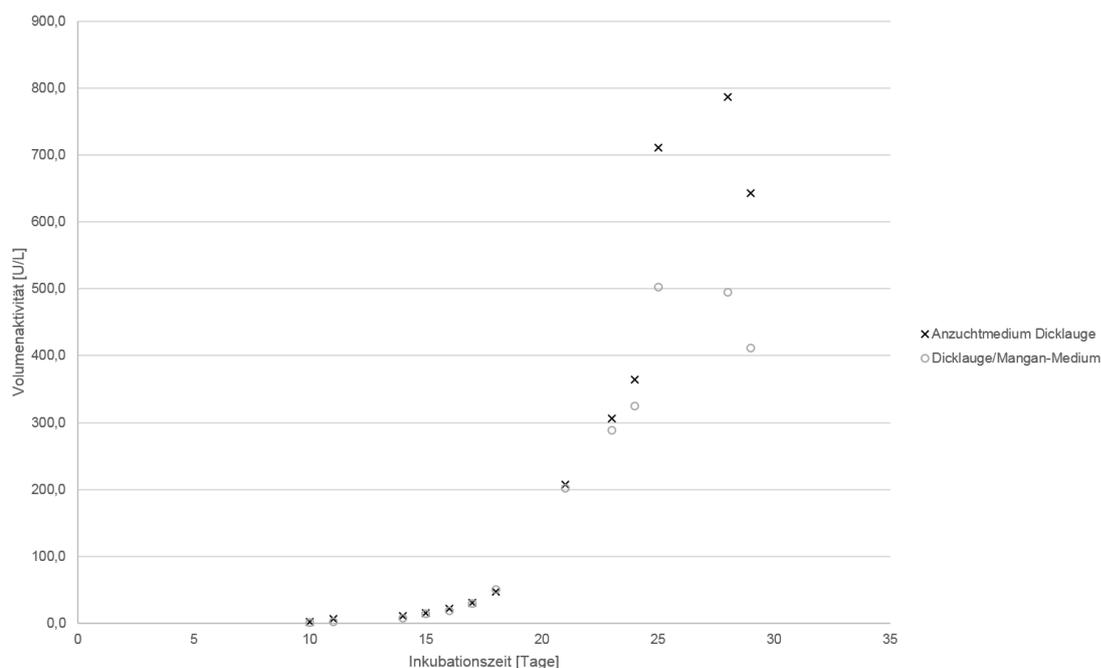


Abbildung 27: Vergleich der Anzuchtmedien „Anzuchtmedium Dicklauge“ und Dicklauge/Mangan-Medium bei der Anzucht von *C. viscosa*

4.2.3 Zusammenhang zwischen Enzyausschüttung und Zuckerabbau

Während des Laborscreenings konnte festgestellt werden, dass die Pilzmycelien in den ersten Tagen nach der Inkubation Biomasse im Nährmedium bilden, obwohl keine ligninolytische Aktivität gemessen werden konnte. Daher lag die Vermutung nahe, dass die Bildung von Biomasse auf der Verwertung der Monosaccharide aus der Ablauge beruht. Bei den Monosacchariden handelt es sich um Abbauprodukte der Hemicellulosen (vgl. Kapitel 2.1.2), sodass die C5-Zucker L-Arabinose und D-Xylose, die C6-Zucker D-Glucose, D-Galactose und D-Mannose sowie der Desoxyzucker L-Rhamnose in der Dicklauge vorliegen. Die Zuckergehalte im Nährmedium vom Tag der Animpfung (100%-Referenz) bis zum Beginn der Enzyausschüttung sind für das Mycel von *C. viscosa* in Abbildung 28 dargestellt. Ebenfalls wird die bestimmte Enzymaktivität gezeigt.

Es ist ersichtlich, dass ein Zusammenhang zwischen dem Abbau der Monosaccharide und der Ausschüttung von Enzymen besteht. Dabei zeigt sich ein sukzessiver Abbau der Monosaccharide. Der Pilz beginnt mit der Verwertung der C6-Zucker (D-Glucose, D-Mannose, D-Galactose). Danach werden die C5-Zucker (L-Arabinose, D-Xylose) verstoffwechselt, bevor schließlich der Desoxyzucker (L-Rhamnose) abgebaut wird. Sobald nur noch ein geringer Zuckergehalt im Nährmedium vorliegt, schüttet der Pilz ligninolytische Enzyme aus, um die Ligninabbauprodukte abzubauen und zu verwerten.

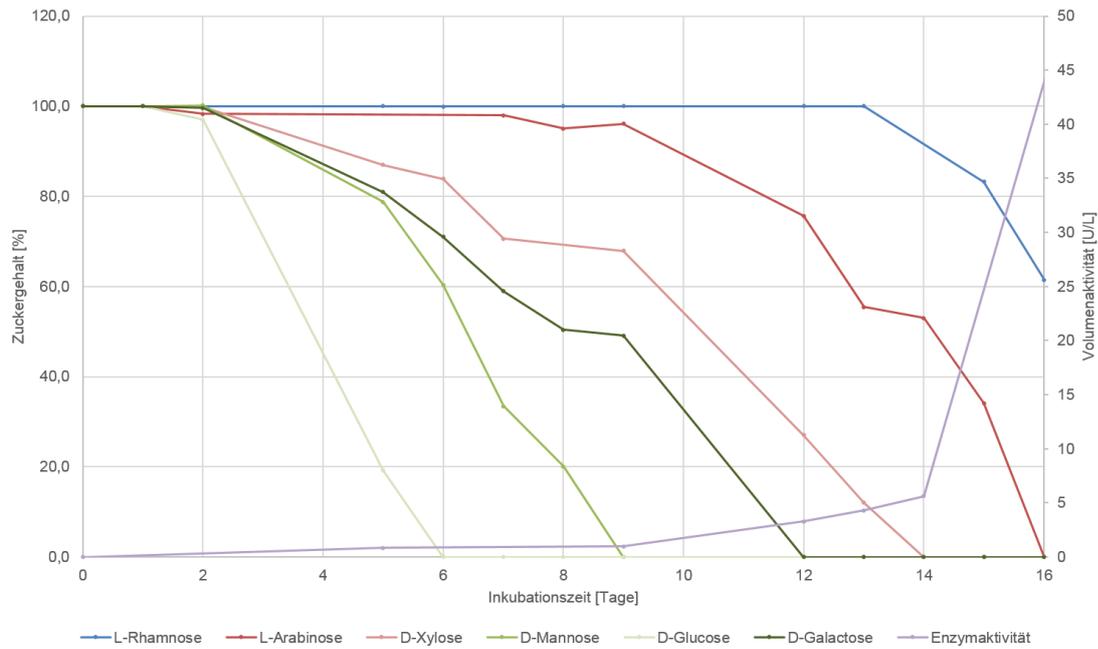


Abbildung 28: Zusammenhang zwischen dem Abbau der Monosaccharide und der Ausschüttung von ligninolytischen Enzymen im Nährmedium von *C. viscosa*

4.2.4 Vergleich der Enzymausschüttung zwischen der Anzucht auf dem „Anzuchtmedium Dickklauge“ und auf Holzspänen

Das „Anzuchtmedium Dickklauge“ bewirkt die Ausschüttung ligninolytischer Enzyme durch verschiedene Weißfäulepilze. Das Pilzmycel von *C. viscosa* zeigte während der Anzucht ligninolytische Aktivität, die auf die Anwesenheit einer oder mehrerer Manganperoxidasen schließen lässt. Hier stellte sich die Frage, ob die Anzucht des Pilzmycels auf einem Anzuchtmedium, das Holzspäne enthält, ebenfalls aufgrund des im Holz enthaltenen Lignins zur Ausschüttung ligninolytischer Enzyme führt. Daher wurden in Wasser suspendierte Buchenspäne mit dem Pilzmycel von *C. viscosa* inkubiert.

Abbildung 29 zeigt den Verlauf der Enzymaktivität während der Inkubation des Pilzmycels auf Buchenspänen im Vergleich zur Enzymaktivität im „Anzuchtmedium Dickklauge“.

Das Pilzmycel von *C. viscosa* auf Buchenspänen exprimiert bereits nach sieben Tagen eine Peroxidase, die am 14. Tag die maximale Aktivität von 50 U/L zeigt. In den folgenden Tagen geht die Aktivität bis zum 21. Tag auf 0 U/L zurück, während es auf dem „Anzuchtmedium Dickklauge“ erst ab dem 21. Tag zur Enzymausschüttung kommt, deren Aktivität dann bis zum 34. Tag auf das Maximum von 1032 U/L ansteigt. Bei der Anzucht auf Holz werden ebenfalls keine Laccasen oder Ligninperoxidasen ausgeschüttet.

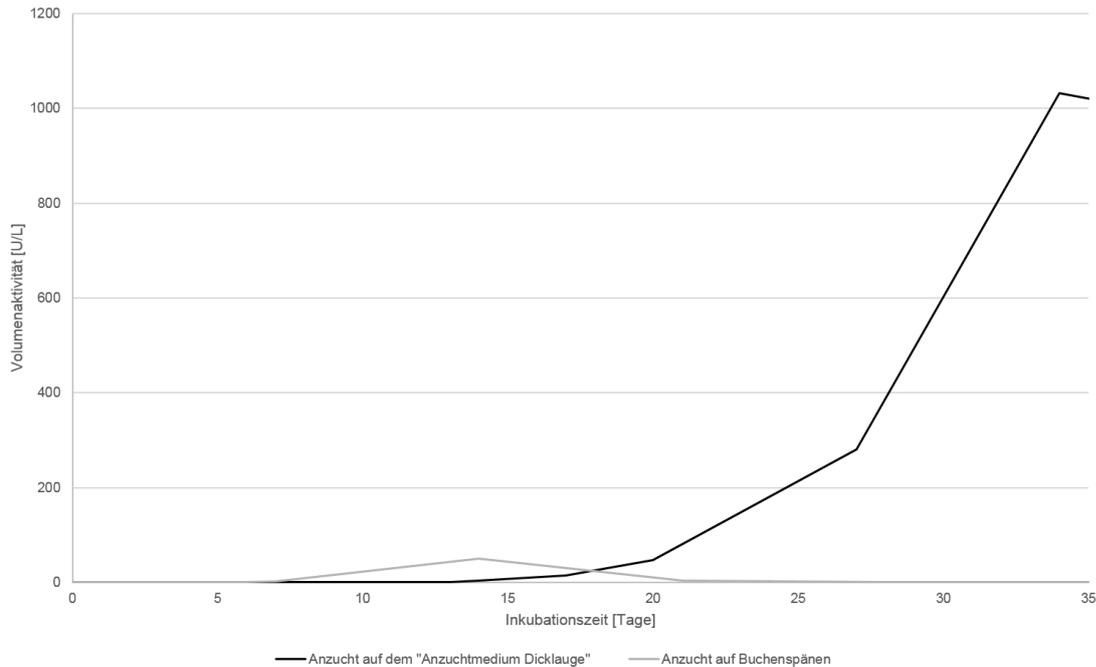


Abbildung 29: Vergleich der Enzymaktivitäten bei der Anzucht von *C. viscosa* auf dem „Anzuchtmedium Dicklauge“ und auf Buchenspänen

Es wird daher davon ausgegangen, dass der Pilz bei der Anzucht auf Buchenspänen aufgrund des vielfältigen Nährstoffangebots (Cellulose, Hemicellulose) Biomasse bildet, aber nicht zwingend auf Lignin oder Ligninfragmente als Energiequelle angewiesen ist und sich daher vor allem auf die Verstoffwechslung von Polysaccharide beschränkt. Liegen keine Polysaccharide im Medium vor, so ist das Pilzmycelium auf die Verwertung von Lignin angewiesen, sodass ligninolytische Enzyme in größerer Menge ausgeschüttet werden.

4.3 Entwicklung eines Protokolls zur Isolierung und Aufreinigung der ligninolytischen Enzyme

Die Kultivierung der Weißfäulepilze auf einem Anzuchtmedium, das Ablaugen aus der Zellstoff- und Papierindustrie enthält, stellt besondere Anforderungen an die Isolierung und Aufreinigung der ausgeschütteten Enzyme aus diesem Medium.

Eine große Herausforderung stellt dabei die Abtrennung der tief-braunen Ligninabbauprodukte dar. Daher wurde eine Aufarbeitung entwickelt, mit der es möglich ist, die Enzyme nahezu vollständig aus dem Nährmedium zu isolieren. Zur Gewährleistung einer optimalen Aufarbeitung und damit geringer Verluste der Enzymaktivität wurden die Enzymaktivität sowie der Proteingehalt nach jedem Aufarbeitungsschritt bestimmt.

Im Gegensatz zur Verwendung von Anzuchtmedien, die Holzspäne enthalten oder relativ komplex aufgebaut sind und somit neben den ligninolytischen Enzymen ein Enzymcocktail,

bestehend aus Cellulasen, Hemicellulasen, Peptidasen und weiteren Enzymen, von den Pilzen ausgeschüttet wird, werden in den hier verwendeten Medien aufgrund der enthaltenen Zucker, die als Monosaccharide vorliegen und den Ligninabbauprodukten ausschließlich ligninolytische Enzyme exprimiert. Dies erleichtert die Aufreinigung der Enzyme erheblich. Die Entwicklung eines Aufreinigungsprotokolls für ligninolytische Enzyme erfolgte anhand der Laccase von *C. maxima*. Abbildung 30 zeigt die Volumenaktivität der Laccase während der Anzucht auf dem „Anzuchtmedium Dickklauge“.

Nach Erreichen des Aktivitätsmaximums (Tag 63) erfolgte die Isolierung des Enzyms aus dem Anzuchtmedium. Das Enzym sollte dabei von allen Komponenten des Nährmediums abgetrennt werden.

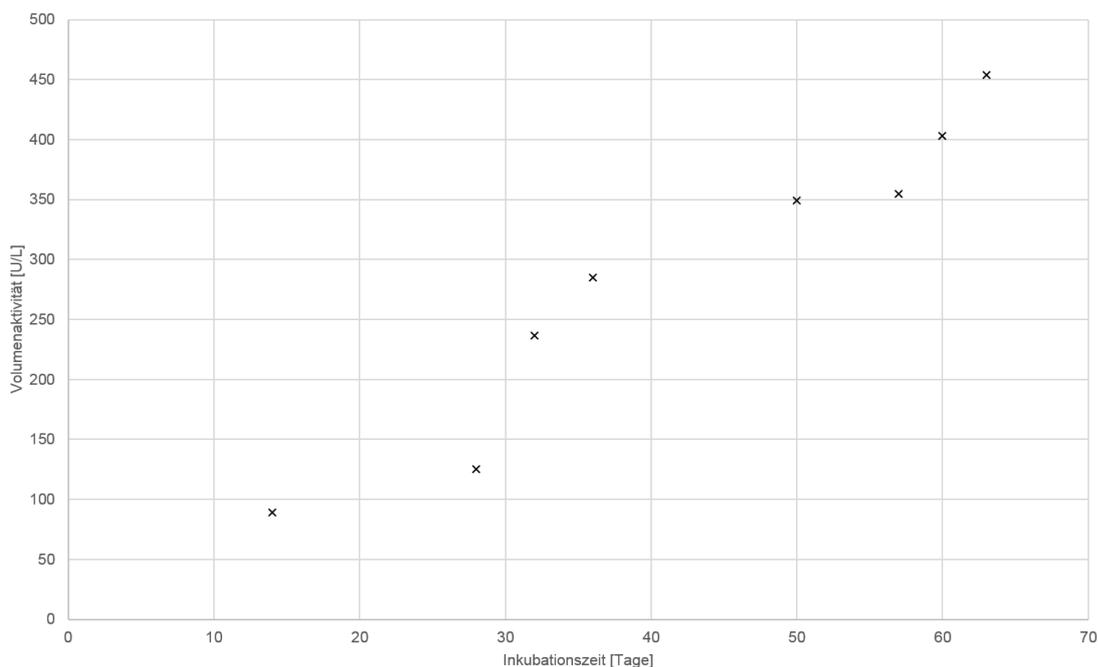


Abbildung 30: Laccaseaktivität während der Anzucht von *C. maxima* auf dem „Anzuchtmedium Dickklauge“

Da die ligninolytischen Enzyme extrazellulär im Medium vorliegen, kann das Pilzmycel mittels Filtration vom Nährmedium abgetrennt und verworfen werden. Zur Verringerung des Gesamtvolumens des Anzuchtmediums erfolgte eine Dialyse gegen Polyethylenglycol 40.000 (PEG 40.000). Nach Ausfällung der Proteine mit Ammoniumsulfat (80 %-Sättigung), bei der jedoch ein Großteil der Ligninabbauprodukte mitgefällt wird, und Aufnahme des Proteinpellets in Wasser, erfolgte die Abtrennung der Ligninsulfonate durch die Bildung eines wässrigen Zweiphasensystems nach Zugabe von Polyethylenglycol 6.000 (PEG 6.000). Hierbei bildet sich eine dunkle hochviskose Phase, die die Ligninsulfonate beinhaltet. Des Weiteren entsteht eine helle Phase, die die ligninolytischen Enzyme enthält. Nach Aufkonzentrierung der hellen Phase mittels Ultrafiltration erfolgte eine Anionenaustauschchromatographie (IC) mit einem Stufengradienten (0,05 - 1,0 M NaCl in 25 mM Natriumacetatpuffer, pH 5,5, vgl. 46

Kapitel 7.2.1). In Abbildung 31 ist eine schematische Darstellung der entwickelten Aufreinigung gezeigt.

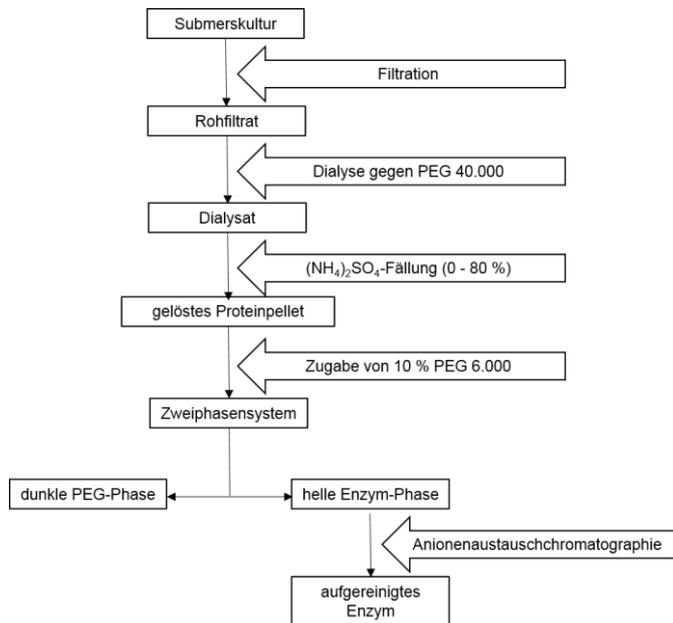


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Enzymisolierung und -aufreinigung

Während der Anionenaustauschchromatographie wurde in der Zeit von der 5. Minute bis zur 35. Minute insgesamt 30 Fraktionen (je 1 mL) des Eluats gesammelt.

Das Chromatogramm der Aufreinigung der Laccase von *C. maxima* ist mit den eingezeichneten Fraktionen in Abbildung 32 dargestellt.

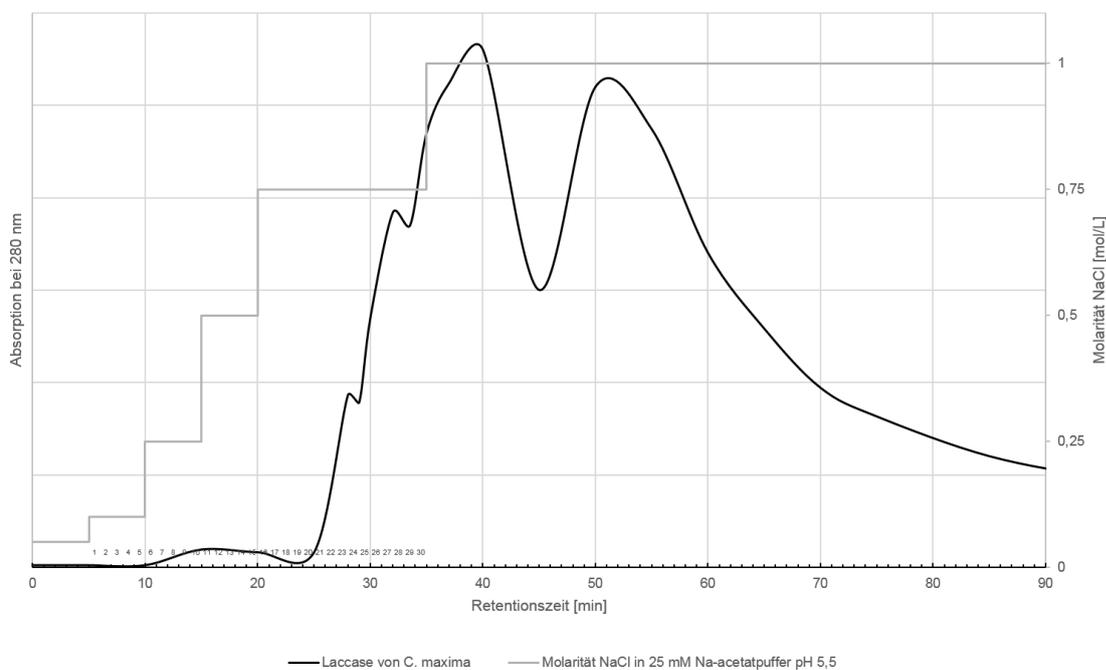


Abbildung 32: Anionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung der Laccase von *C. maxima*
(Methode vgl. Kapitel 7.2.1)

Die Fraktionen 1 bis 19 wiesen keine Enzymaktivität auf. In Abbildung 33 sind die Enzymaktivitäten in den gesammelten Fraktionen 20 bis 30 dargestellt.

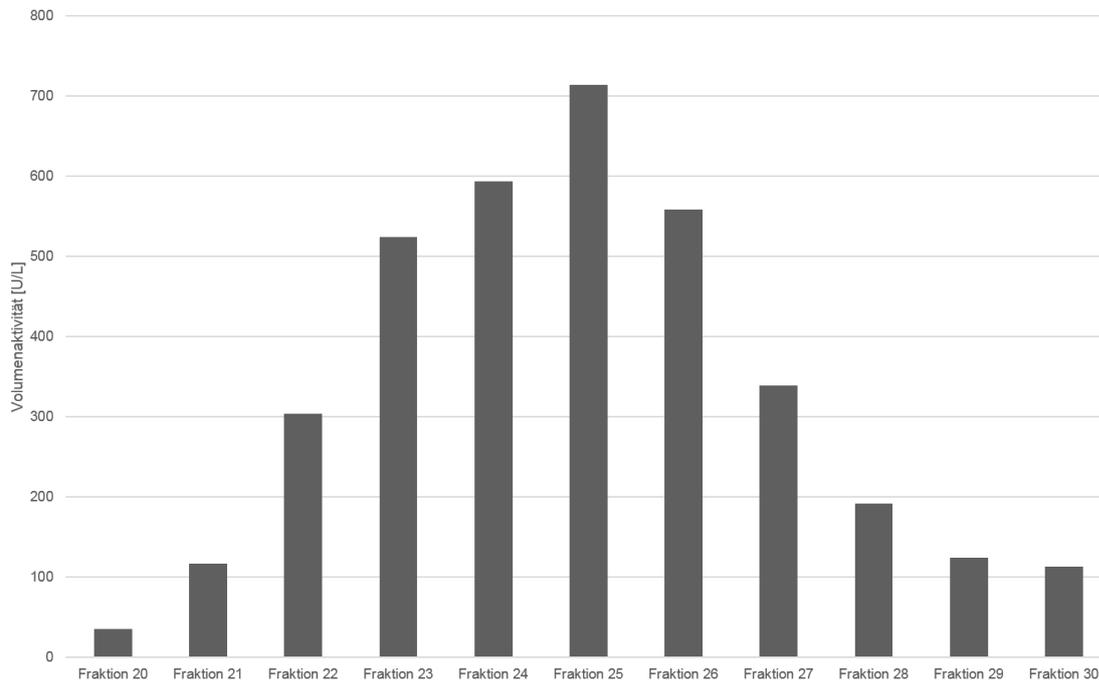


Abbildung 33: Enzymaktivitäten in den Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung der Laccase von *C. maxima*

Eine weitere Fraktionierung des Eluats über die Fraktion 30 hinaus ist aufgrund der starken Gelbfärbung sowie der geringen Enzymaktivitäten nicht notwendig.

Die Fraktionen 20 bis 30 wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration entsalzt und aufkonzentriert.

Tabelle 11 zeigt die Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccase von *C. maxima*.

Tabelle 11: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccase von *C. maxima*

Aufreinigungsstufe	Gesamtaktivität [U]	Protein-gehalt [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Aufreinigung (Faktor)
Rohfiltrat	227,3	154,8	1,468	100,00	1,00
Dialysat	208,0	130,3	1,596	91,50	1,09
Ammonium-sulfatfällung	189,6	125,6	1,509	83,44	1,03
PEG 6.000	52,9	17,3	3,066	23,29	2,09
IC	51,1	11,0	4,629	22,49	3,15

Bei der Aufarbeitung der Laccase von *C. maxima* konnten 11,0 mg Enzym erhalten werden. Die Enzymausbeute bezogen auf die Gesamtaktivität betrug 22,49 %. Die stärksten Enzymverluste sind bei der Bildung des wässrigen Zweiphasensystems durch Zugabe von

PEG 6.000 zu beobachten.

Die ligninolytischen Enzyme anderer Weißfäulepilze konnten nach dem gleichen Schema isoliert und aufgereinigt werden. Dementsprechend erfolgte die Isolierung der Laccasen von *Agaricus brasiliensis*, *Clitocybe maxima*, *Grifola frondosa*, *Hericium coralloides*, *Hericium erinaceus*, *Hypsizygus tessulatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* und *Trametes versicolor* sowie der Manganperoxidase von *Calocera viscosa*.

Bei der Aufarbeitung der Laccasen von *H. coralloides*, *H. erinaceus*, *H. tessulatus*, *P. eryngii* und *T. versicolor* sowie der Manganperoxidase von *C. viscosa* zeigten sich ähnliche Anionenaustauschchromatogramme wie bei der Laccase von *C. maxima*. Hierbei wurden ebenfalls in den Fraktionen 20 bis 30 Enzymaktivitäten gemessen, sodass diese Fraktionen vereinigt wurden. Die Aktivitäten während der Aufarbeitung der Enzyme sind im Anhang dargestellt.

Im Zuge der Anionenaustauschchromatographie der Laccasen von *A. brasiliensis*, *G. frondosa* und *P. ostreatus* wiesen auch die früheren Fraktionen Enzymaktivitäten auf, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese Pilze bei der Anzucht auf dem „Anzuchtmedium Dicklauge“ mindestens zwei Laccasen ausschütten und diese aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte mittels Anionenaustauschchromatographie getrennt werden können. In Abbildung 34 sind die Enzymaktivitäten der einzelnen IC-Fraktionen bei der Aufreinigung der Laccasen von *G. frondosa* dargestellt.

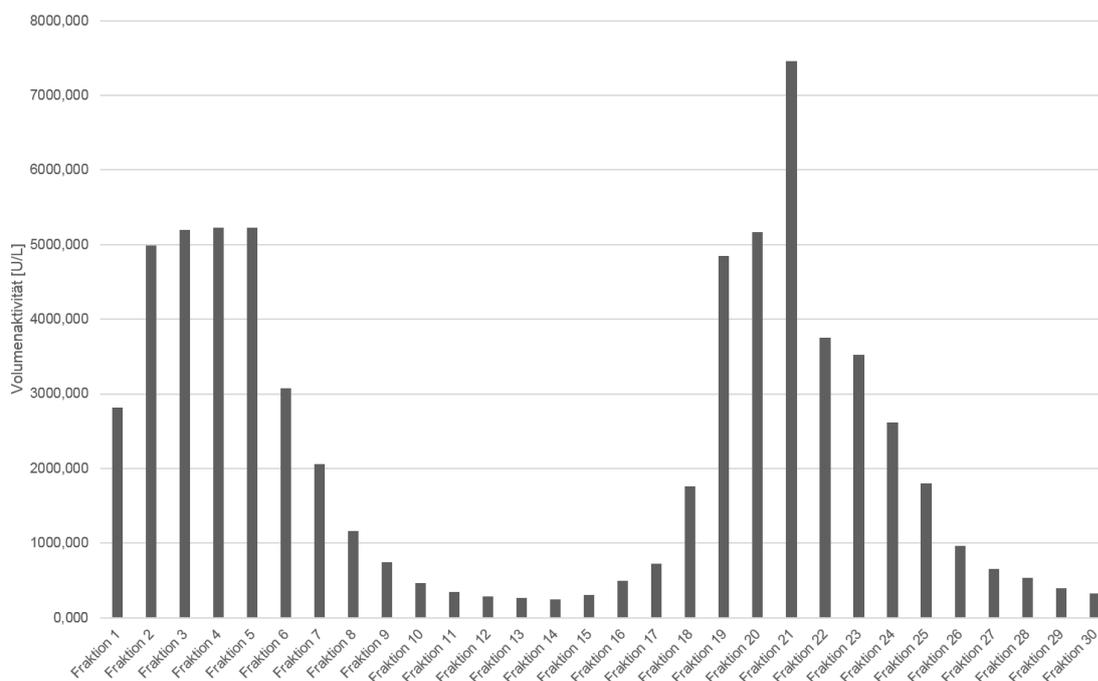


Abbildung 34: Enzymaktivitäten in den Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung der Laccase von *G. frondosa*

Es wurde festgestellt, dass Enzyme während der gesamten Fraktionierung eluieren. Hierbei zeigen sich zwei Maxima. Zum einen treten in den Fraktionen 1 bis 8 hohe Volumenaktivitäten auf. Zum anderen erfolgt ein erneuter Anstieg der Enzymaktivitäten ab Fraktion 15 bis hin zur Fraktion 21. Bei der Aufreinigung der Laccasen von *Agaricus brasiliensis* und *Pleurotus ostreatus* sind ähnliche Verläufe der Enzymaktivitäten in den einzelnen Fraktionen zu beobachten. Bei den Aufreinigungen der Enzyme dieser drei Pilze erfolgte daher eine Vereinigung der Fraktionen entsprechend der beiden Maxima in zwei aufgereinigten Enzymlösungen.

Die Enzymaktivitäten und die Ausbeute der Laccasen von *G. frondosa* sind in Tabelle 12 gezeigt.

Tabelle 12: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccasen von *G. frondosa*

Aufreinigungsstufe	Gesamtaktivität [U]	Protein-gehalt [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Aufreinigung (Faktor)
Rohfiltrat	725,7	99,9	7,268	100,00	1,00
Dialysat	665,7	85,0	7,832	91,73	1,08
Ammonium-sulfatfällung	785,0	82,9	9,474	108,17	1,30
PEG 6.000	1275,0	28,7	44,364	175,69	6,10
IC Peak 1	1331,7	31,0	42,958	183,50	5,91
IC Peak 2	1498,6	38,0	39,438	206,51	5,43
IC gesamt	2830,3	69,0	82,396	690,01	11,34

Die Pilze *A. brasiliensis*, *G. frondosa* und *P. ostreatus* sezernieren somit unter den gegebenen Bedingungen jeweils zwei Isoenzyme. Diese Isoenzyme können merklich in ihren Eigenschaften differieren. Es ist bekannt, dass sich Isoenzyme sowohl in ihren Stabilitäten gegenüber verschiedenen Substanzen als auch in ihrem Temperatur- und pH-Optimum und in ihrer Affinität gegenüber verschiedenen Substraten unterscheiden [164].

4.4 Charakterisierung der Laccasen

Die isolierten Laccasen wurden anhand verschiedener Parameter charakterisiert und untereinander verglichen. Die Charakterisierung umfasste, neben der Bestimmung der Molekülgröße mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und der Bestimmung des isoelektrischen Punktes, die Ermittlung des Einflusses von pH-Wert und Temperatur, als auch verschiedener Inhibitoren und Metallsalze. Außerdem erfolgte die Bestimmung der kinetischen Parameter für verschiedene Substrate.

Anhand dieser Charakterisierungen lassen sich Aussagen über die optimalen Bedingungen für den Einsatz dieser Enzyme zum Abbau von Ligninmodellsubstanzen und der Ablaugen treffen.

4.4.1 Bestimmung der Molekülgrößen der Laccasen mittels SDS-PAGE

Die Bestimmung der Molekülgrößen erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die ermittelten Größen sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Molekülgrößen der isolierten Laccasen

Laccase	Molekülgröße [kDa]	Molekülgröße Literatur [kDa]	
<i>Agaricus brasiliensis</i> - 1	66	66	[165]
<i>Agaricus brasiliensis</i> - 2	65		
<i>Clitocybe maxima</i>	62	62	[166]
<i>Grifola frondosa</i> - 1	70	70 - 71	[167,168]
<i>Grifola frondosa</i> - 2	72		
<i>Hericiium coralloides</i>	67	65	[169]
<i>Hericiium erinaceus</i>	70	63	[170]
<i>Hypsizygyus tessulatus</i>	67	-	-
<i>Pleurotus eryngii</i>	70	34 - 65	[171,172]
<i>Pleurotus ostreatus</i> - 1	70	55 - 82	[173-178]
<i>Pleurotus ostreatus</i> - 2	70		
<i>Trametes versicolor</i>	81	97	[179]

Die isolierten Laccasen weisen die typischen Molekülgrößen von Laccasen auf (vgl. Kapitel 2.2.2). Die Molekülgrößen einiger Enzyme stimmen dabei mit den Molekulargrößen der Isoenzyme überein, die in der Literatur beschrieben sind.

4.4.2 Ermittlung des isoelektrischen Punktes

Tabelle 14 zeigt die ermittelten isoelektrischen Punkte der isolierten Laccasen. Alle Laccasen weisen isoelektrische Punkte im sauren pH-Bereich auf. Die isoelektrischen Punkte der Laccasen von *A. brasiliensis*, *P. eryngii* und *P. ostreatus* liegen im Bereich der isoelektrischen Punkte bereits charakterisierter Laccasen dieser Pilzmycelien.

Tabelle 14: Ergebnisse der isoelektrischen Fokussierung und Vergleich mit Literaturdaten

Laccase	pI	pI Literatur	
<i>Agaricus brasiliensis</i> - 1	3,3	4,0	[165,180]
<i>Agaricus brasiliensis</i> - 2	4,2		
<i>Clitocybe maxima</i>	3,4	-	-
<i>Grifola frondosa</i> - 1	3,5	-	-
<i>Grifola frondosa</i> - 2	4,1	-	-
<i>Hericiium coralloides</i>	3,8	-	-
<i>Hericiium erinaceus</i>	4,5	-	-
<i>Hypsizygus tessulatus</i>	3,6	-	-
<i>Pleurotus eryngii</i>	4,6	4,1 – 5,2	[172,181]
<i>Pleurotus ostreatus</i> - 1	3,5	2,9 – 6,7	[173-177]
<i>Pleurotus ostreatus</i> - 2	4,1		
<i>Trametes versicolor</i>	3,5	-	-

4.4.3 pH-Optimum und pH-Stabilität der Laccasen

Der Einfluss des pH-Wertes auf eine enzymatische Reaktion beruht nicht nur auf der Rolle von H⁺-Ionen und OH⁻-Ionen als Reaktionspartner. Vielmehr bedingt die Veränderung des pH-Wertes die Änderung der Bruttoladung des Proteins und einzelner Aminosäuren, sodass reversible Änderungen der Enzymkonformationen auftreten und die Bindung sowie die Umsetzung von Substraten beeinflusst wird. Das pH-Profil ist somit charakteristisch für ein Enzym und weist ein mehr oder weniger ausgeprägtes pH-Optimum auf. An diesem befinden sich die wichtigen Aminosäurereste im Bereich des aktiven Zentrums im funktionell benötigten Ionisationszustand für die Umsetzung eines bestimmten Substrates. Des Weiteren wird speziell bei Laccasen eine Bindung von OH⁻-Ionen im aktiven Zentrum des Enzyms und der damit verbundenen Inhibierung diskutiert. Somit können Enzyme mit unterschiedlichen Substraten verschiedene pH-Optima aufweisen. Demzufolge hängt das pH-Optimum sowohl vom Substrat als auch von der Enzymstabilität ab. Ebenso existieren pH-Bereiche, bei denen das Substrat nicht gebunden und somit nicht umgesetzt wird. Wird das Enzym bei diesem pH-Wert denaturiert, so kommt es zur irreversiblen Inaktivierung [164,182,183].

Abbildung 35 zeigt die pH-Profile der isolierten Laccasen bei der Umsetzung von 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz (ABTS).

Dabei dient die Enzymaktivität am pH-Optimum jeweils als 100 %-Referenz für die anderen Aktivitäten. Zur besseren Darstellung wurden die ermittelten relativen Enzymaktivitäten bei den verschiedenen pH-Werten untereinander verbunden.

Alle isolierten Laccasen weisen ein pH-Optimum im sauren pH-Bereich auf. Besonders auffällig ist, dass die Laccasen von *A. brasiliensis*, *G. frondosa*, *P. ostreatus*, *P. eryngii* und *T. versicolor* einen ähnlichen Verlauf zeigen. Sie weisen alle ein pH-Optimum von 2,5 auf. Bis zu einem pH-Wert von pH 7 fallen die Aktivitäten kontinuierlich ab.

Ebenso gleichen sich die pH-Profile der Laccasen von *C. maxima*, *H. tessulatus* und *H. coralloides*, die ein pH-Optimum von 3,0 - 3,5 aufweisen. Lediglich die Laccase von *H. erinaceus* zeigt ein abweichendes pH-Profil mit einem pH-Optimum von 5,0 und einer relativ hohen Aktivität über einen weiten pH-Bereich von pH 2,5 bis pH 5,5. Bei pH-Werten größer pH 7 treten irreversible Denaturierungen aller Laccasen auf.

4 Ergebnisse und Diskussion

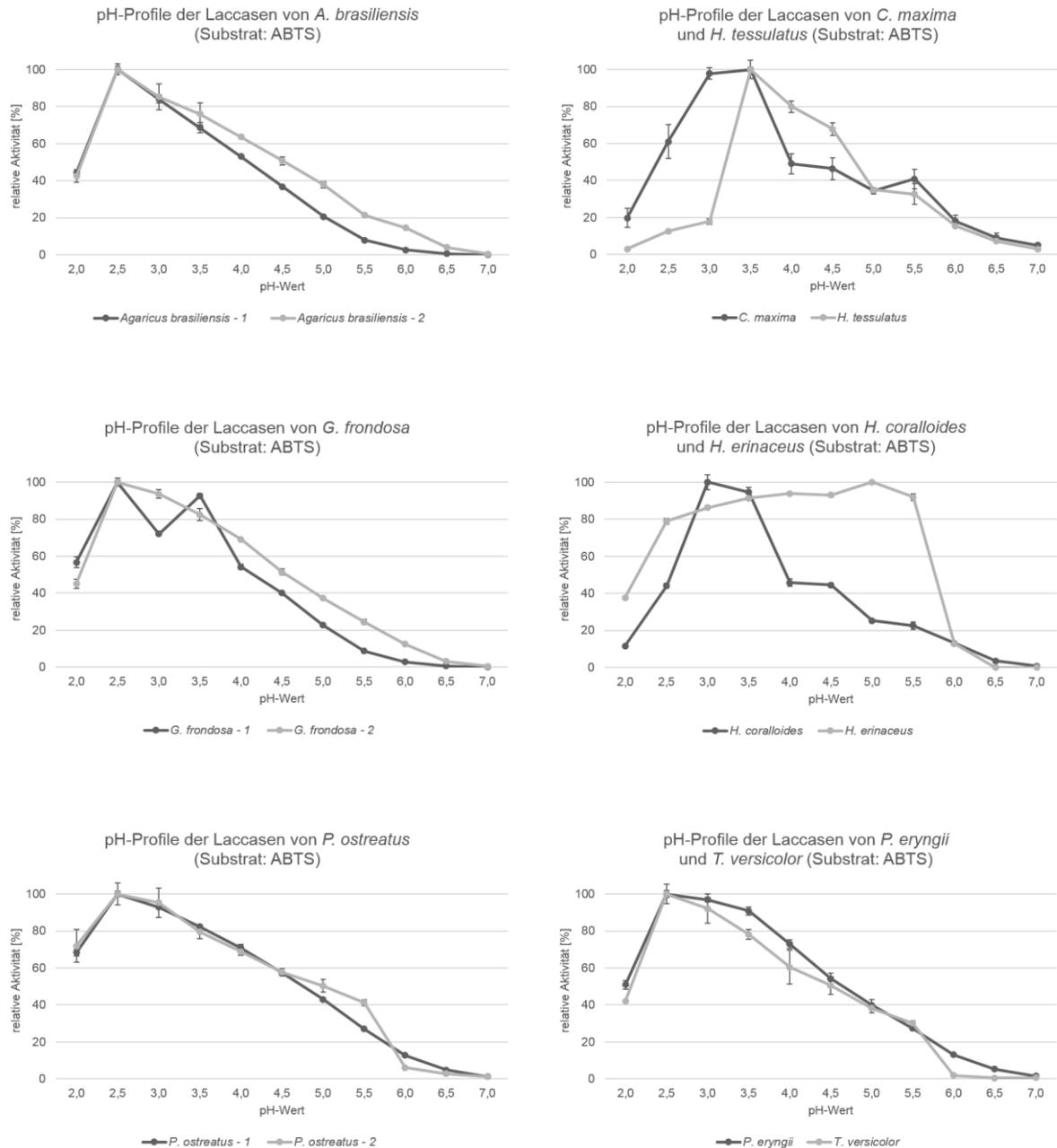


Abbildung 35: pH-Profile der Laccasen bei Umsetzung des Substrates 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz (ABTS)

In Abbildung 36 sind zum Vergleich die pH-Profile der Laccasen beim Umsatz des Substrates 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) dargestellt. Ebenso wie bei den pH-Profilen mit dem Substrat ABTS dient die Enzymaktivität am pH-Optimum jeweils als 100 %-Referenz für die anderen Aktivitäten. Zur besseren Darstellung wurden die ermittelten relativen Enzymaktivitäten bei den verschiedenen pH-Werten untereinander verbunden.

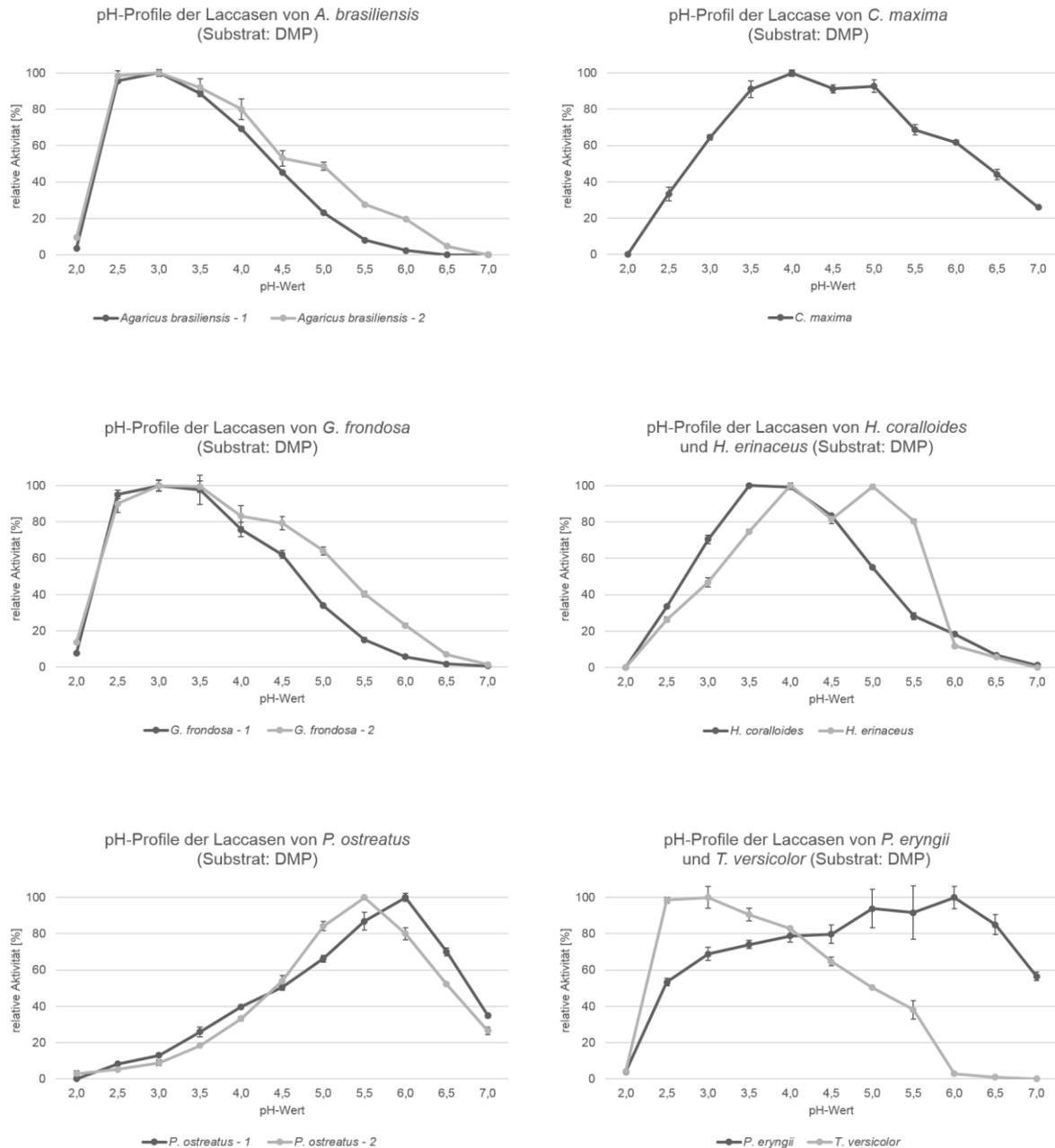


Abbildung 36: pH-Profile der Laccasen bei Umsetzung des Substrates 2,6-Dimethoxyphenol (DMP)

Die pH-Optima der isolierten Laccasen sind bei der Umsetzung des Substrates DMP im Vergleich zur Oxidation von ABTS zu höheren pH-Werten verschoben. Grundsätzlich sind die erhaltenen pH-Profile relativ verschieden. Lediglich die Profile der Isoenzyme von *A. brasiliensis*, *G. frondosa* und *P. ostreatus* sowie die Enzyme von *A. brasiliensis* und *G. frondosa* gleichen sich jeweils untereinander. Auffällig ist bei der Laccase von *H. erinaceum*, dass die Enzymaktivität bei einem pH-Wert von 4,5 geringer ist, als die Aktivitäten bei pH 4,0 und 5,0. Tabelle 15 fasst die pH-Optima der isolierten Laccasen bei der Umsetzung der beiden Substrate zusammen und gibt einen Vergleich mit Literaturdaten.

Tabelle 15: pH-Optima der isolierten Laccasen bei der Umsetzung der Substrate ABTS und DMP

Laccase	Substrat: ABTS			Substrat: DMP		
	Ermittelt	Literatur		Ermittelt	Literatur	
<i>Agaricus brasiliensis</i> - 1	2,5	2,3	[165]	3,0	5,5	[165]
<i>Agaricus brasiliensis</i> - 2	2,5			2,5 - 3,0		
<i>Clitocybe maxima</i>	3,0 - 3,5	3,0	[166]	4,0	-	-
<i>Grifola frondosa</i> - 1	2,5	2,0 - 2,2	[167,168]	3,0 - 3,5	2,0	[167]
<i>Grifola frondosa</i> - 2	2,5			3,0 - 3,5		
<i>Hericium coralloides</i>	3,0	2,2	[169]	3,5 - 4,0	-	-
<i>Hericium erinaceus</i>	5,0	3,0 - 5,0	[170]	5,0	-	-
<i>Hypsizygus tessulatus</i>	3,5	-	-	-	-	-
<i>Pleurotus eryngii</i>	2,5 - 3,0	3,0 - 4,0	[171,172,181]	6,0	-	-
<i>Pleurotus ostreatus</i> - 1	2,5	3,0 - 4,0	[176,178,184-186]	6,0	4,0 - 4,5	[178,186]
<i>Pleurotus ostreatus</i> - 2	2,5 - 3,0			5,5		
<i>Trametes versicolor</i>	2,5	2,5 - 3,0	[179,187]	2,5 - 3,0	3,5 - 4,0	[187]

Alle pH-Optima liegen im sauren pH-Bereich. Sie stimmen dabei teilweise mit den pH-Optima ihrer in der Literatur beschriebenen Isoenzyme überein. Insbesondere zeigen die Laccasen von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 1 und *A. brasiliensis* - 2) mit dem Substrat DMP einen großen Unterschied zum pH-Optimum des Isoenzym.

Das pH-Optimum zeigt die Aktivität direkt nach Zugabe der entsprechenden Puffer- und Substratlösung zum Enzym. Über die Bestimmung der pH-Stabilität können Aussagen über die Entwicklung der Enzymaktivität über einen längeren Zeitraum (hier: 48 Stunden) getroffen werden.

In Abbildung 37 sind die pH-Stabilitäten der Laccasen *A. brasiliensis* - 2, *C. maxima* und *G. frondosa* - 1 mit dem Substrat ABTS bei den pH-Werten von pH 2,0 bis pH 7,0 dargestellt. Zur besseren Darstellung wurden die ermittelten Enzymaktivitäten bei den verschiedenen Zeitpunkten der Messung untereinander verbunden.

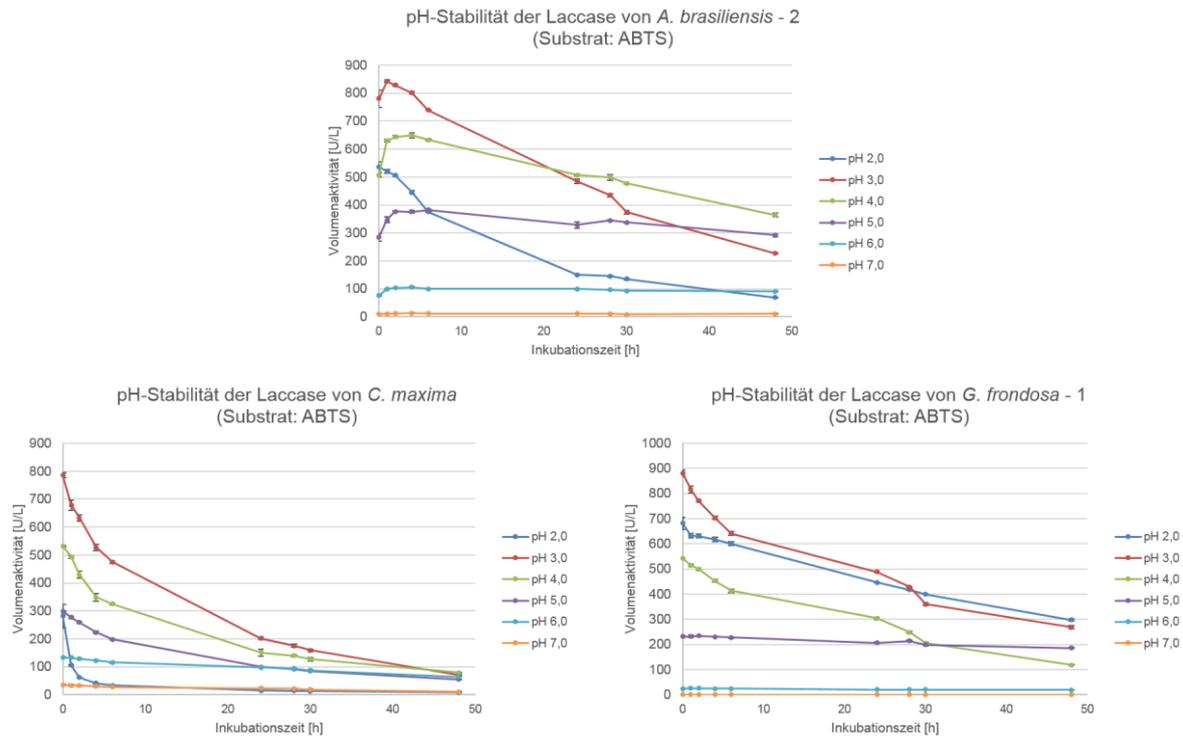


Abbildung 37: pH-Stabilitäten der Laccasen von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 2), *C. maxima* und *G. frondosa* (*G. frondosa* - 1)

Die Laccase von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 2) zeigt im Gegensatz zu den Laccasen von *C. maxima* und *G. frondosa* (*G. frondosa* - 1) innerhalb der ersten Stunde bei den pH-Werten 3,0 bis 7,0 einen Anstieg der Enzymaktivität. Es wird davon ausgegangen, dass es innerhalb der ersten Stunde zur Umwandlung der Aminosäurereste im Enzym durch die Einwirkung von Protonen kommt, sodass der funktionell benötigte Ionisationszustand insbesondere im aktiven Zentrum des Enzyms erst nach einer Stunde erreicht wird. Es ist bekannt, dass die Rekonstituierung eines Enzyms nach einer reversiblen Konformationsänderung erhebliche Zeit (Sekunden bis Stunden) dauern kann [183].

Im Anschluss daran kommt es bei den pH-Werten 2,0 bis 4,0 zu einem starken Abfall der Aktivität. Bei pH 5,0 und pH 6,0 sind zwar geringere Aktivitäten zu beobachten, die jedoch während der Inkubationszeit von 48 Stunden keine bzw. nur geringe Aktivitätsverluste zeigen. Die Enzymaktivitäten bei pH 7,0 sind während der gesamten Inkubationszeit sehr gering. Bei den Laccasen von *C. maxima* und *G. frondosa* treten die beschriebenen Aktivitätsverluste bei pH 2,0 bis pH 4,0 bzw. pH 5,0 unverzüglich zu Inkubationsbeginn auf. Bei der Laccase von *C. maxima* ist auffällig, dass bei der Inkubation bei pH 3,0 bis pH 6,0 nach 48 Stunden die gleichen Enzymaktivitäten erreicht werden. Die Auswirkungen der Pufferlösungen mit pH 6,0 und pH 7,0 auf die Laccasen von *A. brasiliensis* und *C. maxima* sind vergleichbar mit den Auswirkungen dieser Lösungen auf die Laccase von *A. brasiliensis*.

Das in der Literatur beschriebene Isoenzym der Laccase von *A. brasiliensis* ist bei niedrigen pH-Werten weniger stabil als das im Rahmen dieser Arbeit isolierte Isoenzym (*A. brasiliensis* - 2). So zeigt es nach einer Inkubationszeit von zehn Stunden bei pH 3 einen Aktivitätsverlust von 30 % [165] im Vergleich zu einem Verlust von 13 %. Bei einem pH-Wert von 7 treten innerhalb von zehn Stunden bei beiden Isoenzymen keine Aktivitätsverluste auf.

4.4.4 Temperaturoptimum und Temperaturstabilität der Laccasen

Entsprechend chemischer Reaktionen sind auch enzymkatalysierte Reaktionen abhängig von der Temperatur. Obwohl diese Reaktionen sehr komplex sind, gilt auch hierbei meist die aus dem Arrhenius-Gesetz abgeleitete Faustformel, dass eine Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperaturerhöhung von 10 °C gegeben ist. Bei Enzymen ist jedoch zu beachten, dass die Gefahr einer Hitzedenaturierung bei erhöhten Temperaturen besteht, sodass es oberhalb einer bestimmten Temperatur zum Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit kommt, da ähnlich wie bei extremen pH-Werten, das Enzym irreversibel inaktiviert wird. Es existieren ebenso Enzyme, die bei hohen Temperaturen gesteigerte Aktivitäten im Gegensatz zur Aktivität bei niedrigen Temperaturen aufweisen. Hier ist jedoch zu beachten, dass die Enzyme bei diesen Temperaturen stabil bleiben und nicht innerhalb kurzer Zeit denaturiert und damit inaktiviert werden [182,183].

Abbildung 38 zeigt die relativen Enzymaktivitäten der isolierten Laccasen bei verschiedenen Temperaturen bei der Umsetzung von 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz (ABTS). Dabei dient die Enzymaktivität am Temperaturoptimum jeweils als 100 %-Referenz für die anderen Aktivitäten.

Zur besseren Darstellung wurden die ermittelten relativen Enzymaktivitäten bei den verschiedenen Temperaturen untereinander verbunden.

Die isolierten Laccasen weisen unterschiedliche Temperaturoptima sowie unterschiedliche Temperaturprofile auf. Lediglich die Temperaturoptima und -profile der Isoenzyme von *A. brasiliensis*, *G. frondosa* und *P. ostreatus* stimmen jeweils gut überein.

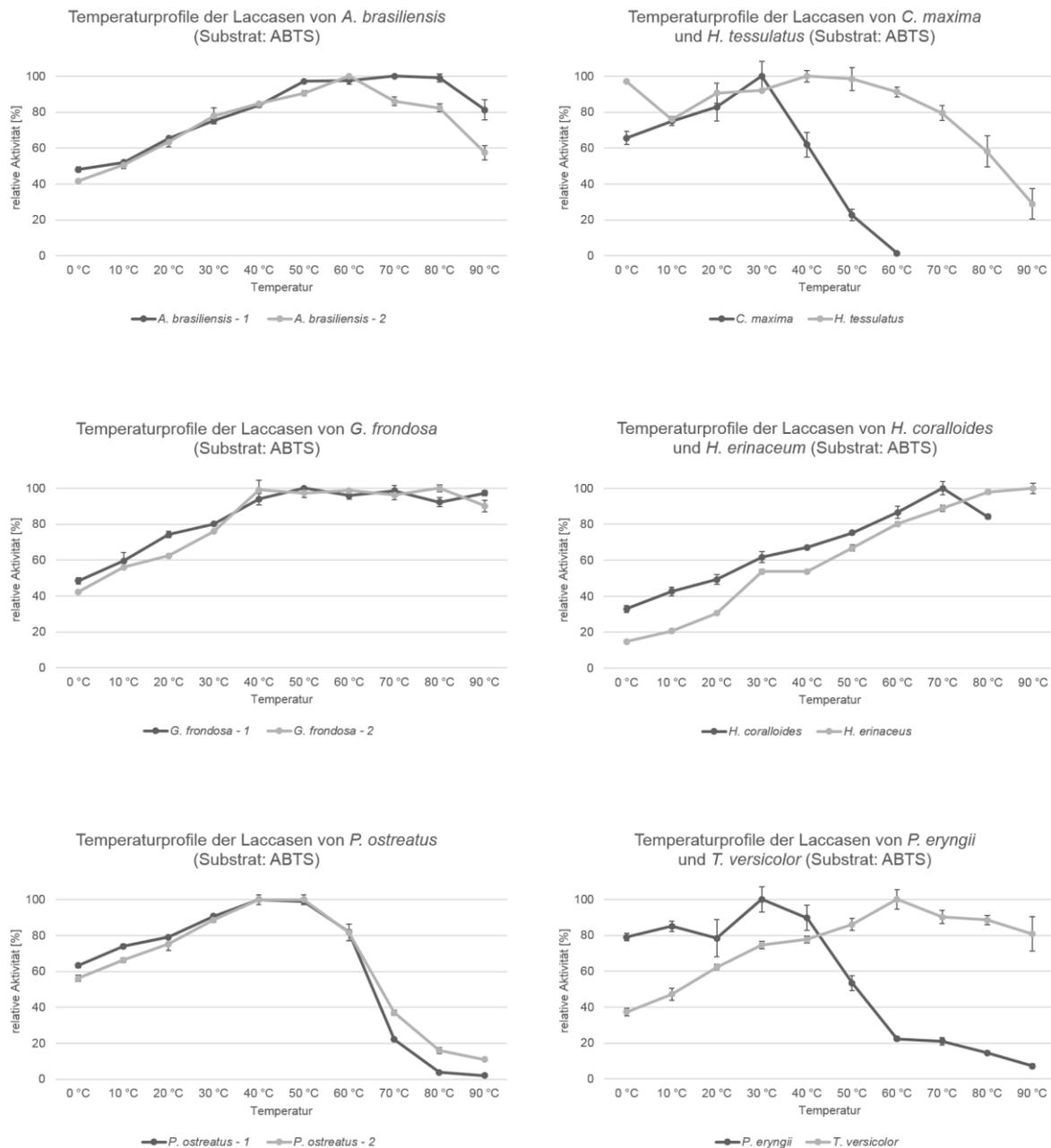


Abbildung 38: Temperaturprofile der Laccasen bei Umsetzung des Substrates 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz (ABTS)

Die Laccasen von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 1 und *A. brasiliensis* - 2) zeigen ein breites Temperaturoptimum von 60 – 80 °C. Im Temperaturbereich von 0 – 90 °C liegen die relativen Enzymaktivitäten immer über 40 % der Maximalaktivität. Dies kann auch bei den Laccasen von *G. frondosa* (*G. frondosa* - 1 und *G. frondosa* - 2) beobachtet werden. Diese weisen sogar ein Temperaturoptimum von 40 – 90 °C auf. Im Gegensatz dazu liegt das Temperaturoptimum der Laccasen von *P. ostreatus* (*P. ostreatus* - 1 und *P. ostreatus* - 2) bei 40 – 50 °C. Bei 80 °C bzw. 90 °C erfolgt eine nahezu vollständige Inaktivierung der beiden Laccasen.

Die Laccasen von *C. maxima* und *P. eryngii* weisen das niedrigste Temperaturoptimum bei einer Temperatur von 30 °C auf. Eine vollständige Inaktivierung der Laccase von *C. maxima* wird bereits bei einer Temperatur von 60 °C erreicht, während die Laccase von *P. eryngii* ab einer Temperatur von 60 °C nur noch geringe Aktivitäten aufweist.

Das Temperaturoptimum der Laccase von *T. versicolor* liegt bei 60 °C. Für die Laccasen von *H. coralloides* und *H. erinaceus* zeigt sich ein stetiger Anstieg der Enzymaktivität bei Erhöhung der Temperatur. Die Laccase von *H. tessulatus* weist ein Temperaturoptimum von 40 °C auf. Jedoch wird im Bereich von 20 - 60 °C kein großer Aktivitätsverlust beobachtet. Bei Temperaturen über 60 °C erfolgt eine stetige Abnahme der Enzymaktivität.

In Abbildung 39 sind zum Vergleich die Temperaturprofile der Laccasen beim Umsatz des Substrates 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) dargestellt. Ebenso wie bei den Temperaturprofilen mit dem Substrat ABTS dient die Enzymaktivität am Temperaturoptimum jeweils als 100 %-Referenz für die anderen Aktivitäten. Zur besseren Darstellung wurden die ermittelten relativen Enzymaktivitäten bei den verschiedenen Temperaturen untereinander verbunden.

Im Vergleich zu den Temperaturprofilen der Laccasen bei der Umsetzung von ABTS zeigen die Laccasen von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 1 und *A. brasiliensis* - 2), *G. frondosa* (*G. frondosa* - 1 und *G. frondosa* - 2), *H. coralloides*, *H. erinaceus* und *T. versicolor* ähnliche Temperaturprofile bei der Umsetzung des Substrates DMP. Lediglich bei 90 °C kommt es bei *A. brasiliensis* - 2 und *G. frondosa* - 1 zu einem stärkeren Abfall der Enzymaktivität. Das Temperaturoptimum der Laccase von *T. versicolor* ist im Gegensatz zur Umsetzung von ABTS um 10 °C erhöht.

Die Laccasen von *C. maxima*, *P. ostreatus* (*P. ostreatus* - 1 und *P. ostreatus* - 2) und *P. eryngii* sind bei höheren Temperaturen aktiver, wenn DMP als Substrat eingesetzt wird. Das Temperaturoptimum ist somit zu höheren Temperaturen verschoben.

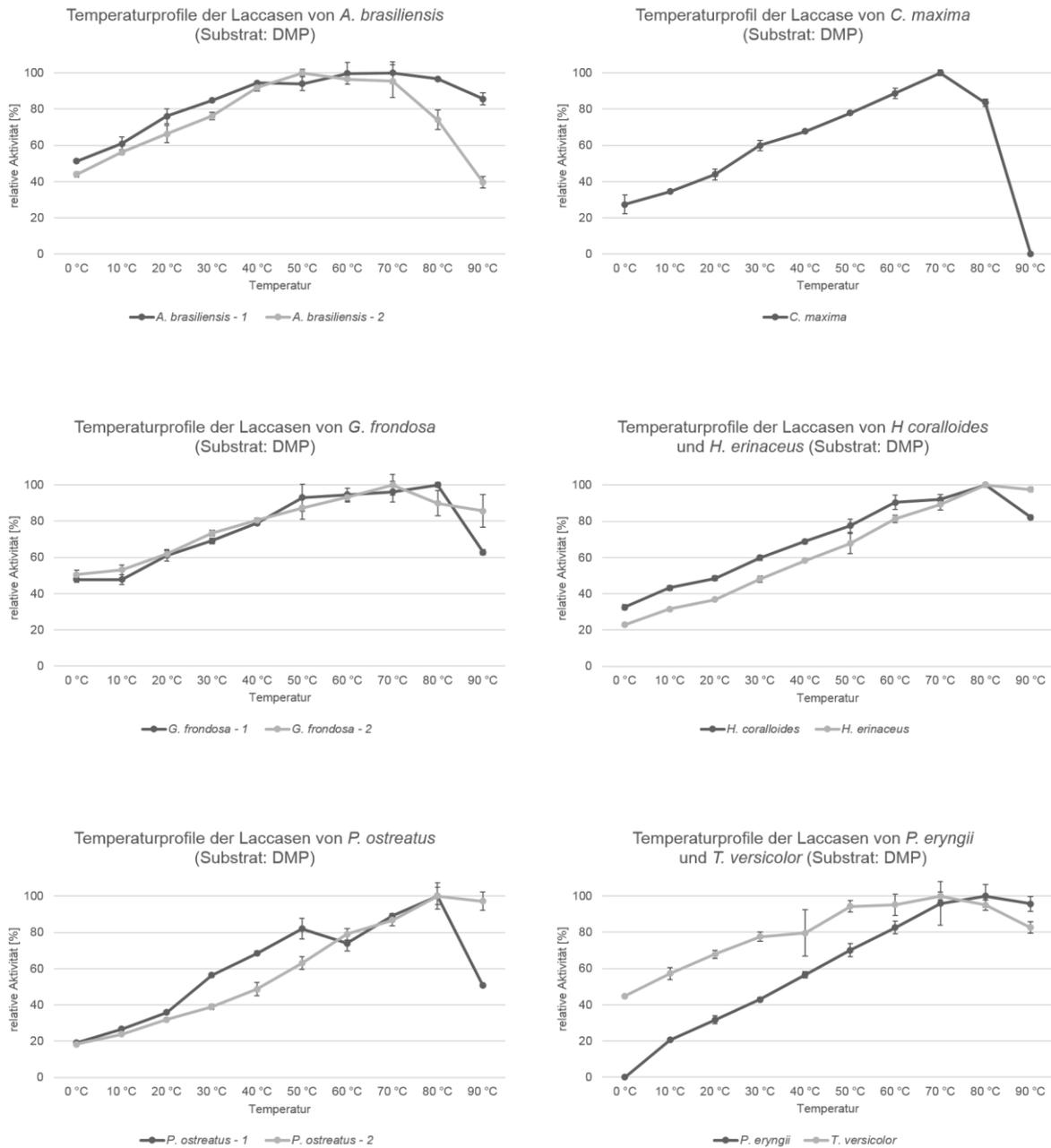


Abbildung 39: Temperaturprofile der Laccasen bei Umsetzung des Substrates 2,6-Dimethoxyphenol (DMP)

Tabelle 16 fasst die Temperaturoptima der isolierten Laccasen bei der Umsetzung der beiden Substrate zusammen und gibt einen Vergleich mit Literaturdaten.

Tabelle 16: Temperaturoptima der isolierten Laccasen bei der Umsetzung der Substrate ABTS und DMP

Laccase	Substrat: ABTS		Substrat: DMP			
	Ermittelt	Literatur		Ermittelt	Literatur	
<i>Agaricus brasiliensis</i> - 1	60 – 80 °C	-	-	60 - 70 °C	-	-
<i>Agaricus brasiliensis</i> - 2	60 °C			50 °C		
<i>Clitocybe maxima</i>	30 °C	60 °C	[166]	70 °C	-	-
<i>Grifola frondosa</i> - 1	40 - 90 °C	60 - 65 °C	[168]	70 - 80 °C	-	-
<i>Grifola frondosa</i> - 2	40 - 80 °C			70 °C		
<i>Hericium coralloides</i>	70 °C	40 °C	[169]	80 °C	-	-
<i>Hericium erinaceus</i>	90 °C	50 – 80 °C	[170]	80 °C	-	-
<i>Hypsizygus tessulatus</i>	40 °C	-	-	-	-	-
<i>Pleurotus eryngii</i>	30 °C	55 - 70 °C	[171,172]	80 - 90 °C	-	-
<i>Pleurotus ostreatus</i> - 1	40 - 50 °C	45- 65 °C	[176,184, 186]	80 °C	-	-
<i>Pleurotus ostreatus</i> - 2	40 - 50 °C			80 - 90 °C		
<i>Trametes versicolor</i>	60 °C	50 °C	[179]	70 °C	-	-

Da für das Substrat DMP keine Literaturdaten vorliegen, kann nur ein Vergleich mit den Temperaturoptima für das Substrat ABTS erfolgen. Die Temperaturoptima der isolierten Laccasen liegen weitestgehend im Bereich der Temperaturoptima der in der Literatur beschriebenen Isoenzyme. Allerdings wurden für die Laccasen von *C. maxima* und *P. eryngii* geringere Temperaturoptima und für die Laccasen von *H. coralloides* und *H. erinaceus* höhere Temperaturoptima ermittelt.

Das Temperaturoptimum zeigt ebenso wie das pH-Optimum die Aktivität eines Enzyms direkt nach Zugabe der entsprechend temperierten Puffer- und Substratlösung zum Enzym. Über die Bestimmung der Temperaturstabilität können Aussagen über die Entwicklung der Enzymaktivität über einen längeren Zeitraum (hier: 300 Minuten) getroffen werden.

In Abbildung 40 sind die Temperaturstabilitäten der Laccasen *A. brasiliensis* - 2, *C. maxima* und *G. frondosa* - 1 mit dem Substrat ABTS bei Temperaturen von 30 – 90 °C dargestellt. Hierbei wurde die Enzymaktivität zu Beginn der Inkubation als 100 %-Referenz für die folgenden Probenahmen gesetzt. Zur besseren Darstellung wurden die ermittelten relativen Enzymaktivitäten bei den verschiedenen Zeitpunkten der Messung untereinander verbunden.

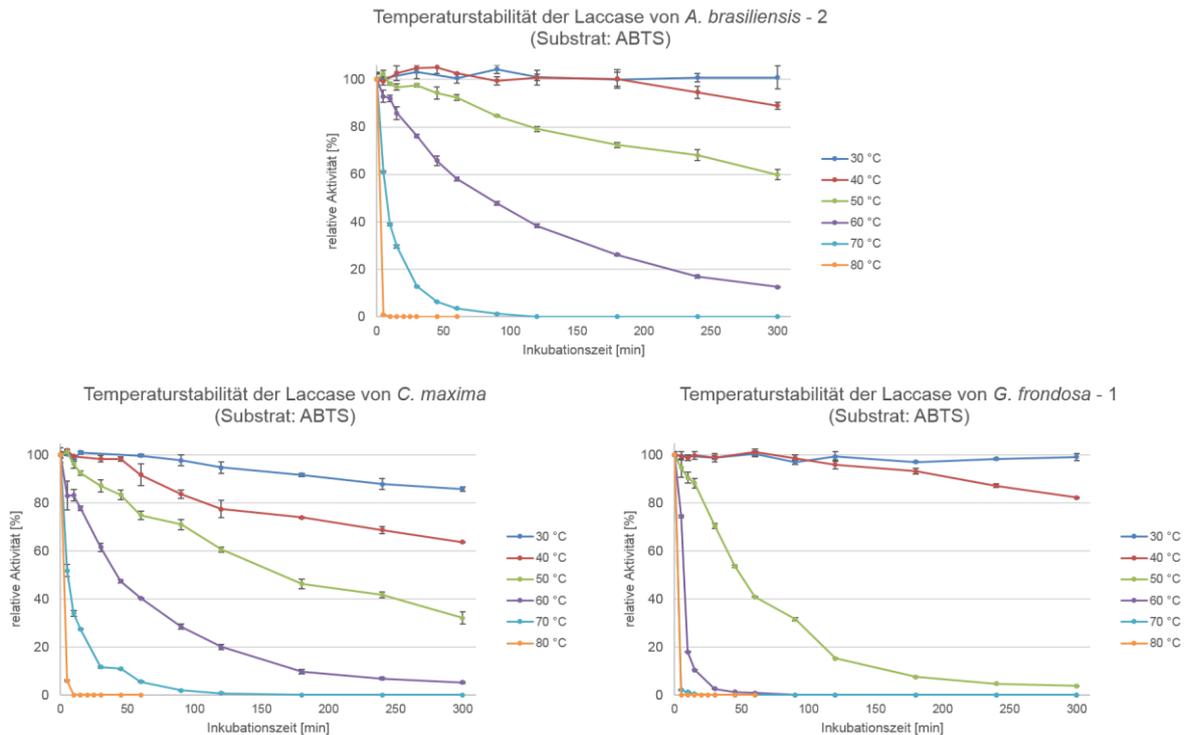


Abbildung 40: Temperaturstabilitäten der Laccasen von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 2), *C. maxima* und *G. frondosa* (*G. frondosa* - 1)

Die betrachteten Laccasen werden alle durch die Erhöhung der Inkubationstemperatur beeinflusst. Hierbei kommt es zur irreversiblen Inaktivierung der Enzyme. Eine Inkubation bei einer Temperatur von 30 °C für sechs Stunden hat keinen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität der Laccasen von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 2) und *G. frondosa* (*G. frondosa* - 1). Bei der Laccase von *C. maxima* kann nach sechs Stunden Inkubation bei 30 °C eine Restaktivität von etwa 86 % gemessen werden.

Die Laccase von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 2) ist in einem Temperaturbereich von 30 °C bis 70 °C die stabilste der drei betrachteten Laccasen. Sie ist wesentlich temperaturstabiler als das in der Literatur beschriebene Isoenzym. Dieses zeigt innerhalb der ersten 30 Minuten einen Aktivitätsverlust von 50 % bei einer Inkubationstemperatur von 40 °C. Bei 60 °C beträgt das Aktivitätsdefizit im selben Zeitraum sogar 90 % [165].

Eine vollständige Inaktivierung der Laccasen wird bei 80 °C nach fünf Minuten (*A. brasiliensis* - 2 und *G. frondosa* - 1) bzw. zehn Minuten (*C. maxima*) und bei 70 °C nach 15 Minuten (*G. frondosa* - 1) bzw. 120 Minuten (*A. brasiliensis* - 2 und *C. maxima*) erreicht.

Die Laccase von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 2) wird im Bereich ihres zuvor ermittelten Temperaturoptimums von 60 °C somit relativ stark von inaktiviert. Im Gegensatz dazu ist die Laccase von *C. maxima* an ihrem Temperaturoptimum (30 °C) stabil. Die Laccase von *G. frondosa* (*G. frondosa* - 1), die ein breites Temperaturoptimum von 40 - 90 °C aufweist, ist

lediglich bei 40 °C relativ temperaturstabil. Hier wurde nach sechs Stunden eine Restaktivität von 82 % gemessen.

Bei einer technischen Anwendung der Laccasen von *A. brasiliensis* und *G. frondosa* sollte somit eine Prozesstemperatur gewählt werden, die unterhalb bzw. am unteren Ende des Temperaturoptimums liegt, um eine Inaktivierung des Enzyms während des Prozesses zu verhindern.

4.4.5 Einfluss von Metallsalzen auf die Aktivität der Laccasen

Im aktiven Zentrum von Laccasen sind vier Kupferionen lokalisiert (vgl. Kapitel 2.2.2). Liegen in einer Substratlösung andere Metallionen vor, kann es zur Inhibierung des aktiven Zentrums durch die Bindung dieser Metallionen kommen. Diese Bindung verursacht eine Unterbrechung des internen Elektronentransfers und somit die Hemmung der Laccaseaktivität. Ebenso können Metallionen Aminosäurereste des Enzyms modifizieren, sodass es zur Konformationsänderung des Proteins kommt [188].

Der Einfluss verschiedener Metallsalze auf die Aktivität der isolierten Laccasen wurde anhand der Chloridsalze verschiedener Metalle (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} und Zn^{2+}) sowie anhand von Kupfersulfat (Cu^{2+}) untersucht. Diese wurden mit Konzentrationen von 0,1 mM, 1,0 mM und 10 mM (mit Ausnahme von Fe^{3+}) zum Testansatz (Substrat: ABTS) zugegeben.

Abbildung 41 zeigt die relativen Enzymaktivitäten der isolierten Laccasen bei unterschiedlichen Metallsalzkonzentrationen. Dabei dient die Enzymaktivität ohne Zusatz einer Metall-Lösung bei dem zuvor bestimmten pH- und Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms als 100 %-Referenz für die anderen Aktivitäten. Vertretend für die Alkali- und Erdalkalimetallsalze sind die Einflüsse von K^+ - und Ca^{2+} -Ionen dargestellt. Die nicht dargestellten Diagramme sind im Anhang zu finden.

Es ist ersichtlich, dass alle untersuchten Metallsalzlösungen einen Einfluss auf die Enzymaktivitäten der verschiedenen Laccasen aufweisen. Dieser ist sowohl von der Konzentration als auch vom enthaltenden Kation der Metallsalzlösung und von der betrachteten Laccase abhängig.

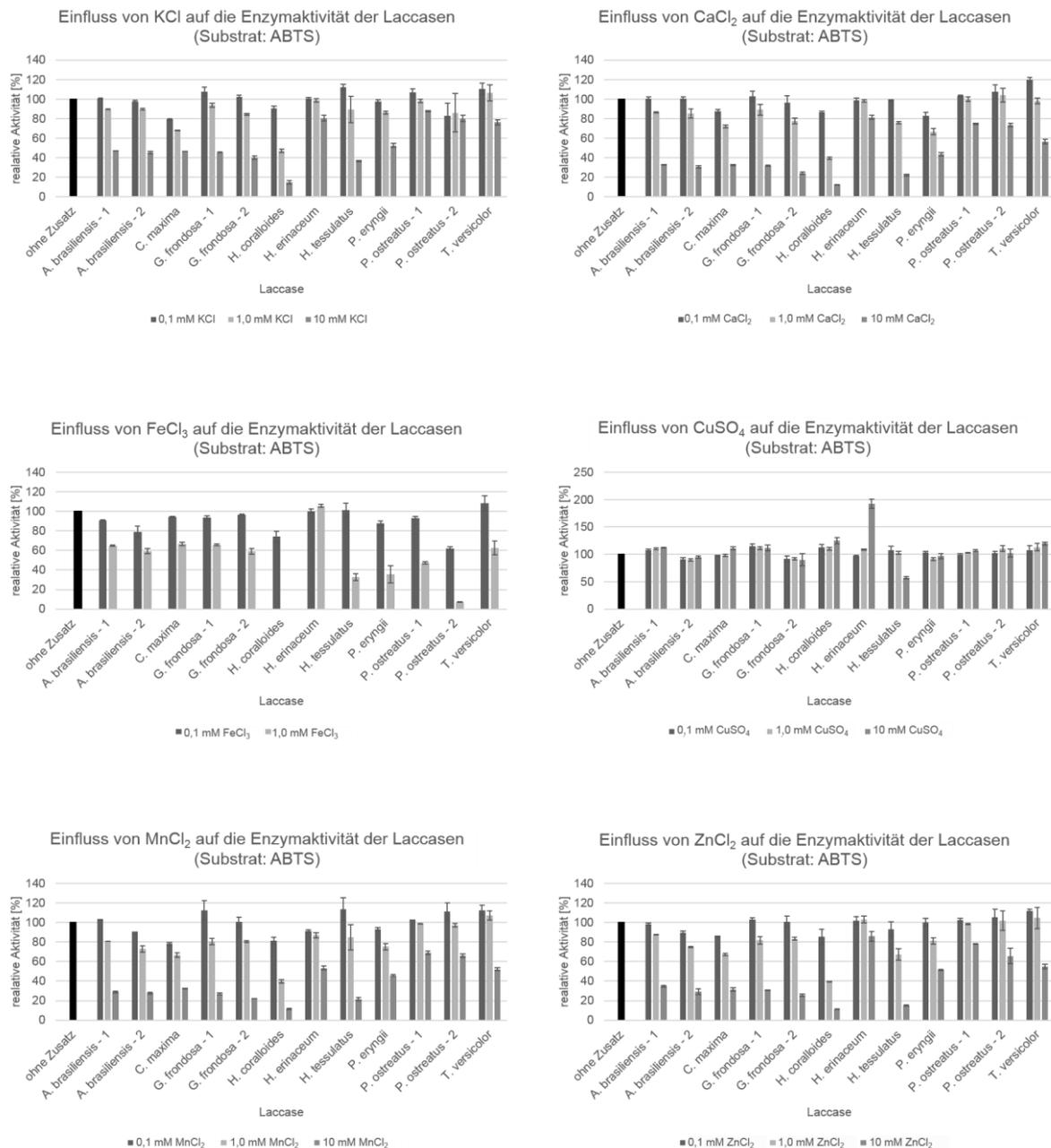


Abbildung 41: Einfluss von Metallsalzen auf die Enzymaktivitäten der isolierten Laccasen (Substrat: ABTS)

Der Einfluss von K^+ - und Ca^{2+} -Ionen ist sehr ähnlich. So zeigt sich bei den Laccasen von *A. brasiliensis* und *G. frondosa* eine Inhibierung ab einer Konzentration von 1,0 mM. Die Laccasen von *C. maxima* und *H. coralloides* werden bereits ab einer Konzentration von 0,1 mM von beiden Metallsalzen inhibiert. Die Laccasen von *P. ostreatus* und *T. versicolor* zeigen auch bei hohen Konzentrationen von 10 mM hohe relative Enzymaktivitäten. Die Laccase von *H. coralloides* erfährt in beiden Fällen die stärkste Inhibierung.

Das Eisen(III)-salz zeigt ebenfalls unterschiedliche Einflüsse auf die Aktivitäten der Laccasen. Während die Laccase von *H. erinaceus* bei den verwendeten Konzentrationen keine Inhibierung zeigt, wird die Laccase von *H. coralloides* bei einer $FeCl_3$ -Konzentration von

1,0 mM vollständig inhibiert. Ebenso erfolgt eine starke Inhibierung der zweiten Laccase von *P. ostreatus* (*P. ostreatus* - 2) bei 0,1 mM (62 %) und 1,0 mM (7 %). Im Gegensatz dazu ist das Isoenzym (*P. ostreatus* - 1) wesentlich unempfindlicher gegen den Einfluss des Eisen(III)-salzes. Die Laccase von *T. versicolor* wird bei einer geringen FeCl₃-Konzentration leicht aktiviert. Die anderen Laccasen zeigen eine vergleichbare Inhibierung. Die relative Aktivität liegt bei einer Fe³⁺-Konzentration von 0,1 mM zwischen 55 und 101 % und bei einer Konzentration von 1,0 mM zwischen 33 und 66 %.

Kupfersulfat ist das einzige Metallsalz, dass auch bei höheren Konzentrationen bei allen Laccasen, außer bei der Laccase von *H. tessulatus*, nur einen sehr geringen oder gar keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme zeigt. Bei einigen Laccasen ist sogar eine Steigerung der Aktivität erkennbar, die bei der Laccase von *H. erinaceus* bei einer CuSO₄-Konzentration von 10 mM sehr stark ausgeprägt ist. Hier wird eine Steigerung der Aktivität auf 192 % erreicht. Bei den Laccasen von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 1), *C. maxima*, *G. frondosa* (*G. frondosa* - 1), *H. coralloides*, *P. ostreatus* (*P. ostreatus* - 1 und *P. ostreatus* - 2) und *T. versicolor* liegt die gesteigerte relative Enzymaktivität zwischen 102 und 125 %.

Zink- und Manganchlorid zeigen jeweils ähnliche Einflüsse auf die isolierten Laccasen. Mit steigender Konzentration erfolgt eine zunehmende Inhibierung der Enzyme. Teilweise werden die Laccasen jedoch auch von geringen Konzentrationen der beiden Salze (0,1 mM) bis zu einer relativen Aktivität von 110 % aktiviert.

Tabelle 17 zeigt den Vergleich mit Literaturdaten in Bezug auf den Einfluss verschiedener Metallsalze auf die Enzymaktivität der Laccasen von *G. frondosa* und *P. ostreatus* [167,175].

Tabelle 17: Einfluss verschiedener Metallsalze auf die Enzymaktivität von *G. frondosa* und *P. ostreatus* im Vergleich mit Literaturdaten [167,175]

		<i>G. frondosa</i>			<i>P. ostreatus</i>		
		Ermittelt		Literatur	Ermittelt		Literatur
		Laccase 1	Laccase 2		Laccase 1	Laccase 2	
MgCl ₂	1,0 mM	87,9 %	80,1 %	100 %	98,9 %	85,9 %	110 %
CaCl ₂	1,0 mM	89,2 %	77,7 %	k.A.	99,9 %	104,0 %	100 %
CuSO ₄	1,0 mM	111,3 %	92,0 %	97,1 %	103,1 %	110,9 %	85 %
	10 mM	111,5 %	90,2 %	92,9 %	106,7 %	102,2 %	k.A.
ZnCl ₂	1,0 mM	81,9 %	83,2 %	100 %	98,4 %	101,9 %	110 %

Die in der Literatur beschriebene Laccase von *G. frondosa* zeigt höhere Resistenzen gegen den Einfluss von MgCl₂ und ZnCl₂. In Bezug auf Cu²⁺-Ionen wird das Isoenzym *G. frondosa* - 2 stärker inhibiert, während *G. frondosa* - 1 aktiviert wird. Bei den Laccasen von *P. ostreatus* ist

ein ähnlicher Trend zu erkennen. Die in der Literatur beschriebene Laccase wird durch 1,0 mM CuSO_4 inhibiert, während die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Isoenzyme leicht aktiviert werden. Die aktivierende Wirkung von ZnCl_2 ist bei diesen Isoenzymen im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen Laccase nicht zu beobachten.

4.4.6 Einfluss von Inhibitoren auf die Aktivität der Laccasen

Enzyme können auf unterschiedliche Art und Weise durch verschiedene Inhibitoren gehemmt werden. Es wurden daher Vertreter von Inhibitoren ausgewählt, die typische Veränderungen an Proteinen bewirken. Hierzu zählen Substanzen (z.B. L-Cystein, Dithiothreitol (DTT)), die die Disulfidbrücken der Enzyme reduzieren, sodass die Faltung aufgelöst wird. Die Tertiär- und Quartärstruktur von Enzymen wird ebenso durch die Einwirkung von Detergenzien (z.B. Natriumdodecylsulfat (SDS)) aufgelöst.

Durch Oxidationsmittel (z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2)) kann es leicht zur Oxidation von Thiolgruppen im Enzym kommen, sodass es auch hierbei zur Auflösung der Proteinfaltung kommt.

Anionen wie beispielsweise Azid inhibieren schwermetallhaltige Enzyme durch Bindung an das aktive Zentrum. Die Kupferatome im aktiven Zentrum der Laccasen werden ebenso durch Komplexbildner (z.B. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)) komplexiert, sodass eine Substratbindung verhindert wird [164,188,189].

In Abbildung 42 ist der Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Aktivität der isolierten Laccasen dargestellt. Dabei dient die Enzymaktivität ohne Zusatz einer Inhibitorlösung bei dem zuvor bestimmten pH- und Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms als 100 %-Referenz für die anderen Aktivitäten.

Die Inhibierung der Laccasen durch die betrachteten Inhibitoren ist konzentrationsabhängig. Die Zugabe von H_2O_2 und EDTA führt erst ab einer Konzentration von 10 mM zu einer merklichen Inhibierung. Bei geringeren Konzentrationen wird sogar teilweise eine leichte Aktivierung der Laccasen beobachtet.

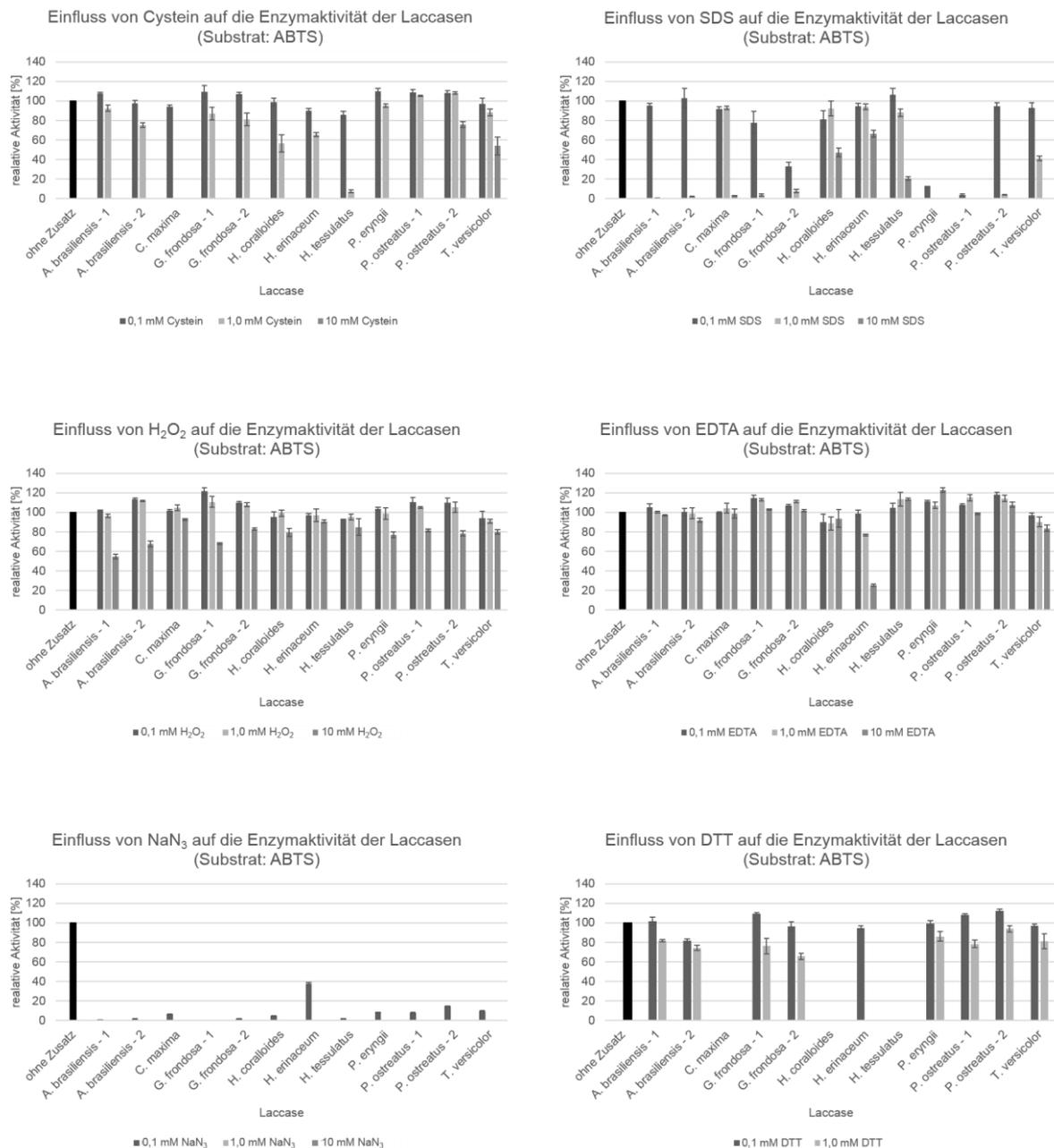


Abbildung 42: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Enzymaktivitäten der isolierten Laccasen (Substrat: ABTS)

Der Einfluss von Cystein, SDS und DTT auf die Aktivität der Enzyme ist stark von der Laccase abhängig. Während die Laccasen von *C. maxima*, *H. coralloides* und *H. tessulatus* durch Reduktionsmittel (DTT und Cystein) vollständig (0,1 mM DTT) bzw. erheblich (1,0 mM Cystein) inhibiert werden, sind sie im Gegensatz zu den anderen Laccasen relativ unempfindlich gegen geringe SDS-Konzentrationen. Hier erfolgt erst bei einer Konzentration von 10 mM eine nahezu vollständige Inhibierung.

Die stärkste Inhibierung aller betrachteten Laccasen wird durch den Zusatz von Natriumazid erreicht. Hier führt eine Konzentration von 0,1 mM bereits zu einer Inhibierung zwischen 62 %

und 100 %. Bei höheren Konzentrationen wird bei allen Laccasen eine vollständige Inhibierung beobachtet.

Der Einfluss verschiedener Inhibitoren wurde bisher für Laccasen von *G. frondosa* und *P. ostreatus* untersucht (Tabelle 18) [167,190].

Tabelle 18: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Enzymaktivität der Laccasen von *G. frondosa* und *P. ostreatus* im Vergleich mit Literaturdaten [167,190]

		<i>G. frondosa</i>			<i>P. ostreatus</i>		
		Ermittelt		Literatur	Ermittelt		Literatur
		Laccase 1	Laccase 2		Laccase 1	Laccase 2	
Cystein	1,0 mM	86,8 %	81,2 %	88,8 %	104,9 %	108,2	k.A.
	10 mM	0 %	0 %	53,8 %	0 %	75,9 %	k.A.
EDTA	1,0 mM	112,8 %	111,0 %	100 %	114,9 %	114,1 %	k.A.
	10 mM	102,8 %	101,5 %	91,3 %	98,4 %	107,6 %	45 %
NaN ₃	0,1 mM	0 %	1,9 %	0,64 %	7,5 %	14,5 %	5 %
	1,0 mM	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	k.A.
DTT	0,1 mM	109,4 %	96,5 %	k.A.	108,0	112,3	0 %
	1,0 mM	76,2 %	65,5 %	94,8 %	78,3 %	93,7 %	k.A.

Beim Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten und den Literaturdaten zeigen sich bei den Laccasen von *P. ostreatus* große Unterschiede in Bezug auf die inhibierende Wirkung von 10 mM EDTA, 0,1 mM NaN₃ und 0,1 mM DTT, sodass die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Isoenzyme wesentlich unempfindlicher gegenüber den betrachteten Inhibitoren sind. Die Laccasen von *G. frondosa* zeigen geringe Unterschiede in der Inhibierung durch die verschiedenen Inhibitoren.

4.4.7 Bestimmung der kinetischen Parameter der Laccasen

Die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen wird neben dem pH-Wert, der Ionenstärke und der Temperatur ebenso vom umgesetzten Substrat als auch von dessen Konzentration bestimmt. Im Gegensatz zu chemischen Reaktionen kann die Reaktionsgeschwindigkeit enzymatisch-katalysierter Reaktionen nicht durch eine Erhöhung der Konzentration der Edukte beliebig gesteigert werden. Vielmehr tritt bei der Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration üblicherweise eine hyperbolische Kurve auf, die sich asymptotisch an die maximale Umsatzgeschwindigkeit v_{\max} annähert [191]. Dieser Zusammenhang wird als Michaelis-Menten-Kinetik bezeichnet und ist

stellvertretend für die isolierten Laccasen anhand der Laccase von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 1) mit dem Substrat ABTS in Abbildung 43 dargestellt.

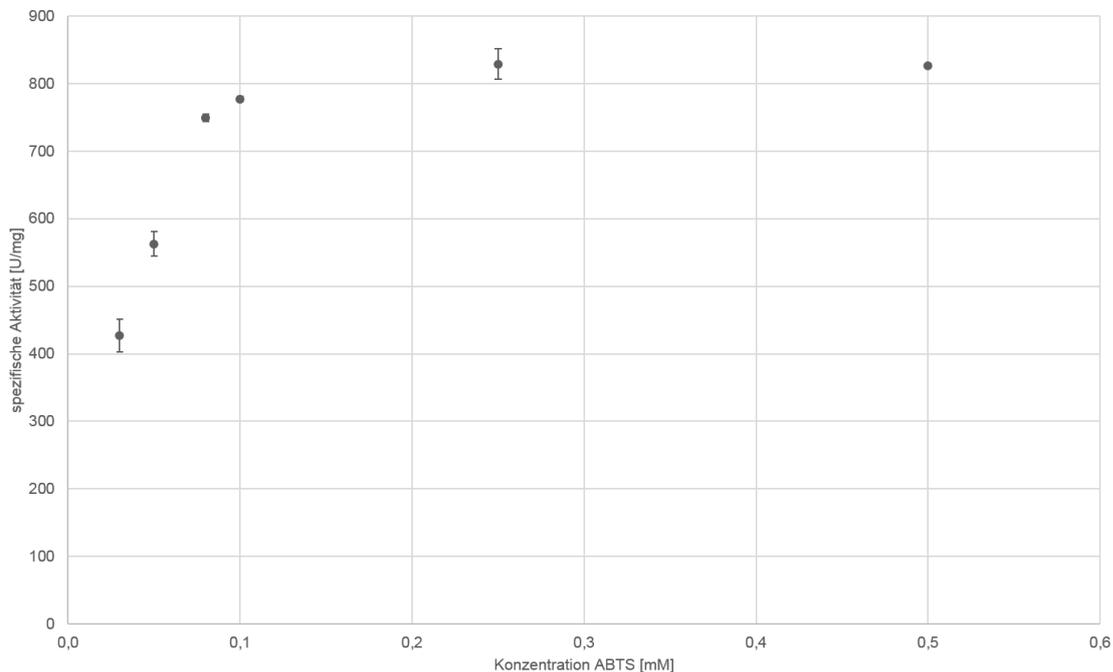


Abbildung 43: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration bei der Laccase von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 1) (Substrat: ABTS)

Die Substratkonzentration bei der unter den gegebenen Bedingungen die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, wird als Michaelis-Konstante (K_m) bezeichnet. Ein hoher K_m -Wert besagt, dass eine hohe Substratkonzentration erforderlich ist, um die halbe maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Somit ist K_m ein Maß für die Affinität eines Enzyms zum betrachteten Substrat [182,191].

Durch die Auftragung der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der reziproken Substratkonzentration nach Lineweaver und Burk werden die in Abbildung 44 dargestellten Diagramme für die Laccase von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 1) erhalten, aus deren Achsenabschnitten die Michaelis-Konstante K_m und die maximale Umsatzgeschwindigkeit v_{max} aller isolierten Laccasen berechnet werden. Die Diagramme der anderen Laccasen sind im Anhang dargestellt.

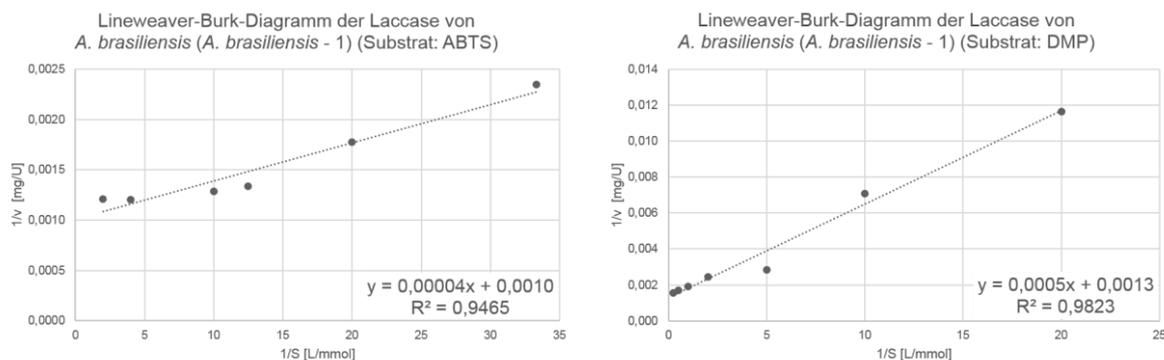


Abbildung 44: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 1) mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)

Die durch Extrapolation erhaltenen Werte für die Michaelis-Konstante (K_m) und die maximale Umsatzgeschwindigkeit (v_{max}) sind in Tabelle 19 (Substrat: ABTS) und Tabelle 20 (Substrat: DMP) dargestellt. Des Weiteren zeigen die Tabellen die kinetischen Kenngrößen für bereits in der Literatur beschriebene Isoenzyme.

Tabelle 19: K_m - und v_{max} -Werte der isolierten Laccasen mit dem Substrat ABTS

Laccase	K_m [$\mu\text{mol/L}$] (ABTS)		v_{max} [U/mg] (ABTS)		
	Ermittelt	Literatur	Ermittelt	Literatur	
<i>Agaricus brasiliensis</i> - 1	37,8	63 [165]	993,1	1026	[165]
<i>Agaricus brasiliensis</i> - 2	20,2		125,5		
<i>Clitocybe maxima</i>	90,7	61,7 [166]	7,7	-	-
<i>Grifola frondosa</i> - 1	38,3	13,7 [167]	728,5	-	-
<i>Grifola frondosa</i> - 2	21,4		110,8		
<i>Hericiium coralloides</i>	143,1	-	56,5	-	-
<i>Hericiium erinaceus</i>	209,3	-	1,1	-	-
<i>Hypsizygyus tessulatus</i>	55,2	-	19,8	-	-
<i>Pleurotus eryngii</i>	21,4	-	2,4	-	-
<i>Pleurotus ostreatus</i> - 1	44,5	110,0 [178] 90,0 [176]	107,0	11,0	[178]
<i>Pleurotus ostreatus</i> - 2	20,0	120,0 [176] 280,0 [176]	187,3		
<i>Trametes versicolor</i>	6,2	12,8 [179] 37,3 [187]	117,5	8125,4 [179] 310,0 [187]	

Tabelle 20: K_m - und v_{max} -Werte der isolierten Laccasen mit dem Substrat DMP

Laccase	K_m [$\mu\text{mol/L}$] (DMP)		v_{max} [U/mg] (DMP)		
	Ermittelt	Literatur	Ermittelt	Literatur	
<i>Agaricus brasiliensis</i> - 1	401,0	-	771,9	-	-
<i>Agaricus brasiliensis</i> - 2	306,6	-	107,3	-	-
<i>Clitocybe maxima</i>	662,4	-	6,4	-	-
<i>Grifola frondosa</i> - 1	396,9	608,0	541,0	-	-
<i>Grifola frondosa</i> - 2	411,9		97,9		
<i>Hericium coralloides</i>	360,7	-	18,9	-	-
<i>Hericium erinaceus</i>	67,8	-	1,3	-	-
<i>Pleurotus eryngii</i>	728,6	1400,0 400,0	0,8	54,2 3,3	[172]
<i>Pleurotus ostreatus</i> - 1	4593,3	430,0 2100,0	25,7	8,37	[178]
<i>Pleurotus ostreatus</i> - 2	3306,4	740,0 230,0	2,3		
<i>Trametes versicolor</i>	239,6	14,5	312,0	182,2	[187]

Die erhaltenen Michaelis-Konstanten variieren sehr stark zwischen den einzelnen isolierten Enzymen. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass alle Laccasen eine höhere Affinität zum Substrat ABTS, als zum Substrat DMP aufweisen. Die Isoenzyme von *A. brasiliensis*, *G. frondosa*, und *P. ostreatus* unterscheiden sich ebenfalls beträchtlich. So weist die Laccase *A. brasiliensis* - 1 mit dem Substrat ABTS eine nahezu doppelt so große Michaelis-Konstante als das Isoenzym *A. brasiliensis* - 2 auf. Mit dem Substrat DMP erreicht die Laccase *A. brasiliensis* - 1 ebenfalls eine höhere Konstante. Unterschiede zwischen den Isoenzymen sind auch bei den Laccasen von *G. frondosa* und *P. ostreatus* zu beobachten. Während die Laccase *P. ostreatus* - 2 höhere Affinitäten zu beiden Substraten als das Isoenzym *P. ostreatus* - 1 aufweist, zeigt das Isoenzym *G. frondosa* - 1 eine höhere Affinität zu DMP als die Laccase *G. frondosa* - 2, während die Affinität zum Substrat ABTS bei *G. frondosa* - 2 höher ist.

Die isolierten Laccasen der verschiedenen Pilze wurden erfolgreich hinsichtlich des pH- und Temperaturoptimums sowie hinsichtlich ihrer Robustheit gegen unterschiedliche Metallsalz- und Inhibitorlösungen charakterisiert. Ebenso konnten die Molekülmassen sowie die isoelektrischen Punkte gelelektrophoretisch bestimmt werden.

Bei der Charakterisierung keine Laccase gefunden werden, die sich als besonders robust im Vergleich zu den anderen Laccasen zeigte. Daher wurde die Laccase *A. brasiliensis* - 1 für die Abbauprobungen ausgewählt.

4.5 Charakterisierung der Manganperoxidase von *Calocera viscosa*

Die isolierte Manganperoxidase des Pilzes *C. viscosa* ist bislang nicht in der Literatur beschrieben.

Die Charakterisierung dieser Manganperoxidase erfolgte analog zur Charakterisierung der zuvor beschriebenen Laccasen (vgl. Kapitel 4.4) anhand verschiedener Parameter unter Verwendung zweier Substrate. Im Gegensatz zu der Charakterisierung der Laccasen wurde neben dem Substrat ABTS das Substrat Mn(II)-malonat eingesetzt. Die Charakterisierung umfasste die Aufnahme von UV/VIS-Spektren, gelelektrophoretische Bestimmungen (IEF und SDS-PAGE) sowie die Ermittlung des Einflusses von pH-Wert und Temperatur, als auch verschiedener Inhibitoren und Metallsalze. Außerdem erfolgte die Bestimmung der kinetischen Parameter für beide Substrate. Anhand dieser Charakterisierung lassen sich, ebenso wie bei den isolierten Laccasen, Aussagen über die optimalen Bedingungen für den Einsatz dieser Enzyme zum Abbau von Ligninmodellsubstanzen als auch der Ablaugen treffen.

4.5.1 UV/VIS-Spektrum der Manganperoxidase

Da es sich bei der Manganperoxidase von *C. viscosa* um ein Häm-haltiges Glycoprotein handelt (vgl. Kapitel 2.2.3), weist das UV/VIS-Spektrum dieses Enzyms eine Soret-Bande im Bereich von 400 nm auf (Abbildung 45).

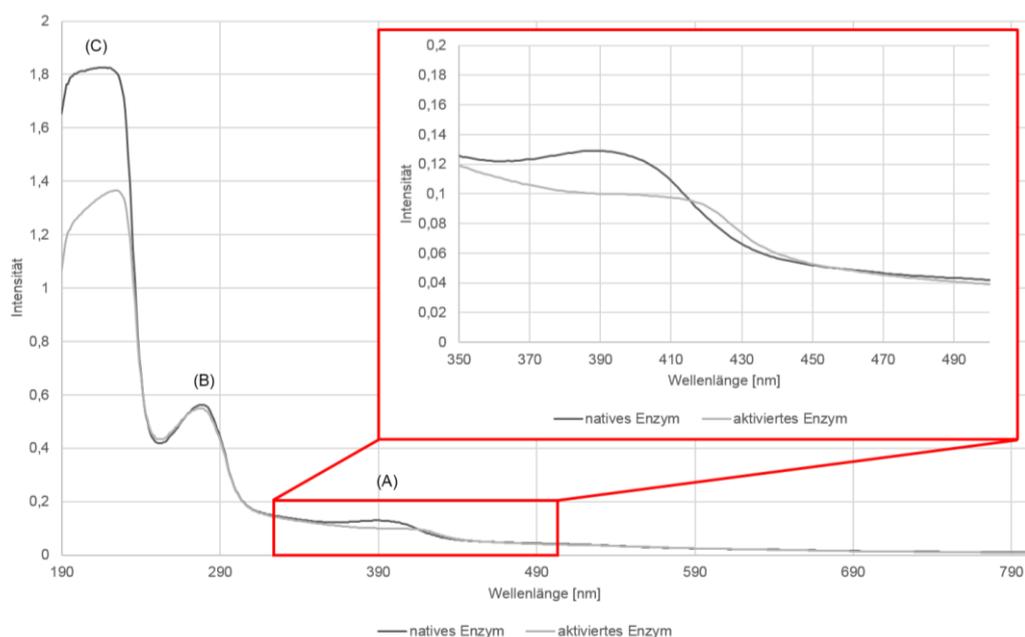


Abbildung 45: UV/VIS-Spektren der Manganperoxidase von *C. viscosa*

(A): Soret-Bande; (B): aromatische Aminosäuren; (C): Peptidbindungen
Die vergrößerte Darstellung zeigt den Wellenlängenbereich der Soret-Bande.

Das Absorptionsspektrum des nativen Enzyms zeigt ein Maximum bei 394 nm. Durch die Zugabe von H_2O_2 kommt es zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums, sodass dieses bei 414 nm liegt.

4.5.2 Molekulargewicht und isoelektrische Fokussierung

Fas Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt der Manganperoxidase von *C. viscosa* wurde mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE und IEF) bestimmt. Die SDS-PAGE zeigte ein Molekulargewicht von 65 kDa (Abbildung 46).

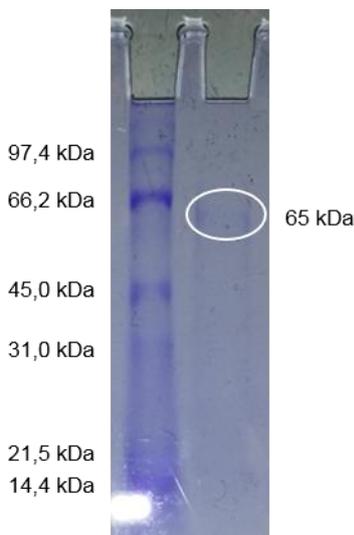


Abbildung 46: SDS-PAGE der Manganperoxidase von *C. viscosa*

Üblicherweise liegt das Molekulargewicht von Manganperoxidasen bei 32 – 62,5 kDa [107,115]. Die Manganperoxidase von *C. viscosa* weist somit ein relativ hohes Molekulargewicht im Vergleich mit anderen Manganperoxidasen auf.

Der isoelektrische Punkt (pI) der Manganperoxidase von *C. viscosa* beträgt 3,2. Dieser Wert ist typisch für Manganperoxidasen. Üblicherweise liegt der pI zwischen 2,9 und 7,1, meist bei 3,0 bis 4,0 [107,116].

4.5.3 pH-Optimum und pH-Stabilität

Abbildung 47 zeigt die pH-Profile der Manganperoxidase von *C. viscosa* mit den Substraten ABTS und Mn(II)-malonat. Dabei dient die Enzymaktivität am pH-Optimum jeweils als 100 %-Referenz für die anderen Aktivitäten.

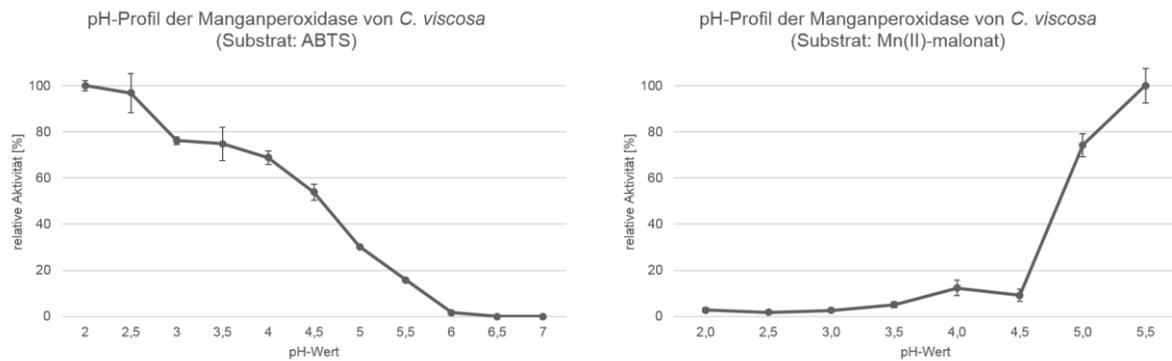


Abbildung 47: pH-Profile der Manganperoxidase von *C. viscosa* mit verschiedenen Substraten
(links: ABTS; rechts: Mn(II)-malonat)

Die pH-Profile der Manganperoxidase mit den beiden Substraten ABTS und Mn(II)-malonat unterscheiden sich erheblich. So zeigt die Manganperoxidase mit dem Substrat ABTS ein pH-Optimum bei pH 2,0. Mit steigendem pH-Wert nimmt die relative Enzymaktivität stetig ab, bis das Enzym ab einem pH-Wert von 6,0 nahezu vollständig denaturiert ist.

Im Gegensatz dazu zeigt das pH-Profil der Manganperoxidase von *C. viscosa* mit dem Substrat Mn(II)-malonat in einem pH-Bereich von pH 2,0 bis pH 4,5 eine relative Enzymaktivität zwischen 2 % und 12 %. Danach erfolgt ein sprunghafter Anstieg der Enzymaktivität, sodass das pH-Optimum bei pH 5,5 liegt. Dieses entspricht den pH-Optimum anderer in der Literatur beschriebener Manganperoxidasen, die ein pH-Optimum von 4,5 bis 6,0 mit dem Substrat Mn(II)-malonat aufweisen [192-197]. Oberhalb von pH 5,5 kommt es zur Bildung eines weißen Niederschlags. Aufgrund der enthaltenen Mn(II)-Ionen davon ausgegangen, dass es sich bei diesem Niederschlag um Manganhydroxid handelt.

Die pH-Stabilität der Manganperoxidase von *C. viscosa* mit dem Substrat ABTS ist in Abbildung 48 dargestellt.

Die Manganperoxidase von *C. viscosa* zeigt insbesondere bei pH 2,0 einen Anstieg der Enzymaktivität. Ebenso wie bei der Laccase von *A. brasiliensis* (vgl. Kapitel 0) wird auch hier von einer Rekonstituierung des Enzyms in diesem Zeitraum ausgegangen. Mit fortlaufender Inkubationszeit ist bei allen pH-Werten ein Abfall der Enzymaktivität zu beobachten. Nach 72 Stunden weisen die Inkubationslösungen bei pH 2,0 bis pH 5,0 ähnliche Aktivitäten auf. Die während der gesamten Inkubation in den Lösungen mit pH 6,0 und pH 7,0 gemessenen, allerdings sehr geringen Enzymaktivitäten bleiben über eine Inkubationszeit von 48 Stunden konstant.

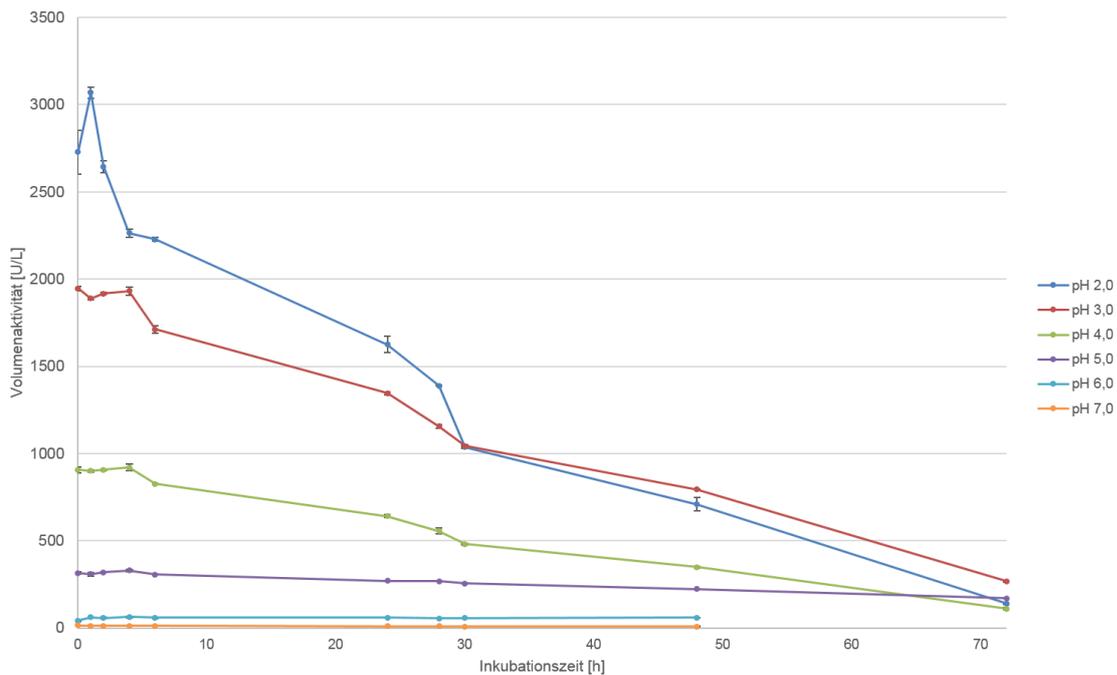


Abbildung 48: pH-Stabilität der Manganperoxidase von *C. viscosa* (Substrat: ABTS)

4.5.4 Temperaturoptimum und Temperaturstabilität

In Abbildung 49 sind die Temperaturprofile der Manganperoxidase von *C. viscosa* mit den Substraten ABTS und Mn(II)-malonat dargestellt. Die Enzymaktivität am Temperaturoptimum dient jeweils als 100 %-Referenz für die anderen Aktivitäten.

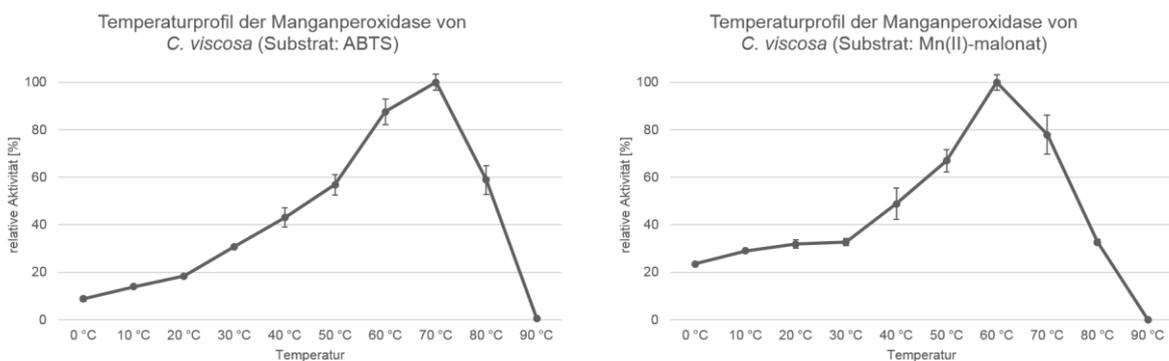


Abbildung 49: Temperaturprofile der Manganperoxidase von *C. viscosa* mit verschiedenen Substraten (links: ABTS; rechts: Mn(II)-malonat)

Die Unterschiede zwischen den beiden Temperaturprofilen der Manganperoxidase von *C. viscosa* sind marginal. Lediglich das Temperaturoptimum mit dem Substrat ABTS liegt mit 70 °C ein wenig höher als mit dem Substrat Mn(II)-malonat (60 °C). Mit beiden Substraten ist nach Erreichen des Optimums ein starker Abfall der Enzymaktivität zu beobachten. Bei 90 °C ist die Manganperoxidase in beiden Fällen vollständig inaktiviert. Bei Temperaturen von 0 °C

bis zum Erreichen des Temperaturoptimums erfolgt eine stetige Erhöhung der relativen Aktivität.

Das ermittelte Temperaturoptimum der Manganperoxidase liegt im Bereich der Temperaturoptima anderer Manganperoxidasen, die Optima zwischen 35 °C und 60 °C mit dem Substrat Mn(II)-malonat aufweisen [192-194].

Die längerfristigen Auswirkungen der Temperatur auf die Aktivität der Manganperoxidase von *C. viscosa* sind in Abbildung 50 für die Temperaturen von 30 °C bis 80 °C dargestellt. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Temperaturen zu gewährleisten, wurde die Volumenaktivität, die bei der jeweiligen Temperatur zu Beginn gemessen wurde, als 100 %-Referenz für die nachfolgend gemessenen Aktivitäten verwendet.

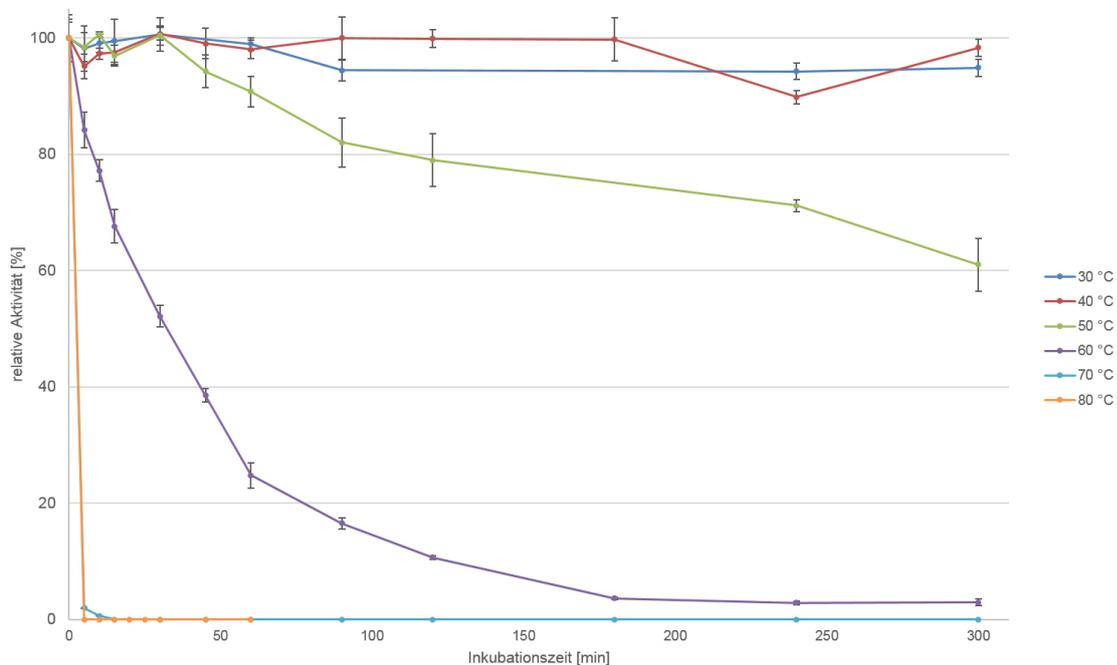


Abbildung 50: Temperaturstabilität der Manganperoxidase von *C. viscosa* (Substrat: ABTS)

Die Stabilität der Manganperoxidase wird stark durch die Temperatur beeinflusst. Bei Temperaturen von 30 °C und 40 °C ist keine signifikante Abnahme der Enzymaktivität über einen Zeitraum von sechs Stunden zu beobachten. Bei 50 °C kann nach sechs Stunden lediglich eine relative Aktivität von 61,0 % gemessen werden. Mit steigender Temperatur beschleunigt sich die Enzyminaktivierung erheblich, sodass bei einer Temperatur von 60 °C, die dem Temperaturoptimum entspricht, bereits nach einer Stunde nur noch eine Restaktivität von 24,8 % vorliegt. Durch Temperaturen von 70 °C bzw. 80 °C erfolgt eine vollständige Inaktivierung bereits nach fünf bis zehn Minuten.

4.5.5 Einfluss von Metallsalzen

Der Einfluss verschiedener Metallsalzlösungen auf die Enzymaktivität der Manganperoxidase von *C. viscosa* ist in Abbildung 51 dargestellt

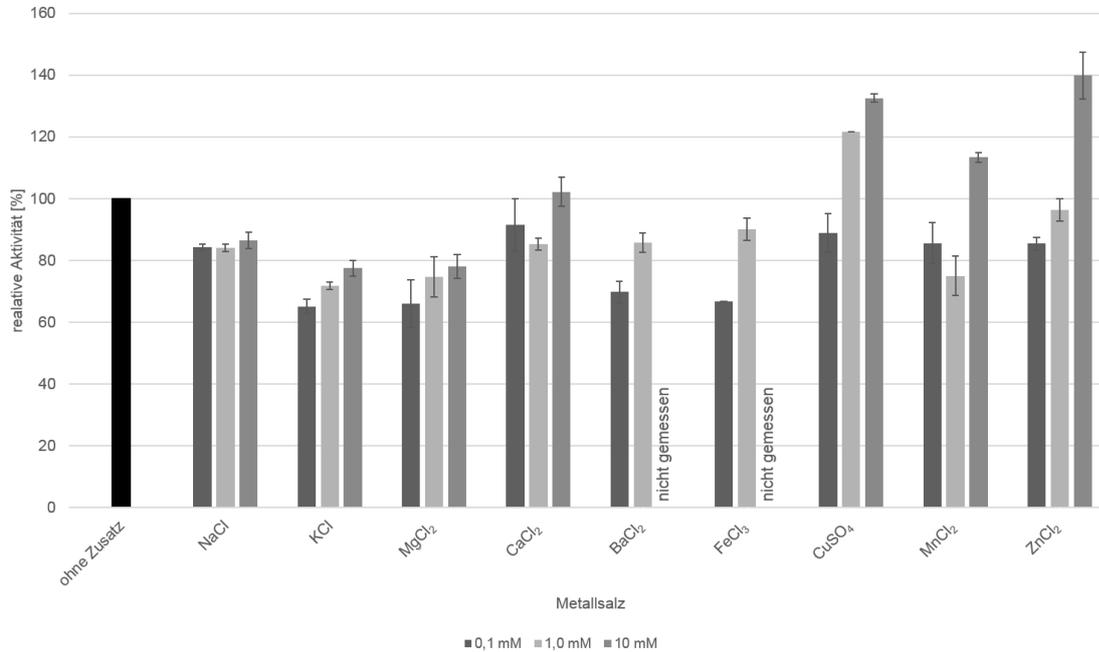


Abbildung 51: Einfluss von Metallsalzen auf die Aktivität der Manganperoxidase von *C. viscosa* (Substrat: ABTS)

Der Einfluss der betrachteten Metallsalze ist konzentrationsabhängig. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Zugabe geringer Konzentrationen aller Metallsalze (0,1 mM) zu einem Aktivitätsverlust von bis zu 34,9 % (KCl) im Vergleich mit dem Test ohne den Zusatz eines Metallsalzes führt. Im Gegensatz dazu steigern höhere Konzentrationen der Salze von Ca²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ und Zn²⁺ die relative Aktivität zum Teil erheblich. Dieser Effekt ist bei der Zugabe von Cu²⁺ und Zn²⁺ besonders ausgeprägt.

Bei einer weiteren Erhöhung der Kupfersulfatkonzentration auf bis zu 100 mM konnte keine weitere Steigerung der relativen Enzymaktivität erreicht werden (Abbildung 52). Somit wird in Bezug auf die Zugabe von Kupfersulfat eine maximale Aktivität bei einer Konzentration von 10 mM erreicht.

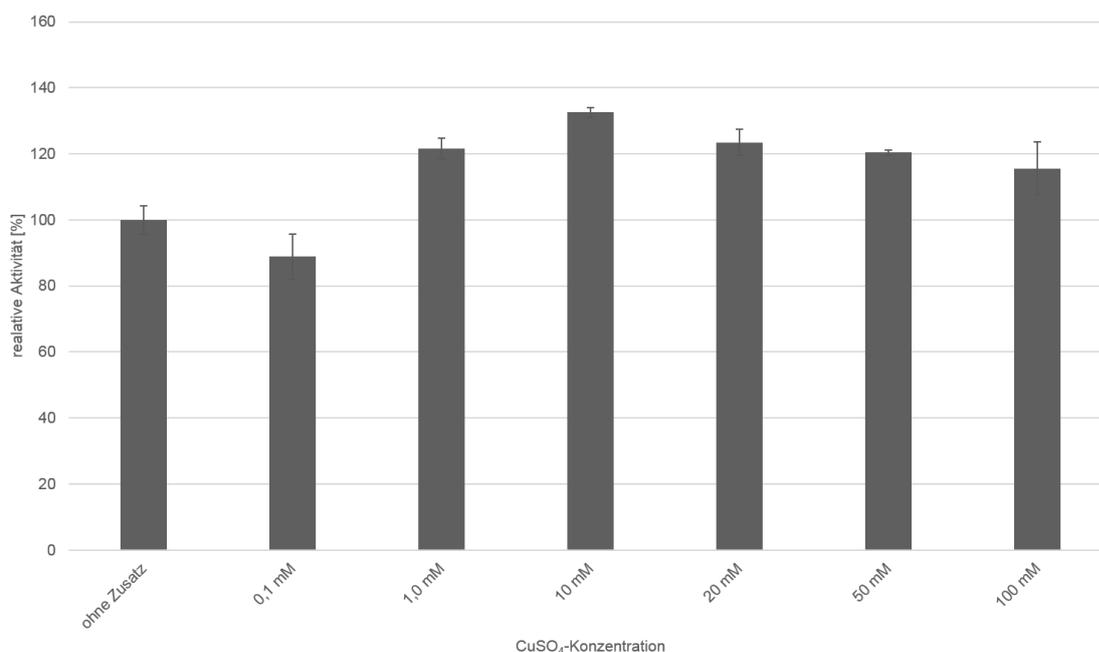


Abbildung 52: Einfluss von Kupfersulfatlösungen verschiedener Konzentrationen auf die Aktivität der Manganperoxidase von *C. viscosa* (Substrat: ABTS)

4.5.6 Einfluss von Inhibitoren

Die Enzymaktivität der Manganperoxidase von *C. viscosa* wird durch verschiedene bekannte Inhibitoren beeinflusst (Abbildung 53).

Der Einfluss verschiedener Inhibitoren ist abhängig von der Wirkungsweise und der Konzentration des Inhibitors. Die Manganperoxidase von *C. viscosa* wird durch das Reduktionsmittel Cystein und durch Azidlösungen, die das schwermetallhaltige aktive Zentrum der Peroxidase hemmen, mit einer Konzentration von 10 mM vollständig inhibiert. Ebenso erfolgt eine nahezu vollständige Inhibierung durch das Detergenz SDS (10 mM). Durch die Zugabe von EDTA-Lösungen verschiedener Konzentration konnte keine Inhibierung festgestellt werden. Vielmehr kommt es durch die Anwesenheit von EDTA zu einer Aktivierung der Manganperoxidase. Dies wird darauf zurückgeführt, dass das durch die Manganperoxidase gebildete Mn^{3+} durch den Komplexbildner EDTA chelatisiert werden. Aufgrund des „Chelat-Effekts“ ist dieser Komplex wesentlich stabiler (Zähigkeit = 6), als ein Mn^{3+} -malonat-Komplex. Die Zugabe des Cofaktors der Manganperoxidase (H_2O_2) zeigt bis zu einer Konzentration von 1 mM ebenfalls einen aktivierenden Einfluss. Bei höheren Konzentrationen bewirkt H_2O_2 jedoch eine Inhibierung von knapp 50 %.

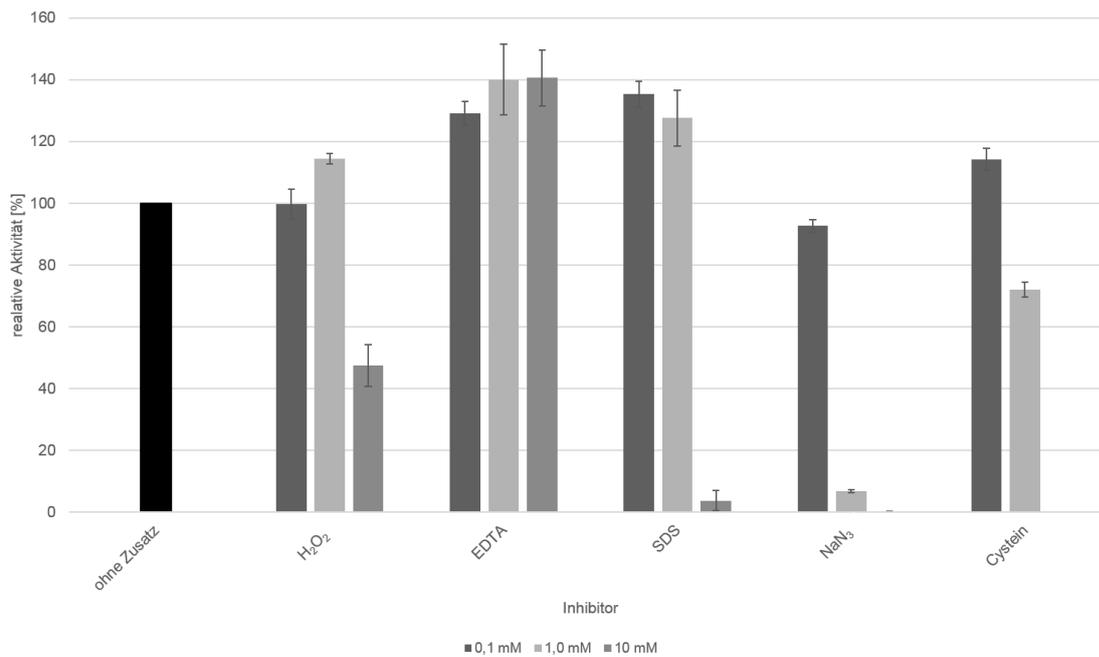


Abbildung 53: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Aktivität der Manganperoxidase von *C. viscosa* (Substrat: ABTS)

Ähnliche Effekte konnten auch bei anderen in der Literatur beschriebenen Manganperoxidasen festgestellt werden. So zeigt H₂O₂ erst ab einer Konzentration von 10 mM eine inhibierende Wirkung auf die Manganperoxidase von *Lentinula edodes*. Bei geringeren H₂O₂-Konzentrationen wird diese Manganperoxidase jedoch nicht aktiviert [197]. Eine Manganperoxidase von *T. versicolor* wird ähnlich wie die hier beschriebene Manganperoxidase von *C. viscosa* durch Cystein (1 mM) inhibiert, zeigt aber auch eine teilweise Inaktivierung durch EDTA [194].

4.5.7 Kinetische Parameter

Die kinetischen Parameter der Manganperoxidase von *C. viscosa* wurden für die Substrate ABTS und Mn(II)-malonat bestimmt. Die ermittelten Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagramme sind in Abbildung 54 dargestellt.

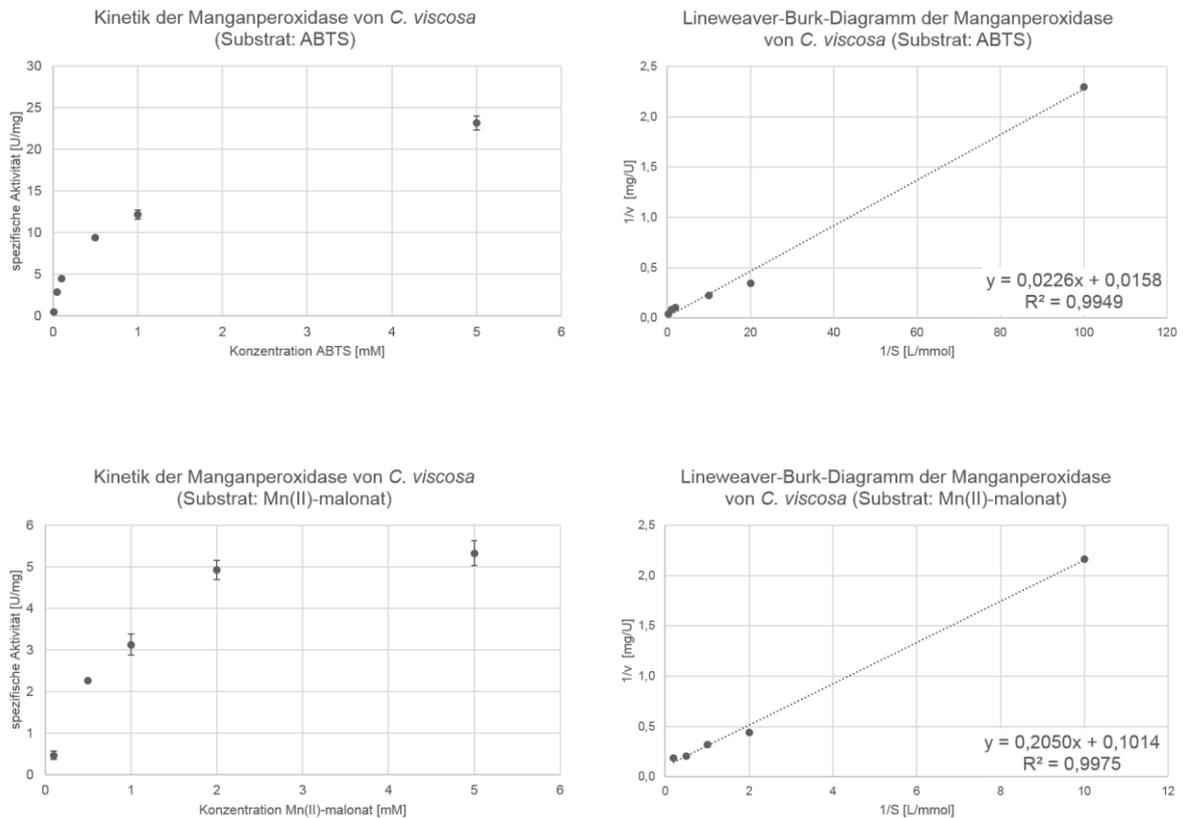


Abbildung 54: Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagramme der Manganperoxidase von *C. viscosa* oben: ABTS; unten: Mn(II)-malonat

Aus den dargestellten Lineweaver-Burk-Diagrammen wurden die K_m - und v_{max} -Werte berechnet (Tabelle 21).

Tabelle 21: K_m - und v_{max} -Werte der Manganperoxidase von *C. viscosa* (Substrate ABTS und Mn(II)-malonat)

Substrat	K_m [$\mu\text{mol/L}$]	v_{max} [U/mg]
ABTS	1428,2	63,3
Mn(II)-malonat	2021,9	9,9

Die Manganperoxidase zeigt aufgrund der niedrigeren Michaelis-Menten-Konstante (K_m) eine höhere Affinität zum Substrat ABTS.

Die in der Literatur beschriebenen Manganperoxidasen weisen geringere K_m -Werte zwischen 17 μM und 400 μM für das Substrat Mn(II)-malonat auf. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit v_{max} der Manganperoxidase von *C. viscosa* ist geringer als die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten anderer Manganperoxidasen (189 U/mg bis 748 U/mg) [193-195,197-200]. Somit ist die Affinität der Manganperoxidase von *C. viscosa* zum Substrat Mn(II)-malonat wesentlich geringer als die Affinität anderer Manganperoxidasen.

4.6 Anwendung der isolierten Enzyme

Prozessablaugen aus der Zellstoffindustrie enthalten hauptsächlich Abbauprodukte des Lignins. Diese aromatischen Oligomere sollen mithilfe ligninolytischer Enzyme soweit abgebaut werden, dass monomere Aromaten erhalten werden, die als Grundbausteine für verschiedene industrielle Anwendungen genutzt werden können.

Da sich keine der isolierten Laccasen als besonders robust im Vergleich zu den anderen Laccasen zeigte, wurde für erste Abbauprobe eine Laccase von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 1) ausgewählt. Des Weiteren wurde die einzige isolierte Manganperoxidase (Manganperoxidase von *C. viscosa*) verwendet. Bei den Abbauprobe erfolgte ausschließlich eine qualitative Bestimmung der gebildeten Produkte.

Vor der Anwendung der isolierten Enzyme auf Abflauge aus der Zellstoff- und Papierindustrie, wurde der Einfluss der Enzyme auf drei verschiedene Ligninmodellsubstanzen untersucht, um die Abbaumechanismen genauer zu betrachten. Im Anschluss daran wurden die Dickflauge aus dem Sulfitverfahren sowie eine Schwarzflauge aus dem Sulfatverfahren mit den Enzymen inkubiert.

4.6.1 Abbau von Ligninmodellsubstanzen mittels der isolierten Enzyme

Die verwendeten Modellsubstanzen sind in Abbildung 55 dargestellt.

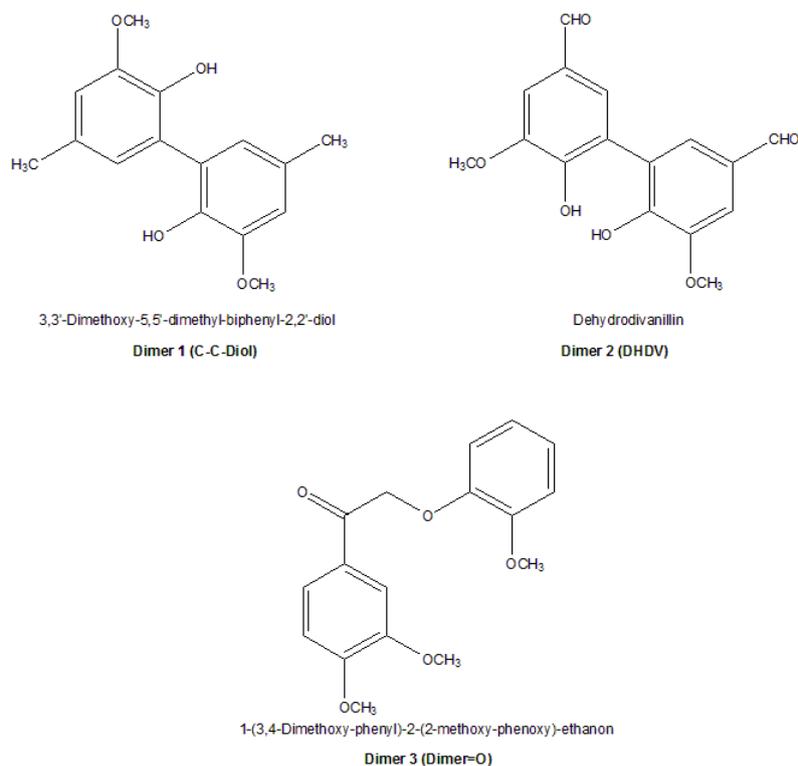


Abbildung 55: verwendete Ligninmodellsubstanzen

Bei den dargestellten Ligninmodellsubstanzen handelt es sich ausschließlich um Dimere. Die Verknüpfungen zwischen den unterschiedlich substituierten Aromaten stellen die häufigsten Bindungstypen des Lignins dar (vgl. Kapitel 2.1.3). Das Dimer 1 (C-C-Diol) und das Dimer 2 (Dehydrodivanillin = DHDV) weisen eine 5-5'-Verknüpfung auf. Das Dimer 3 ist über eine Etherbindung, ähnlich der α - oder β -O-4-Bindung im Lignin, verknüpft. Aufgrund der Ketofunktion am α -Kohlenstoff wird es im Folgenden auch als Dimer=O bezeichnet. Die Dimere 1 und 3 wurden von der Arbeitsgruppe Anorganische Chemie (AK Mohr) der Bergischen Universität Wuppertal zur Verfügung gestellt. Die Synthese von Dimer 2 erfolgte mittels Fentonreaktion aus Vanillin.

4.6.1.1 Synthese der Modellsubstanz Dehydrodivanillin (6,6'-Dihydroxy-5,5'-dimethoxybiphenyl-3,3'-dicarbaldehyd)

Die Synthese der Modellsubstanz Dehydrodivanillin (6,6'-Dihydroxy-5,5'-dimethoxybiphenyl-3,3'-dicarbaldehyd) erfolgte nach Elbs *et al.* aus Vanillin mittels Fentonreaktion (Abbildung 56) [201].

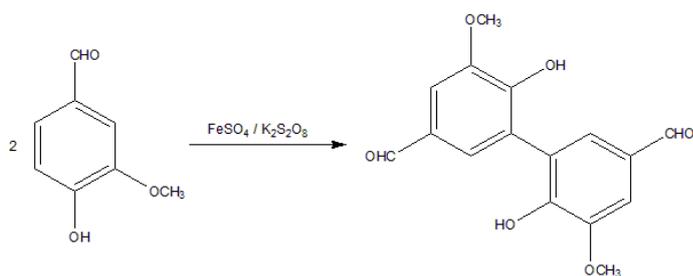


Abbildung 56: Synthese von Dehydrodivanillin aus Vanillin mittels Fentonreaktion

Die Struktur des Produkts wurde mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) (Abbildung 57) und GC-GC-(ToF)MS nach Silylierung (Abbildung 58) bestätigt.

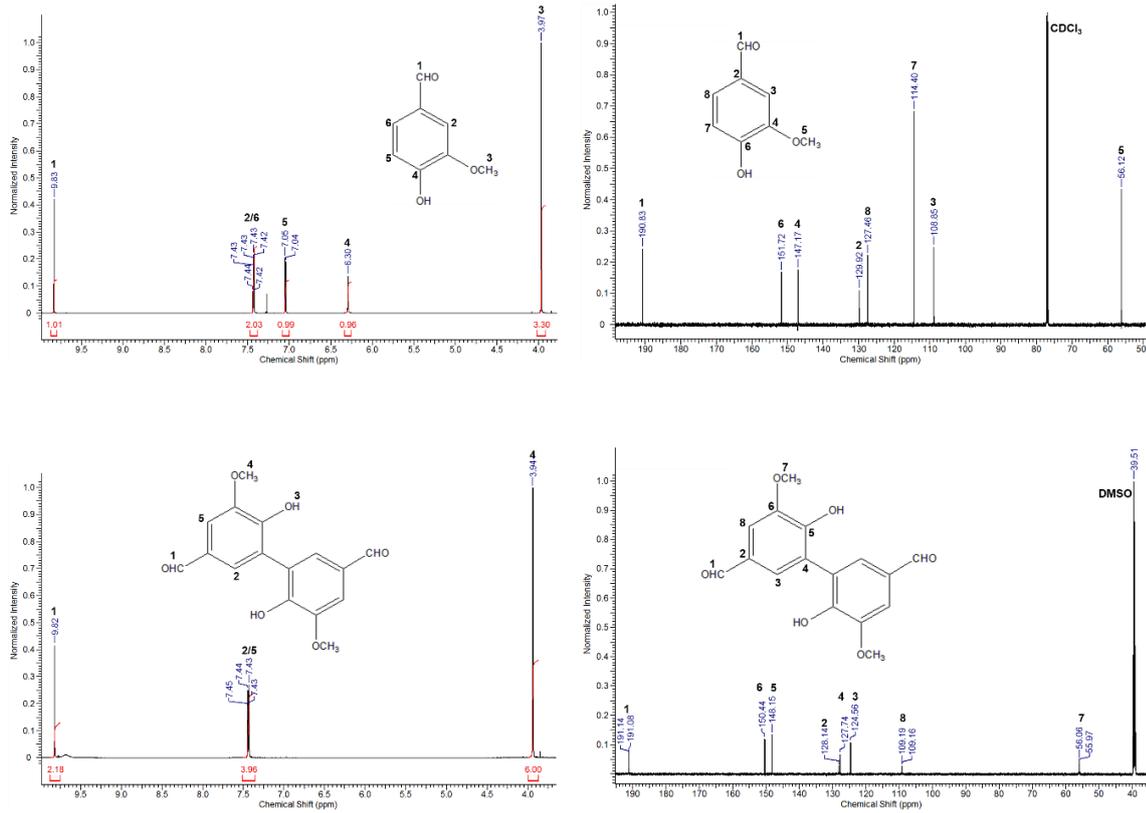


Abbildung 57: Zuordnung der Signale im NMR zu Edukt (oben) und Produkt (unten)

oben: Vanillin: ¹H-NMR (600 MHz CDCl₃): δ (ppm) = 3,97 (s, 3H), 6,30 (s, 1H), 7,04 (m, 2H), 7,42 (m, 2H), 9,83 (s, 1H); ¹³C-NMR (150 MHz CDCl₃): δ (ppm) = 56,12, 108,85, 114,40, 127,46, 129,92, 147,17, 151,72, 190,83

unten: Dehydrodivanillin: ¹H-NMR (600 MHz DMSO-d₆): δ (ppm) = 3,94 (s, 6H), 7,44 (m, 4H), 9,82 (s, 2H); ¹³C-NMR (150 MHz DMSO-d₆): δ (ppm) = 56,06, 109,16, 124,56, 127,74, 128,14, 148,15, 150,44, 191,08

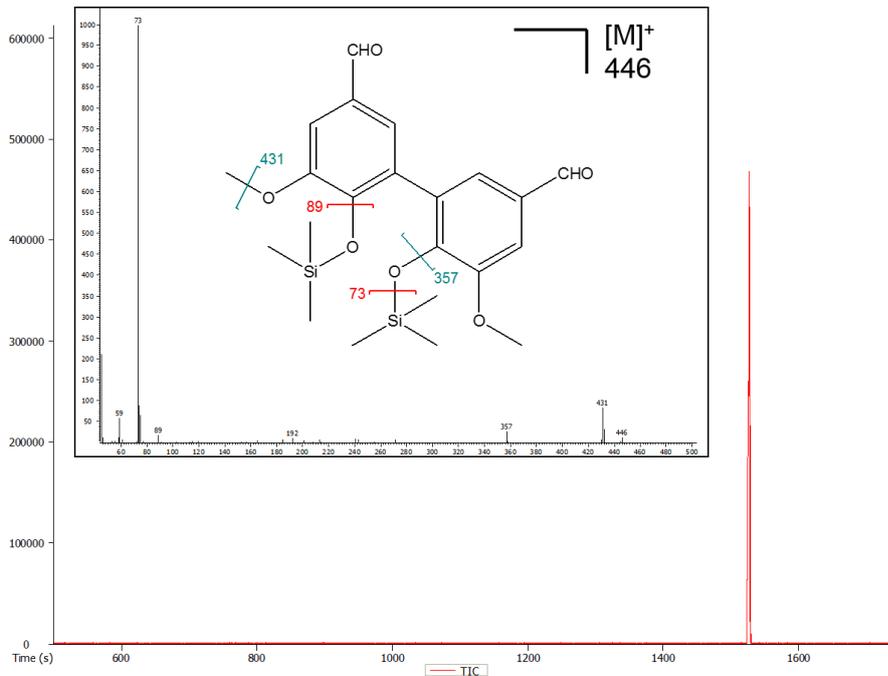


Abbildung 58: GC-MS-Chromatogramm und EI-Massenspektrum von Dehydrodivanillin nach Silylierung mit BSTFA (Methode: vgl. Kapitel 7.2.3)

4.6.1.2 Abbau der Modellschubstanzen mit einer Laccase von *A. brasiliensis*

Um die Abbauprozesse der isolierten Laccasen nachvollziehen zu können und die Leistungsfähigkeit dieser Enzyme zu überprüfen, wurden die zuvor beschriebenen Modellschubstanzen in einer Pufferlösung aufgenommen und mit den Enzymen versetzt.

Hierbei stellte sich heraus, dass durch eine Inkubation der Modellschubstanzen mit den Laccasen ohne weitere Zusätze lediglich Oxidationen am Molekül, jedoch keine Spaltungen, an den Modellverbindungen erreicht werden konnten. Aufgrund des Redoxpotentials der Laccasen musste daher auf den Einsatz eines Mediators zurückgegriffen werden. Als Mediator diente 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), das beim Biobleaching bereits angewendet wird (vgl. Kapitel 2.4). Zur Bleichung werden 10 mg HOBt pro g Zellstoff, der einen Restligningehalt von 4 % aufweist, eingesetzt [124,147]. Daraus resultiert eine Konzentration von 0,4 mg HOBt pro g Lignin, die für den Abbau der Modellschubstanzen und der Prozessabläuge eingesetzt wurde. Die Modellschubstanzen Dehydrodivanillin und 1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-ethanon wurden für eine Woche mit der Laccase von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 1) bei einem pH-Wert von 4,5 in Anwesenheit des Mediators HOBt inkubiert. Ebenfalls erfolgte eine Inkubation der Modellschubstanzen bei gleichem pH-Wert in Anwesenheit von HOBt ohne Zugabe des Enzyms.

In Abbildung 59 sind die Suspensionen nach einer Inkubationszeit von einer Woche gezeigt (jeweils links: ohne Enzym; rechts: mit Enzym).



Abbildung 59: Fotos der Abbauprobungen mit Ligninmodellsubstanzen
links: DHDV, rechts: Dimer=O

Bei allen Ansätzen ist eine Verfärbung der Suspensionen mit Enzym erkennbar. Ohne die Zugabe der Laccase tritt keine Verfärbung auf. Es wird daher davon ausgegangen, dass durch die Einwirkungen der Laccase Veränderungen an allen Modellschubstanzen stattgefunden haben.

Die Identifizierung möglicher Abbauprodukte der drei Dimere erfolgte mittels comprehensiver zweidimensionaler Gaschromatographie gekoppelt mit einem

Flugzeitmassenspektrometer (GCxGC-(Tof)MS) nach Derivatisierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) bzw. *N,O*-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA).

a) Dehydrodivanillin (DHDV)

Das GCxGC-(Tof)MS-Chromatogramm des mit TMSH derivatisierten Abbauersuchs des Dehydrodivanillins mit der Laccase von *A. brasiliensis* unter Verwendung des Mediators HOBT ist in Abbildung 60 gezeigt.

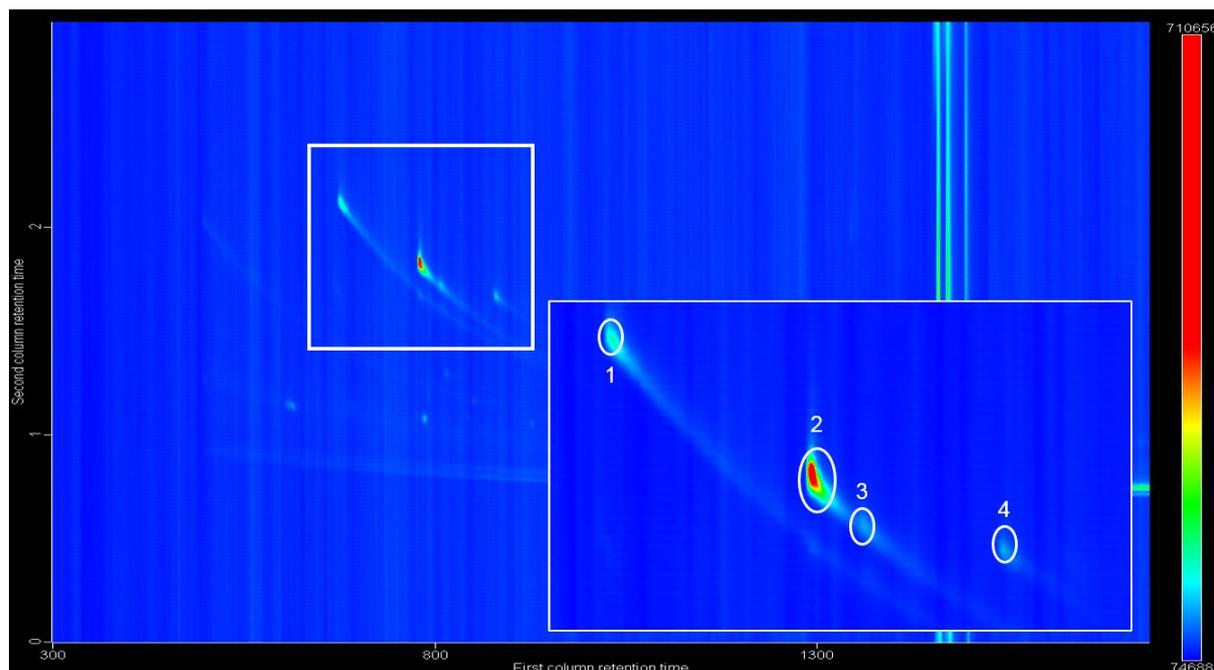


Abbildung 60: GCxGC-(Tof)MS-Chromatogramm des Abbaus von DHDV mit der Laccase von *A. brasiliensis* nach Derivatisierung mit TMSH (Methode: vgl. Kapitel 7.2.4)

Das Chromatogramm zeigt vier deutliche Peaks. Bei dem ersten Peak handelt es sich um ein Derivat des Mediators HOBT. Statt der OH-Gruppe trägt das Benzotriazol eine Methylgruppe. Die Identifizierung erfolgte über den Vergleich mit der NIST-Datenbank (Abbildung 61).

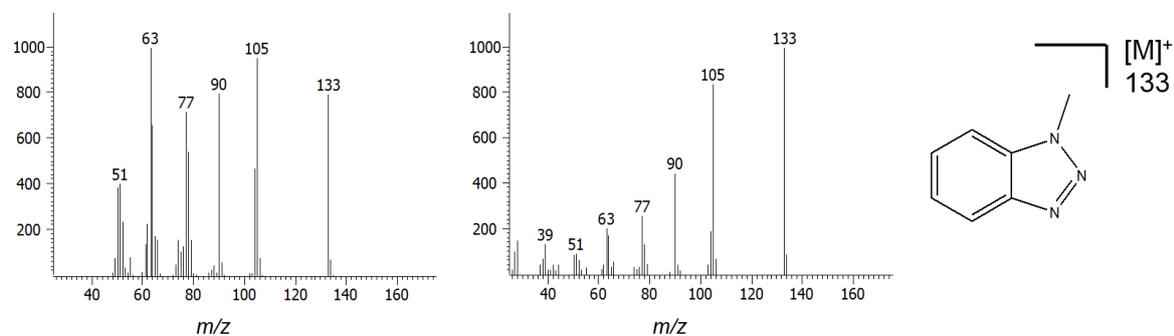


Abbildung 61: Massenspektrum von Peak 1 (links) und Vergleich mit dem Massenspektrum von 1-Methylbenzotriazol (rechts)

Die Peaks 2 und 4 können über einen Vergleich mit der NIST-Datenbank monomeren Aromaten zugeordnet werden, bei denen es sich um Spaltungsprodukte des DHDV handelt. Die Massenspektren dieser Peaks und die zugeordneten Strukturen sind in Abbildung 62 dargestellt.

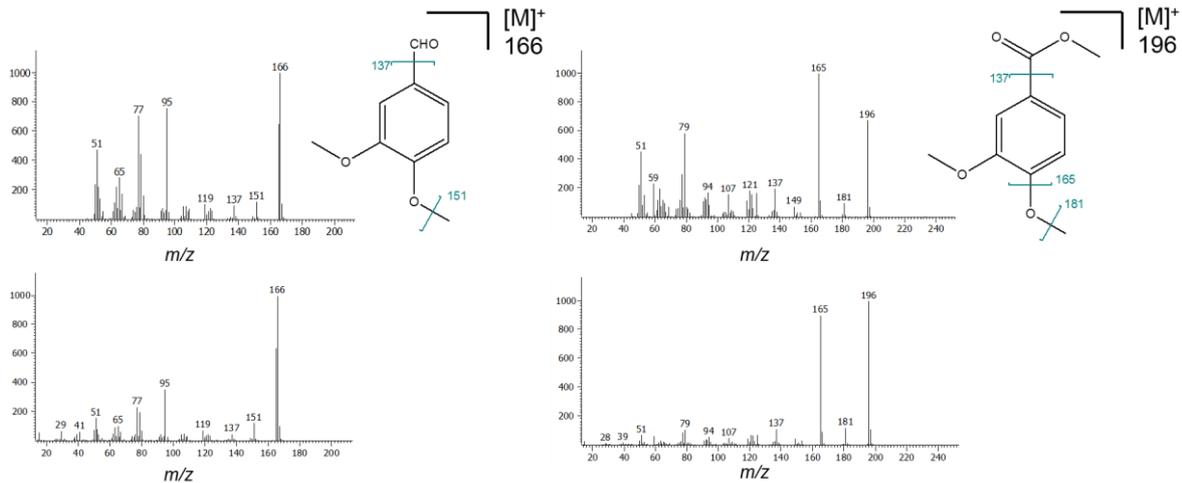


Abbildung 62: Massenspektren der Peaks 2 und 4 (oben) sowie Vergleichsspektren (unten) (DHDV + Laccase von *A. brasiliensis* + HOBT)

Es handelt sich bei den beiden Peaks um 3,4-Dimethoxybenzaldehyd und 3,4-Dimethoxybenzoesäuremethylester. Da die verwendete Derivatisierung mittels TMSH zur Methylierung freier OH-Gruppen führt, kommen verschiedene Verbindungen in Betracht, die bei der Inkubation des Dimers DHDV mit der Laccase von *A. brasiliensis* und HOBT als Mediator gebildet wurden. Diese sind in Abbildung 63 dargestellt.

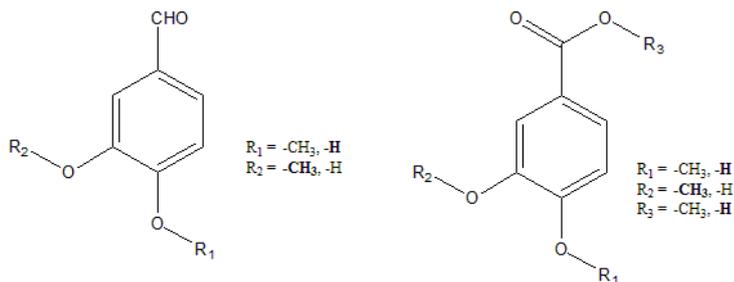


Abbildung 63: Darstellung der Strukturmöglichkeiten

Aufgrund der Struktur des Dimers Dehydrodivanillin ergeben sich mit den fettgedruckten Resten (R₁, R₂, R₃) die wahrscheinlichsten Strukturen der Spaltungsprodukte, sodass davon ausgegangen wird, dass 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (Vanillin) und 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure bei der Spaltung entstanden sind. Andere Strukturen können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Daher wurde der gleiche Abbauersuch ebenfalls mit dem Silylierungsmittel *N,O*-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) derivatisiert. Dabei kommt es zur Silylierung freier OH-Gruppen. Es konnte anhand des erhaltenen GCxGC-(ToF)MS-Chromatogramms gezeigt werden, dass es sich bei den Abbauprodukten des Dehydrodivanillins um 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (Vanillin) und 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure handelt. Die Massenspektren der beiden Produkte sind mit den Vergleichsspektren der NIST-Datenbank in Abbildung 64 dargestellt.

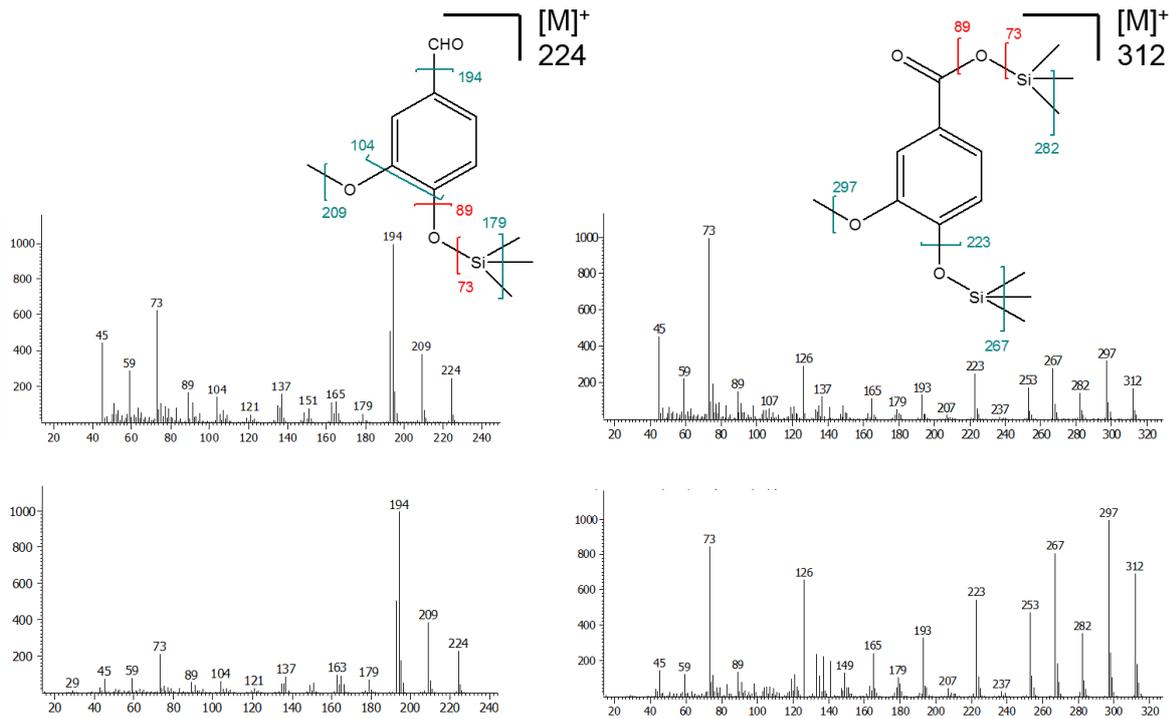


Abbildung 64: Massenspektren von Vanillin (links) und 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure (rechts) beim Abbau von DHDV mit der Laccase von *A. brasiliensis* (oben) sowie Vergleichsspektren (unten)

Das Massenspektrum von Peak 3 ist in Abbildung 65 dargestellt.

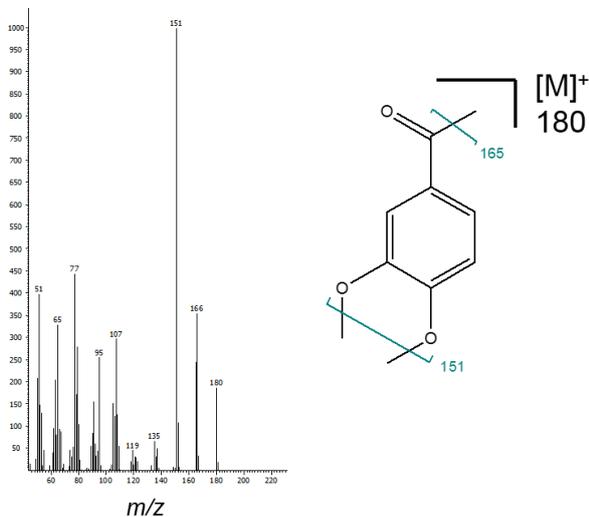


Abbildung 65: Massenspektrum von Peak 3 (DHDV + Laccase von *A. brasiliensis* + HOBt)

Über den Vergleich mit der NIST-Datenbank konnte dem Spektrum keine Struktur zugeordnet werden. Es wird jedoch aufgrund der Fragmentierung davon ausgegangen, dass es sich bei der gesuchten Verbindung um die in Abbildung 65 dargestellte Struktur handelt.

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass es durch die Derivatisierung mit TMSH zur Methylierung der Aldehydfunktion kommt und es sich daher bei dieser Verbindung um methyliertes Vanillin handelt, wurde Vanillin in Methanol gelöst, mit TMSH versetzt und zur GC-MS-Analyse eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass neben dem an der freien OH-Gruppe methylierten Vanillin ebenfalls ein Peak mit dem in Abbildung 65 dargestellten Massenspektrum auftritt. Somit kommt es durch die Derivatisierung mit TMSH zur Methylierung der Carbonylfunktion. Daher kann wird davon ausgegangen, dass es sich bei Peak 3 lediglich um ein Methylierungsprodukt des Vanillins handelt.

Aufgrund der Struktur des Dimers Dehydrodivanillin und den Ergebnissen der GCxGC-(ToF)MS-Analyse wird davon ausgegangen, dass die in Abbildung 66 dargestellten monomere Aromaten bei der Inkubation mit der Laccase entstanden sind.

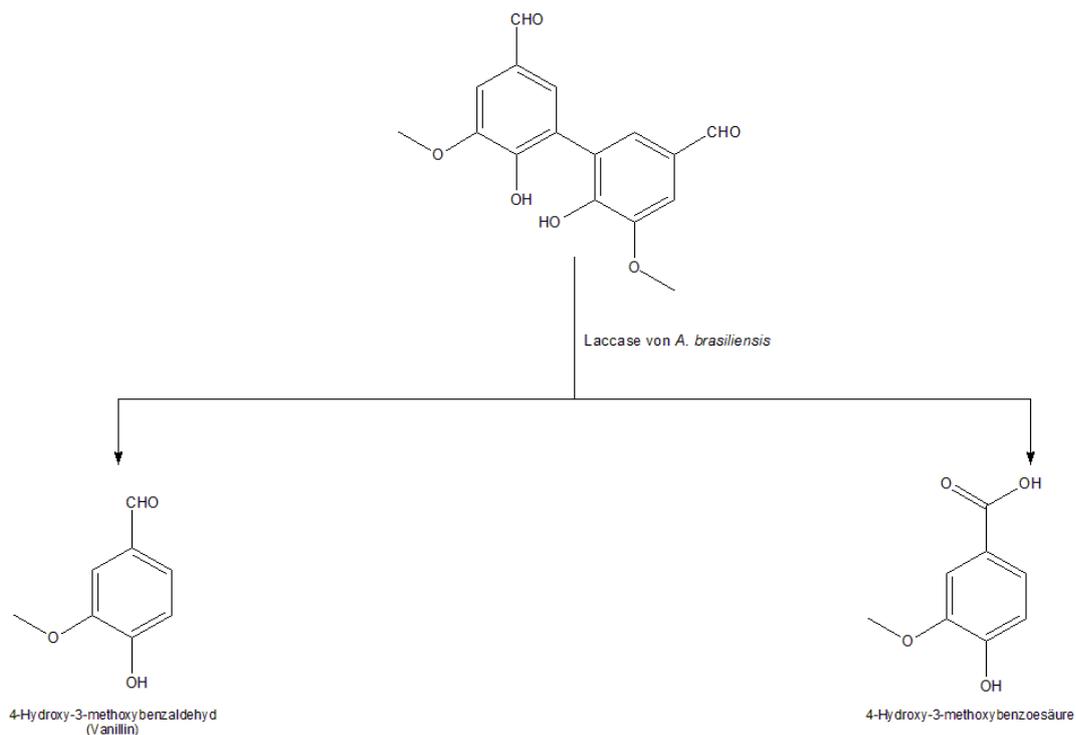


Abbildung 66: Produkte der Spaltung von 1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-(2-methoxy-phenoxy)-ethanon mit einer Laccase von *A. brasiliensis*

b) 1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-(2-methoxy-phenoxy)-ethanon (Dimer=O)

Die Verbindung 1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-(2-methoxy-phenoxy)-ethanon (Dimer=O), bei der es sich um ein etherverknüpftes Dimer handelt, wurde ebenso wie das Dehydrodivanillin mit der Laccase von *A. brasiliensis* in Verbindung mit dem Mediator HOBt inkubiert. Hierbei wurden das in Abbildung 67 dargestellte GCxGC-(ToF)MS-Chromatogramm nach Derivatisierung mit BSTFA erhalten.

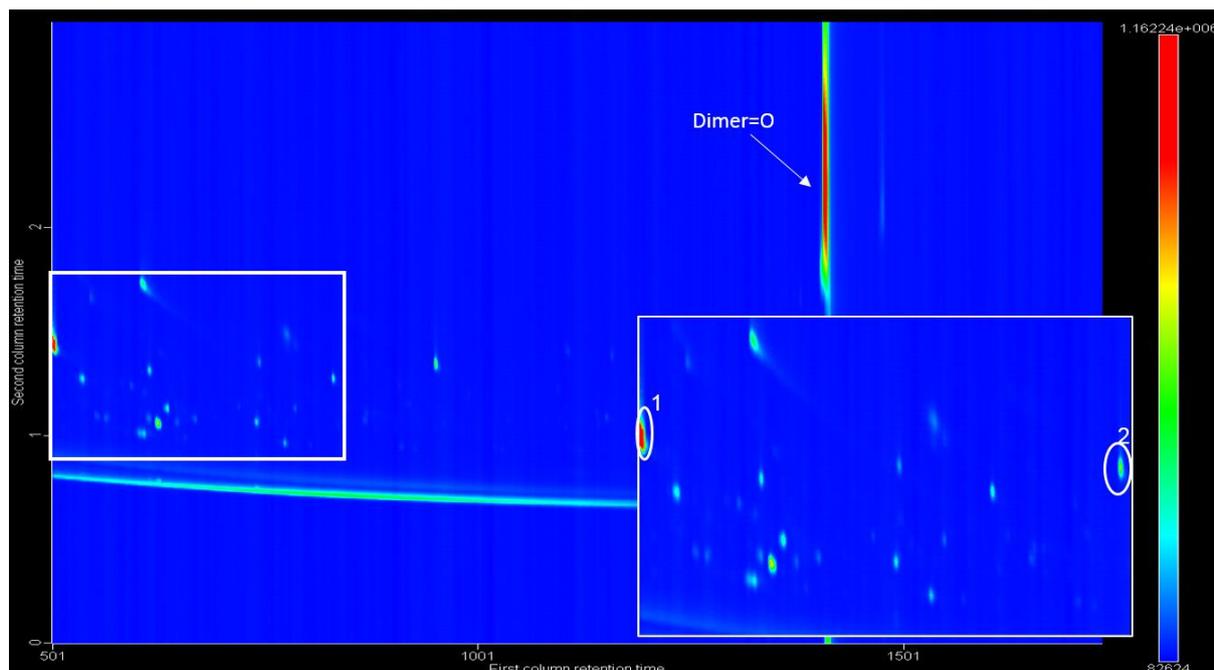


Abbildung 67: GCxGC-(ToF)MS-Chromatogramm nach Derivatisierung mit BSTFA (Dimer=O + Laccase von *A. brasiliensis* + HOBt) (Methode: vgl. Kapitel 7.2.4)

Das Chromatogramm zeigt neben Verunreinigungen, die aus dem Silylierungsmittel stammen, zum einen Überreste des nicht abgebauten Dimers. Des Weiteren konnten über die Massenspektren durch Vergleiche mit der NIST-Datenbank zwei monomere Abbauprodukte des Dimer identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um die in Abbildung 68 dargestellten Verbindungen.

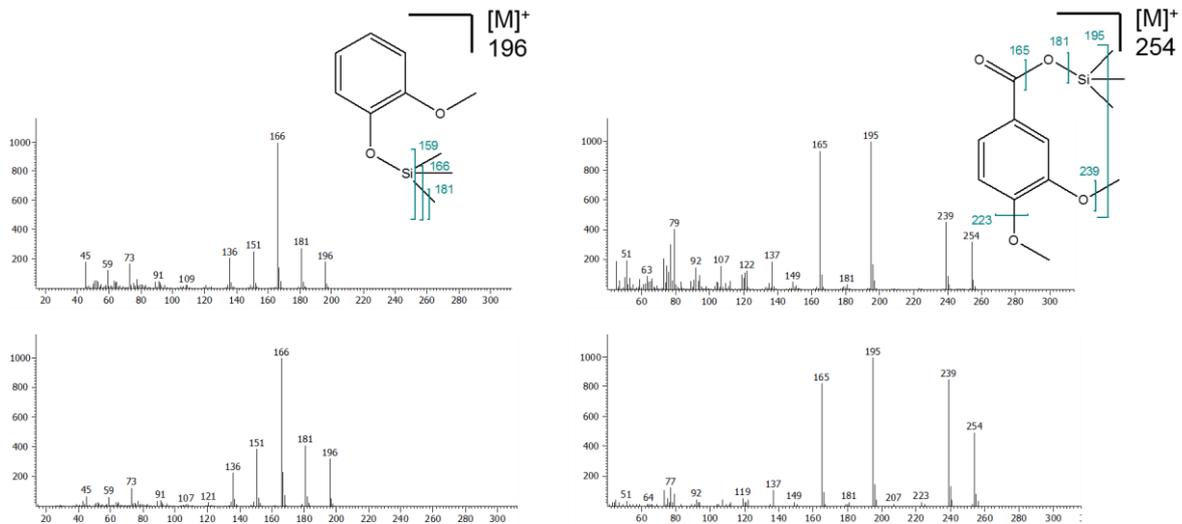


Abbildung 68: Massenspektren der Peaks 1 und 2 (oben) sowie Vergleichsspektren (unten) (Dimer=O + Laccase von *A. brasiliensis* + HOBT)

Es kommt somit zur oxidativen Spaltung des Dimers an der Etherbindung. Hierbei entsteht zum einen 3,4-Dimethoxybenzoesäure. Des Weiteren wird 2-Methoxyphenol gebildet (Abbildung 69).

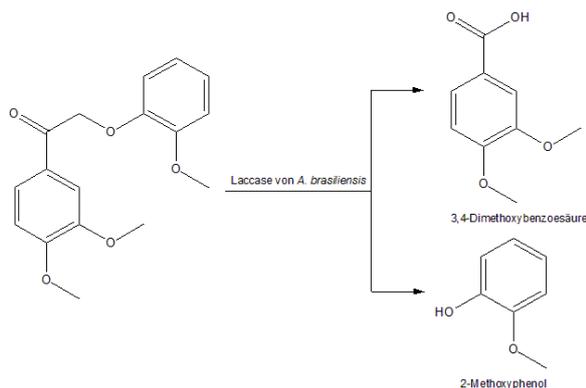


Abbildung 69: Produkte der Spaltung von 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)ethanon mit einer Laccase von *A. brasiliensis*

4.6.1.3 Abbau der Modells substanz 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)ethanon (Dimer=O) mit der Manganperoxidase von *C. viscosa*

Bei den Abbaueversuchen mit der Manganperoxidase von *C. viscosa* wurden Mangan(II)ionen und Wasserstoffperoxid als Co-Substrate zu den Abbaueversuchen zugesetzt. Das C-C-verknüpfte Dimer 3,3'-Dimethoxy-5,5'-dimethyl-biphenyl-2,2'-diol konnte auf diesem Weg nicht gespalten werden. Es treten lediglich Oxidationsreaktionen am Molekül auf, bei denen Chinonmethidstrukturen und weitere Oxidationsprodukte gebildet werden (Abbildung 70).

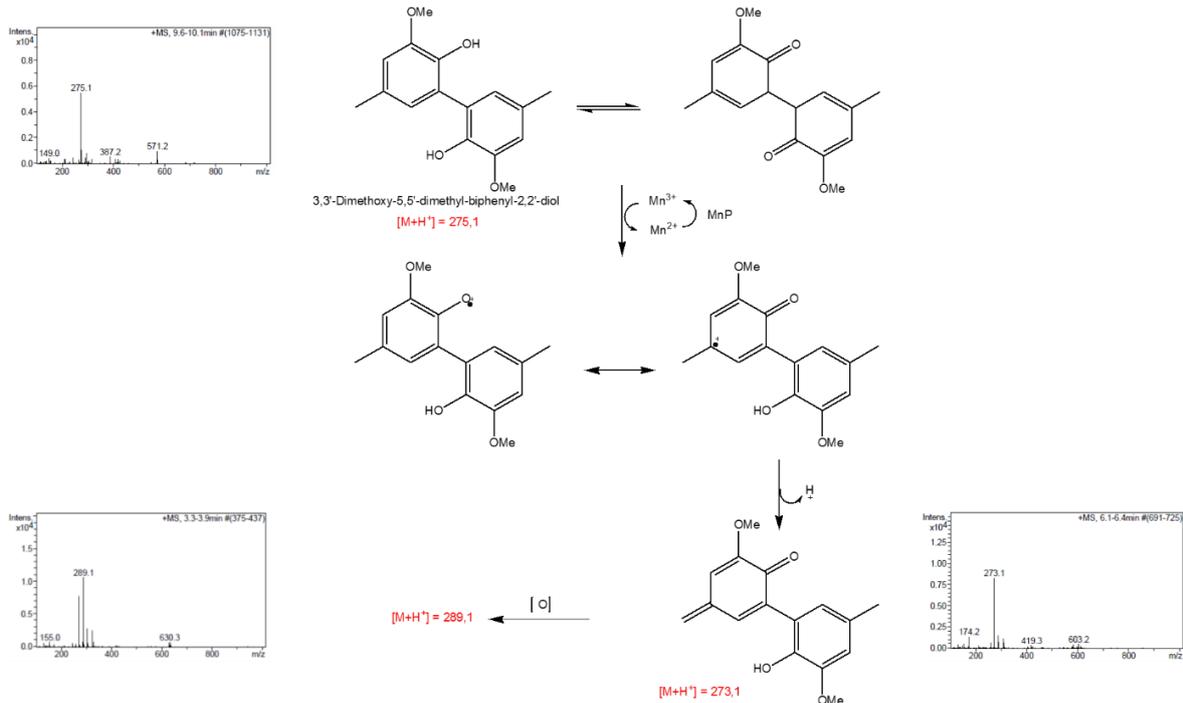


Abbildung 70: Oxidation von 3,3'-Dimethoxy-5,5'-dimethyl-biphenyl-2,2'-diol durch die Manganperoxidase von *C. viscosa*

Der Abbauersuch mit der über eine Etherbindung verknüpften Modellsubstanz 1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-(2-methoxy-phenoxy)-ethanon (Dimer=O) lieferte hingegen monomere Abbauprodukte, die mittels GCxGC-(ToF)MS identifiziert wurden.

In Abbildung 71 ist das GCxGC-Chromatogramm nach Derivatisierung mit BSTFA gezeigt.

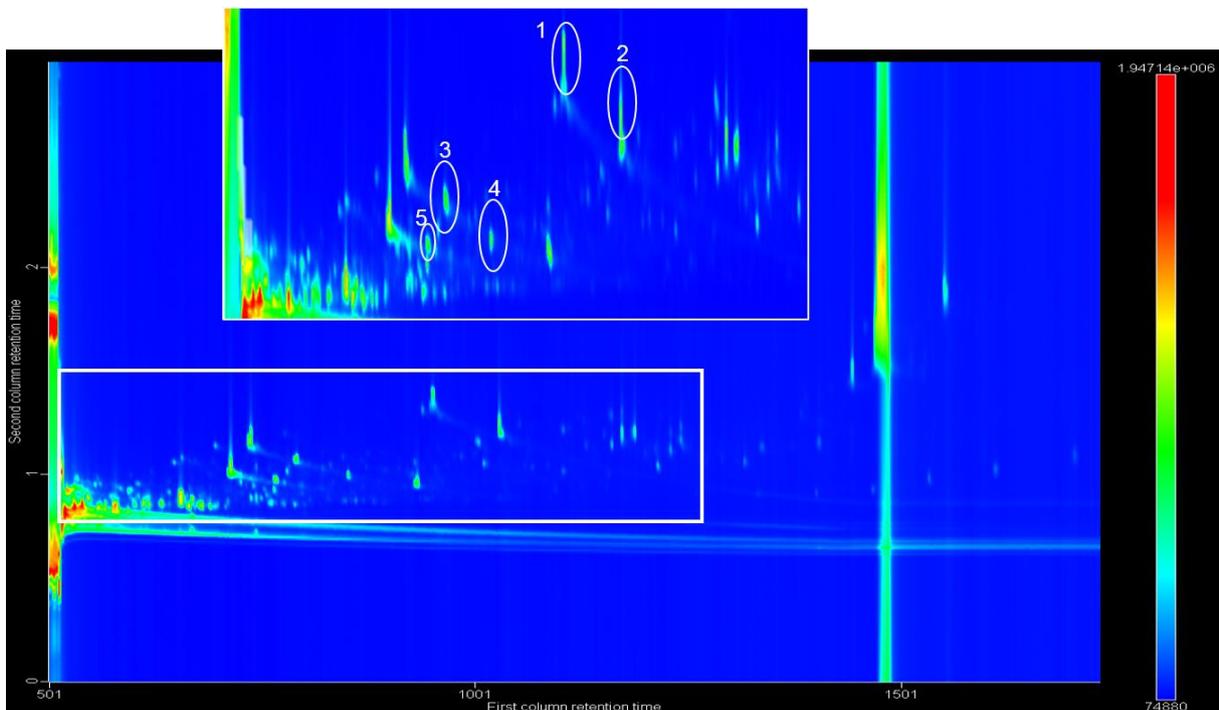


Abbildung 71: GCxGC-(ToF)MS-Chromatogramm nach Derivatisierung mit BSTFA (Dimer=O + Manganperoxidase von *C. viscosa* + H_2O_2) (Methode: vgl. Kapitel 7.2.4)

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Identifizierung erfolgte anhand der Massenspektren und über den Vergleich mit der NIST-Datenbank (Abbildung 72 - Abbildung 74).

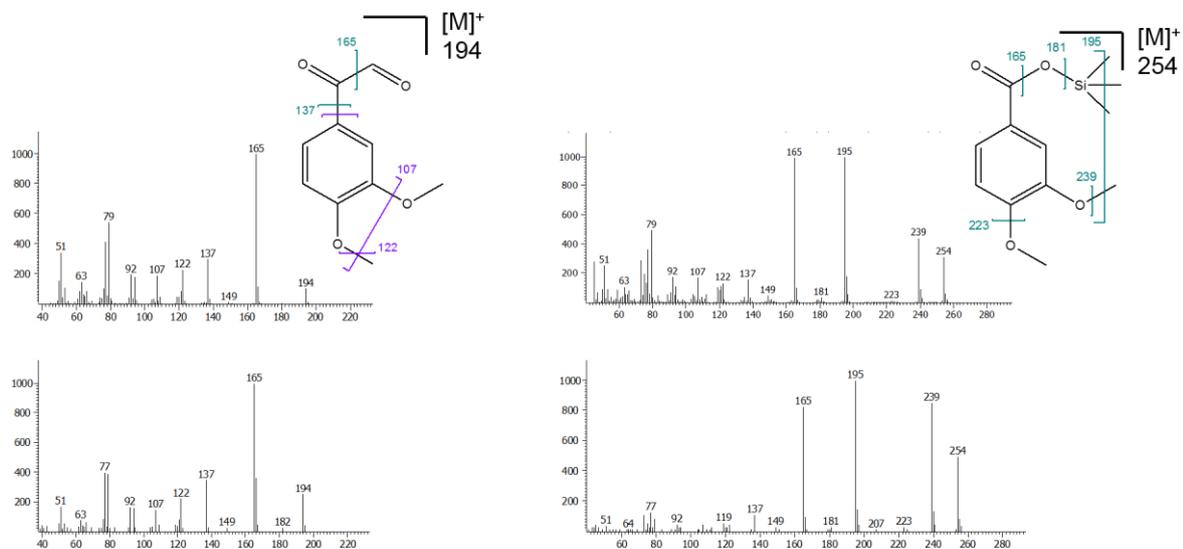


Abbildung 72: Massenspektren der Peaks 1 und 2 (oben) sowie Vergleichsspektren (unten) (Dimer=O + Manganperoxidase von *C. viscosa* + H_2O_2)

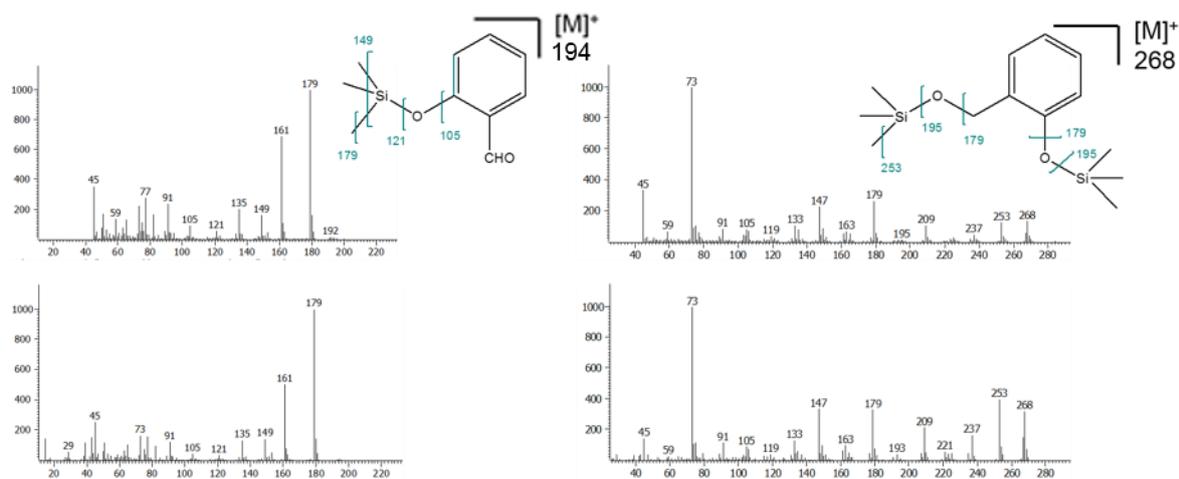


Abbildung 73: Massenspektren der Peaks 3 und 5 (oben) sowie Vergleichsspektren (unten) (Dimer=O + Manganperoxidase von *C. viscosa* + H_2O_2)

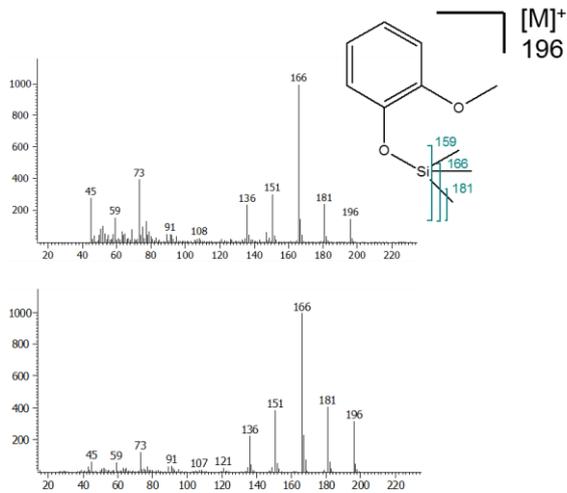


Abbildung 74: Massenspektrum von Peak 5 (oben) sowie Vergleichsspektrum (unten) (Dimer=O + Manganperoxidase von *C. viscosa* + H₂O₂)

Ebenso wie bei der Laccase von *A. brasiliensis* kommt es zur oxidativen Spaltung des Dimers an der Etherbindung. Bei der Spaltung mit der Manganperoxidase von *C. viscosa* werden jedoch neben 3,4-Dimethoxybenzoesäure und 2-Methoxyphenol drei weitere Produkte gebildet. Hierbei handelt es sich um (3,4-Dimethoxyphenyl)oxoacetaldehyd, 2-Hydroxybenzaldehyd und 2-Hydroxymethylphenol (Abbildung 75).

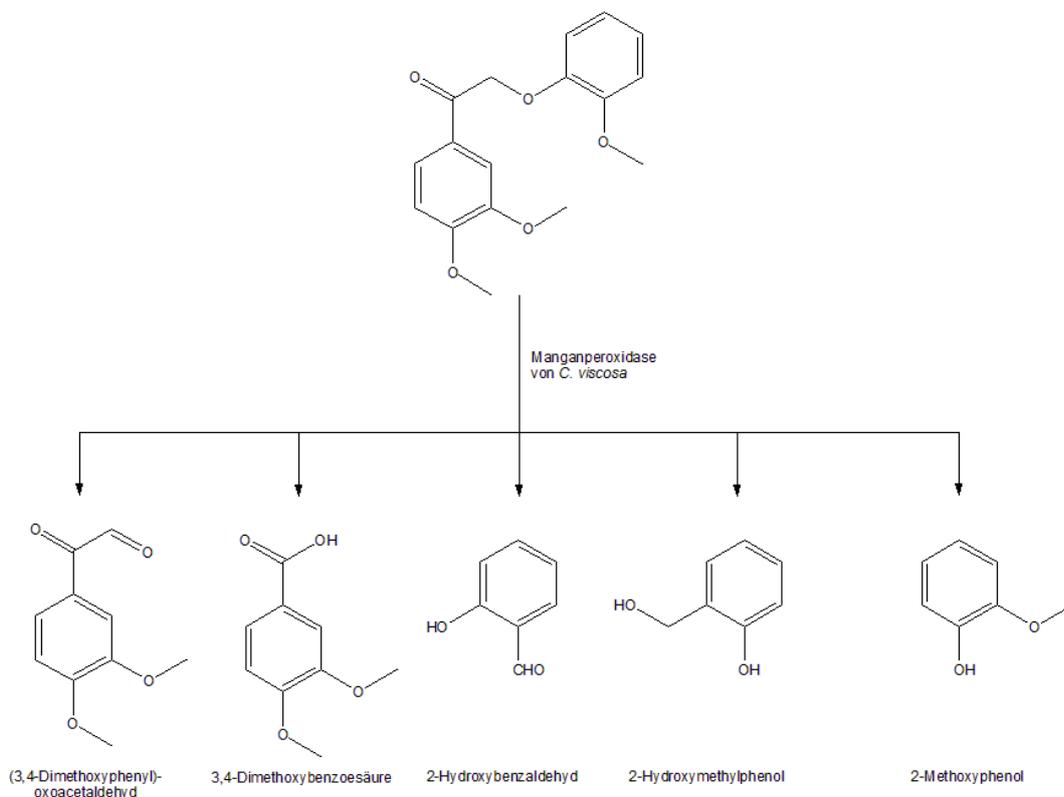


Abbildung 75: Produkte der Spaltung von 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)ethanon mit einer Manganperoxidase von *C. viscosa*

Sowohl die isolierte Laccase von *A. brasiliensis* als auch die Manganperoxidase von *C. viscosa* spalten dimere Ligninmodellsubstanzen, die die Hauptbindungstypen des Ligninpolymers aufweisen. Hierbei kommt es teilweise zu Oxidationen an den Substituenten der Aromaten.

Es kann daher davon ausgegangen werden kann, dass durch diese Enzyme Ligninderivate in Ablaugen aus der Zellstoffindustrie abgebaut werden können.

Daher wurden die Ablaugen aus der Zellstoffindustrie mit denselben Enzymen inkubiert und nach einer Inkubationszeit von einer Woche hinsichtlich gebildeter Abbauprodukte des Lignins analysiert.

4.6.2 Abbau der Prozessablaugen mit den isolierten Enzymen

Die Hauptbestandteile von Prozessablaugen aus der Zellstoffindustrie sind oligomere und polymere Abbauprodukte des Lignins (vgl. Kapitel 2.3). Diese Abbauprodukte sollten durch die isolierten ligninolytischen Enzyme zu kleineren Bruchstücken bis hin zu monomeren Aromaten abgebaut werden. Hierbei wurde der Einfluss der Enzyme auf die getrocknete Dicklauge aus dem Sulfitverfahren sowie die bis pH 2 gefällte und getrocknete Schwarzlauge aus dem Sulfatverfahren untersucht.

4.6.2.1 Abbau der Prozessablaugen mit der Laccase von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 1)

In Anlehnung an die Abbauprobe mit den dimeren Modellsubstanzen wurden die getrocknete Dicklauge und die bis pH 2 gefällte Schwarzlauge in einem HOBt-haltigen Puffer gelöst bzw. suspendiert und mit der Laccase von *A. brasiliensis* inkubiert. Gleichzeitig wurde ein Ansatz ohne Zusatz der Laccase angesetzt.

In Abbildung 76 sind die Abbauprobe mit den Prozessablaugen dargestellt (jeweils links: ohne Enzym; rechts: mit Enzym). Bei dem Abbauprobe der Dicklauge mit der Laccase von *A. brasiliensis* ist eine Intensivierung der Farbe des Ansatzes zu erkennen. Dieser Effekt ist ebenfalls bei den Agarplatten („Anzuchtmedium Dicklauge“) zu erkennen, auf denen die Weißfäulepilze angezüchtet werden.



Abbildung 76: Fotos der Abbauprobe von Prozessablaugen mit der Laccase von *A. brasiliensis*
links: Dicklauge (Sulfitverfahren), rechts: Schwarzlauge pH 2 (Sulfatverfahren)

Daher wird davon ausgegangen, dass bei Agarplatten, die das „Anzuchtmedium Dicklauge“ enthalten, eine Ausschüttung ligninolytischer Enzyme bereits anhand der Ausbildung eines dunklen Hofes um das Pilzmycel zu erkennen ist (Abbildung 77).



Abbildung 77: Foto einer mit dem Pilzmycel von *A. brasiliensis* angeimpften Agarplatte „Anzuchtmedium Dickklauge“

Derartige Höfe waren bei den Anzuchtversuchen (vgl. Kapitel 4.1) bei allen verwendeten Pilzmycelien wenige Tage nach der Animpfung zu erkennen.

Nach einer Inkubationszeit von einer Woche wurden die Abbauprobe, die die verdünnten Abflüsse mit HOBt und den Enzymen enthielten, mittels HPLC-DAD und comprehensiver zweidimensionaler Gaschromatographie gekoppelt mit einem Flugzeitmassenspektrometer (GCxGC-(ToF)MS) nach Derivatisierung mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) untersucht. Mittels LC-MS konnten aufgrund starker Ionensuppression keine Aussagen über die Struktur der enthaltenen Substanzen erhalten werden.

a) Dickklauge

Abbildung 78 zeigt das HPLC-DAD-Chromatogramm nach Inkubation der Dickklauge mit der Laccase von *A. brasiliensis* in Anwesenheit des Mediators HOBt.

Die Chromatogramme zeigen, dass die Laccase von *A. brasiliensis* zu einer Veränderung des Retentionsverhaltens führt. Auffällig ist vor allem, dass zwei Peaks (Retentionszeit 6 min und 32 min) nach der Inkubation mit dem Enzym nicht mehr detektiert werden. Des Weiteren ist der große Peak zwischen 7 min und 25 min, in dem viele verschiedene Substanzen eluieren, nach der Inkubation schmaler und zeigt höhere Absorptionen.

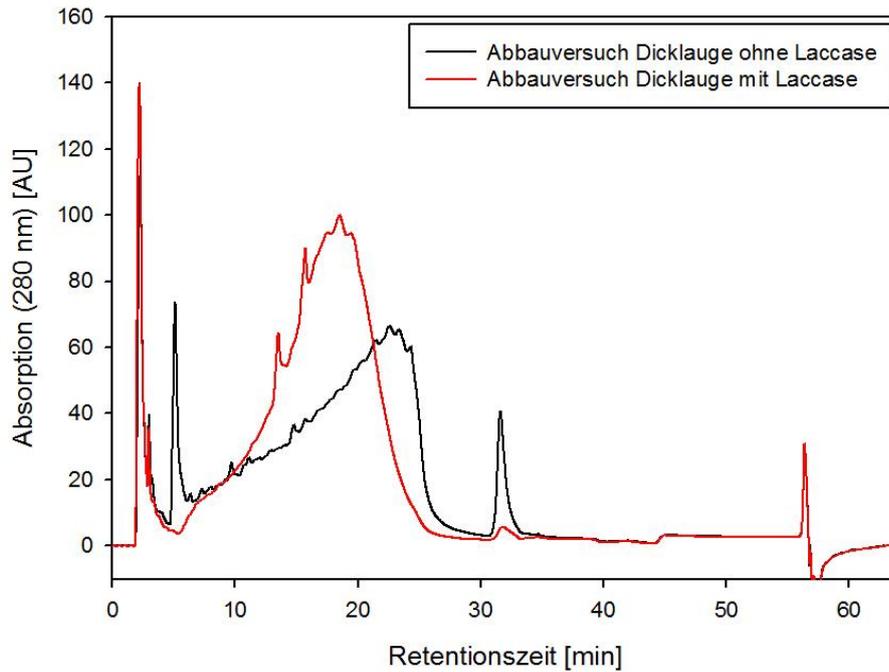


Abbildung 78: HPLC-DAD-Chromatogramme nach Inkubation der Dicklauge ohne und mit der Laccase von *A. brasiliensis* bei einer Wellenlänge von 280 nm (Methode: vgl. Kapitel 7.2.5)

Aufgrund der komplexen Matrix ist eine Identifizierung der eluierenden Substanzen mittels HPLC-DAD jedoch nicht möglich.

Zur Identifizierung monomerer aromatischer Verbindungen wurde eine GCxGC-(ToF)MS-Messung nach Silylierung der Proben durchgeführt (Abbildung 79). Hierbei konnten sowohl monomere nach Behandlung der Dicklauge aus dem Sulfidverfahren wenige monomere Substanzen identifiziert werden.

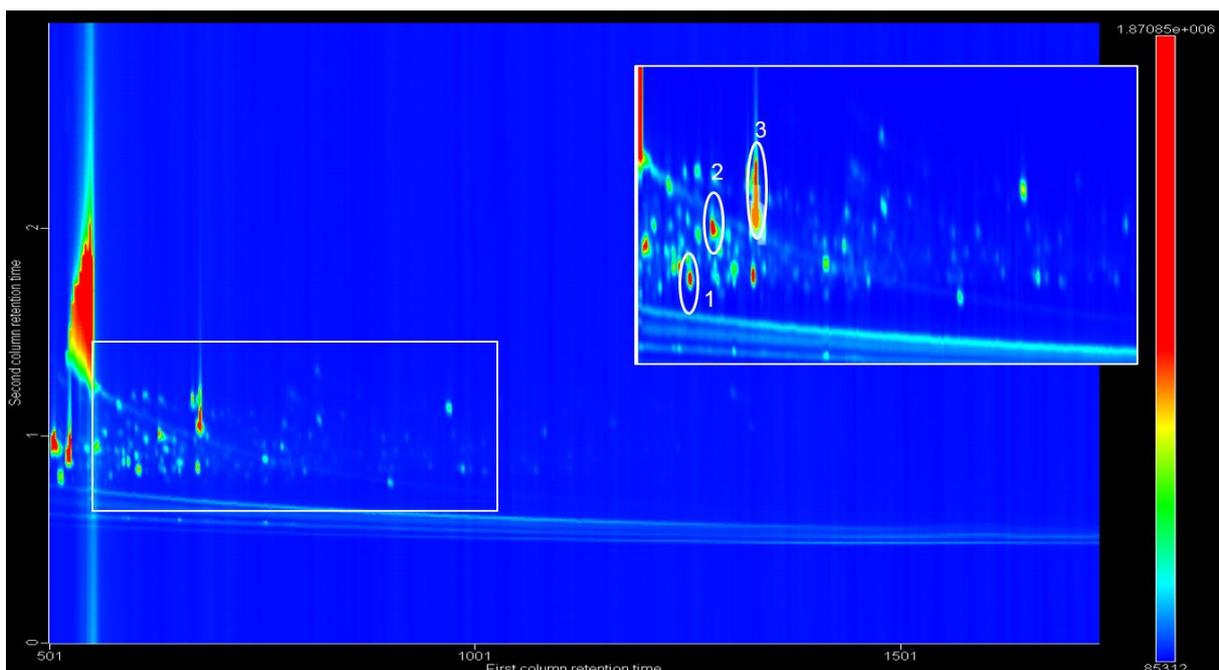


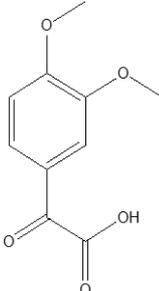
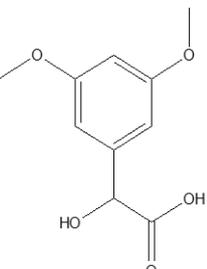
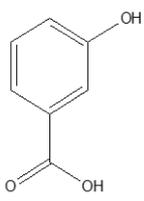
Abbildung 79: GCxGC-(ToF)MS-Chromatogramm nach Derivatisierung mit BSTFA (Dicklauge + Laccase von *A. brasiliensis* + HOBt) (Methode: vgl. Kapitel 7.2.4)

Das Chromatogramm zeigt eine deutliche Intensivierung dreier Peaks, die monomeren aromatischen Strukturen zugeordnet werden können.

Die Inkubation der Dickklauge mit der Laccase von *A. brasiliensis* brachte somit nur eine geringe Menge monomerer Verbindungen hervor. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es durch die Einwirkung der Laccase zwar zu einem Abbau der oligomeren Verbindungen gekommen ist, diese jedoch in dimerer oder trimerer Form vorliegen.

In Tabelle 22 sind die den in Abbildung 79 markierten Peaks zugeordneten Substanzen mit den Übereinstimmungen der silylierten Verbindungen mit der NIST-Datenbank dargestellt.

Tabelle 22: Identifizierte monomere aromatische Strukturen nach Inkubation der Dickklauge mit der Laccase von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 1)

Peak	identifizierte Struktur und Übereinstimmung NIST
1	 <p>(3,4-Dimethoxy-phenyl)oxoessigsäure (50,8 %)</p>
2	 <p>(3,5-Dimethoxy-phenyl)hydroxyessigsäure (60,3 %)</p>
3	 <p>3-Hydroxybenzoesäure (49,5 %)</p>

Die Übereinstimmung mit der NIST-Datenbank liegt für die betrachteten Peaks zwischen 49,5 und 60,3 %. Im Rahmen der vorliegenden Wahrscheinlichkeit kann davon ausgegangen

werden, dass es sich bei den betrachteten Peaks um die dargestellten Strukturen oder strukturverwandte Verbindungen handelt.

b) Schwarzlauge

In Abbildung 80 ist das HPLC-DAD-Chromatogramm nach Inkubation der Schwarzlauge (Sulfatverfahren) mit der Laccase von *A. brasiliensis* in Anwesenheit des Mediators HOBT dargestellt.

Die Chromatogramme zeigen, dass die Laccase von *A. brasiliensis* auch bei der Schwarzlauge zu einer Veränderung des Retentionsverhaltens führt. Hier konnte festgestellt werden, dass sich die Verhältnisse der Peaks untereinander verändern. Insbesondere der Peak mit einer Retentionszeit von etwa 16 Minuten zeigt nach der Inkubation mit der Laccase von *A. brasiliensis* höhere Absorptionen. Im Gegensatz dazu nimmt die Absorption der anderen Peaks im Vergleich zur Inkubation ohne Laccase ab.

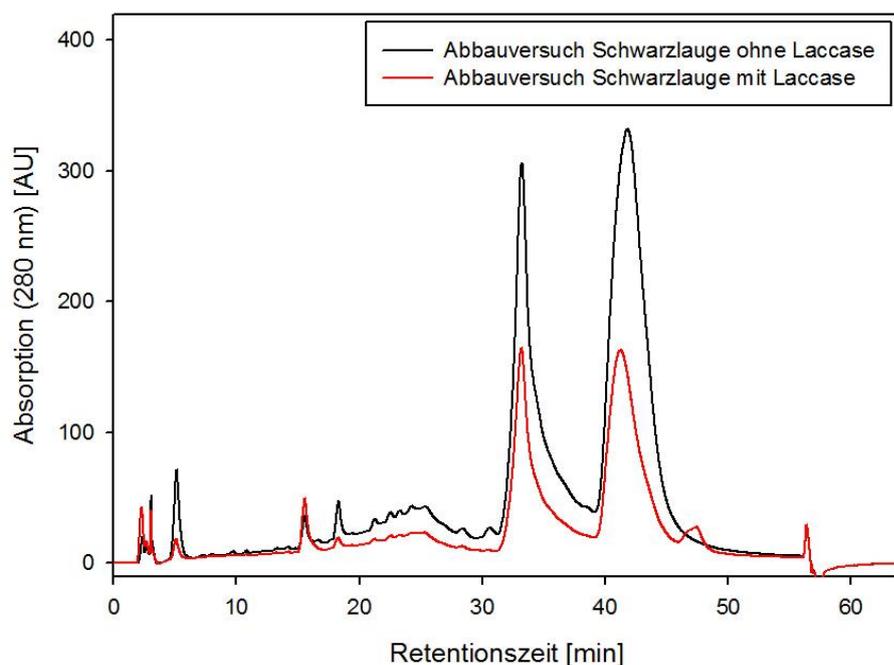


Abbildung 80: HPLC-DAD-Chromatogramme nach Inkubation der Schwarzlauge ohne und mit der Laccase von *A. brasiliensis* bei einer Wellenlänge von 280 nm (Methode: vgl. Kapitel 7.2.5)

Zur Identifizierung monomerer aromatischer Verbindungen wurde auch mit dem Abbauversuch der Schwarzlauge eine GCxGC-(ToF)MS-Messung nach Silylierung der Proben durchgeführt. Hierbei konnte eine Vielzahl monomerer aromatischer Verbindungen identifiziert werden, die durch die Einwirkung der Laccase vollständig neu gebildet wurden oder die ohne Einwirkung der Laccase in geringeren Mengen detektiert wurden.

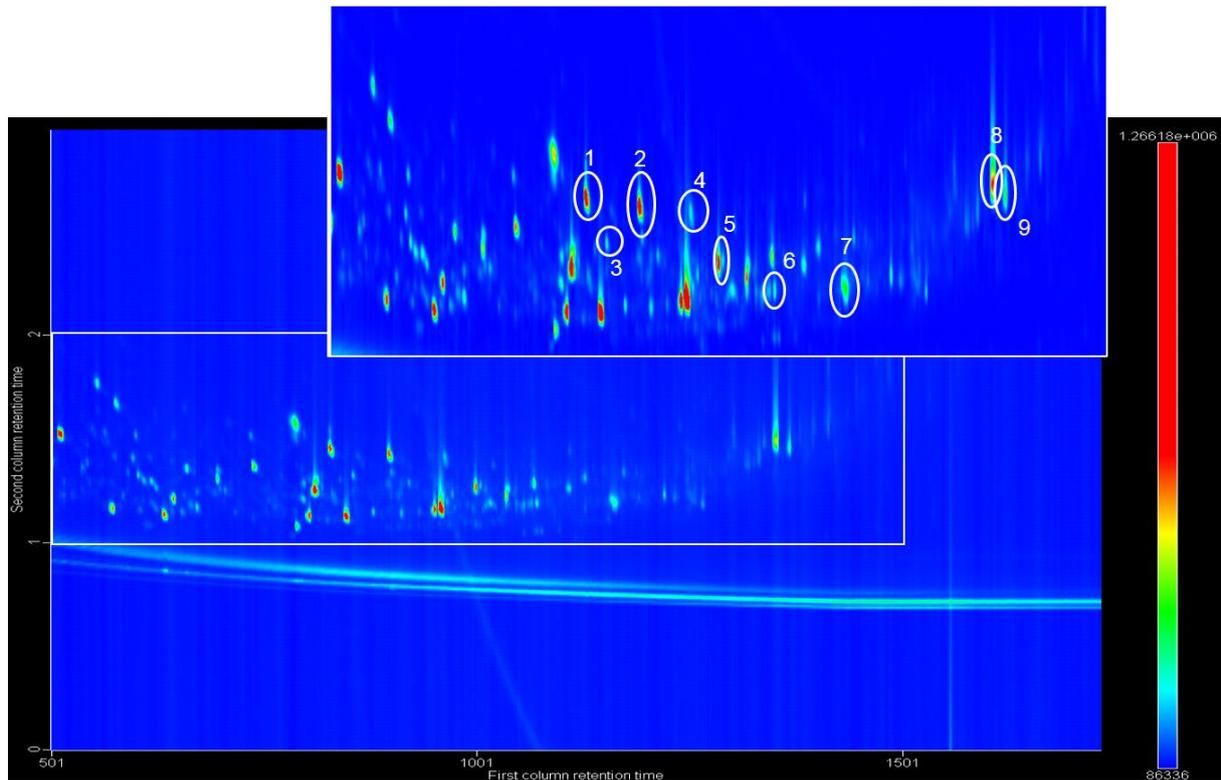
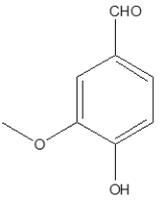
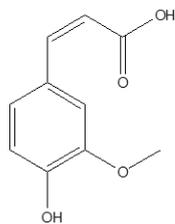
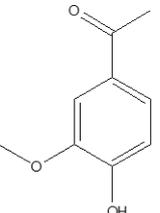
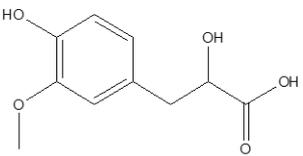
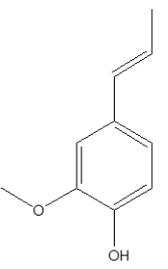
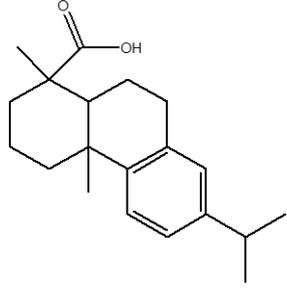
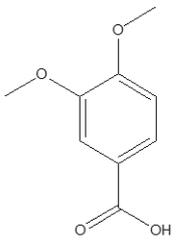
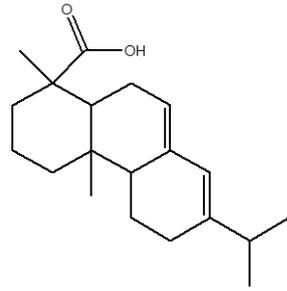
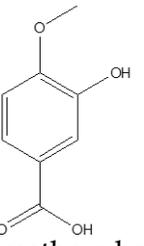


Abbildung 81: GCxGC-(ToF)MS-Chromatogramm nach Derivatisierung mit BSTFA (Schwarzlauge + Laccase von *A. brasiliensis* + HOBt) (Methode: vgl. Kapitel 7.2.4)

Das Chromatogramm zeigt eine deutliche Intensivierung der Peaks verschiedener monomerer aromatischer Strukturen, bei denen es sich um Abbauprodukte des Lignins handelt. Zudem werden neue Monomere gebildet.

Neben den monomeren aromatischen Verbindungen konnten ebenfalls, die aus dem beim Holzaufschluss verwendeten Nadelholz stammenden Harzsäuren Abietinsäure und Dehydroabietinsäure identifiziert werden. Die zugeordneten Strukturen sind in Tabelle 23 mit den Übereinstimmungen der silylierten Verbindungen mit der NIST-Datenbank dargestellt. Die identifizierten Strukturen zeigen gute bis sehr gute Übereinstimmungen mit der NIST-Datenbank. Die erhaltenen Verbindungen zeigen lignintypische Strukturelemente. Neben den Aromastoffen Vanillin und Isoeugenol werden weitere monomere Aromaten erhalten, die in unterschiedlicher Form substituiert sind. Besonders häufig treten hier Methoxygruppen auf, die in großer Anzahl im Ligninpolymer vorliegen.

Tabelle 23: Identifizierte monomere aromatische Strukturen nach Inkubation der Schwarzlauge mit der Laccase von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 1)

Peak	identifizierte Struktur und Übereinstimmung NIST	Peak	identifizierte Struktur und Übereinstimmung NIST
1	 <p>4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (Vanillin) (94,2 %)</p>	6	 <p>3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylsäure (76,8 %)</p>
2	 <p>1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)ethanon (94,3 %)</p>	7	 <p>2-Hydroxy-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propionsäure (85,8 %)</p>
3	 <p>2-Methoxy-4-propenylphenol (Isoeugenol) (89,3 %)</p>	8	 <p>Dehydroabietinsäure (78,8 %)</p>
4	 <p>3,4-Dimethoxybenzoesäure (87,8 %)</p>	9	 <p>Abietinsäure (76,3 %)</p>
5	 <p>3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure (90,1 %)</p>		

4.6.2.2 Abbau der Dickklauge mit der Manganperoxidase von *C. viscosa*

Analog zu den Abbauprobieren der Ligninmodellsubstanzen mit der Manganperoxidase von *C. viscosa* wurde die getrocknete Dickklauge (Sulfitverfahren) mit der Manganperoxidase in Anwesenheit von Mangan(II)ionen und Wasserstoffperoxid inkubiert.

Im Gegensatz zur Inkubation mit der Laccase von *A. brasiliensis* in Anwesenheit des Mediators HOBt konnten zwischen den HPLC-DAD-Chromatogrammen zwischen der Inkubation mit und ohne Enzym keine Unterschiede im Retentionsverhalten festgestellt werden.

Bei der Untersuchung der silylierten Inkubationslösung mittels GCxGC-(ToF)MS konnten jedoch wesentliche Unterschiede festgestellt werden.

In Abbildung 82 ist das GCxGC-(ToF)MS-Chromatogramm der silylierten Inkubationslösung nach Enzymzusatz dargestellt.

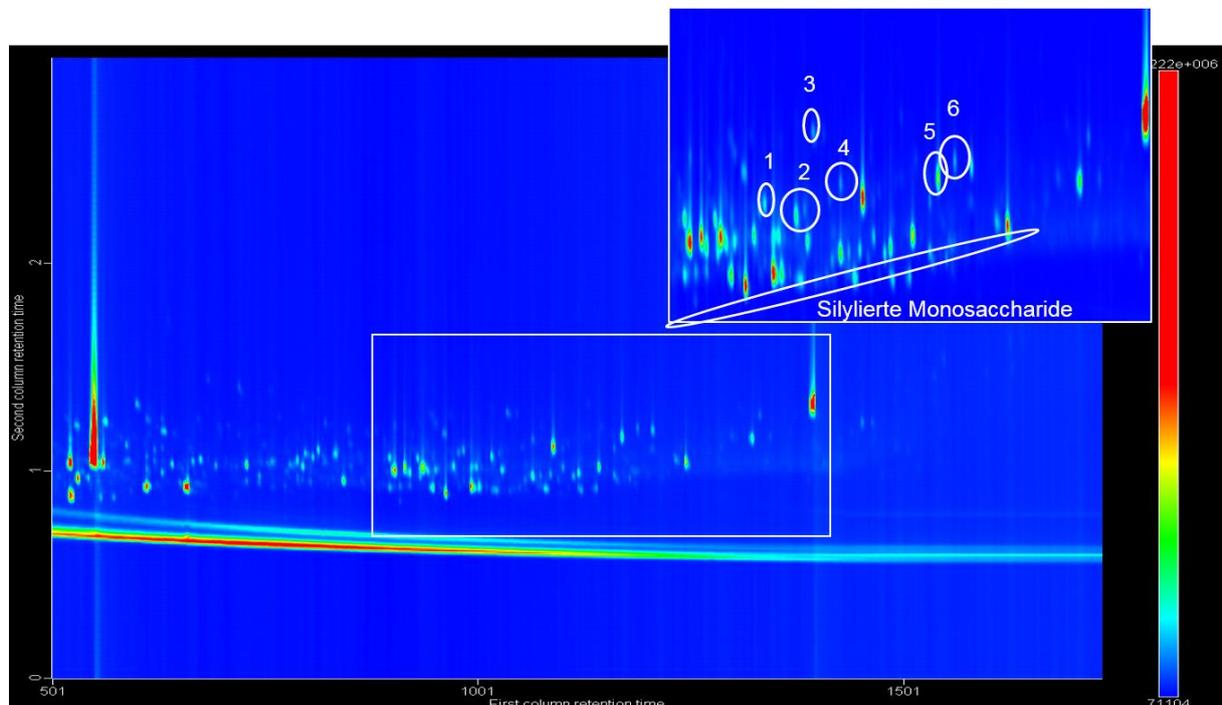
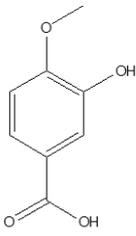
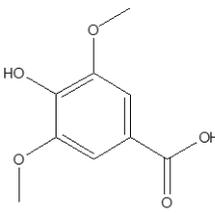
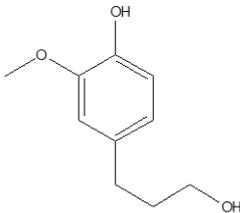
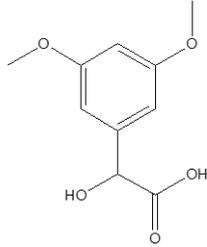
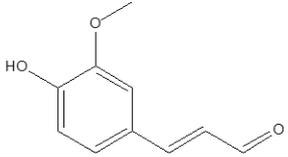
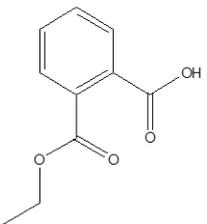


Abbildung 82: GCxGC-(ToF)MS-Chromatogramm nach Derivatisierung mit BSTFA (Dickklauge + Manganperoxidase von *C. viscosa* + H_2O_2) (Methode: vgl. Kapitel 7.2.4)

Das Chromatogramm zeigt zum einen die silylierten Derivate der in der Dickklauge auftretenden Monosaccharide. Des Weiteren ist eine deutliche Intensivierung der Peaks verschiedener monomerer aromatischer Strukturen zu erkennen, bei denen es sich um Abbauprodukte des Lignins handelt. Des Weiteren werden neue Monomere gebildet. Die identifizierten Strukturen sind in Tabelle 24 mit den Übereinstimmungen der silylierten Verbindungen mit der NIST-Datenbank dargestellt.

Tabelle 24: Identifizierte monomere aromatische Strukturen nach Inkubation der Dickklauge mit der Manganperoxidase von *C. viscosa*

Peak	identifizierte Struktur und Übereinstimmung NIST	Peak	identifizierte Struktur und Übereinstimmung NIST
1	 <p>3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure (92,0 %)</p>	4	 <p>4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure (87,6 %)</p>
2	 <p>4-(3-Hydroxy-propyl)-2-methoxyphenol (85,4 %)</p>	5	 <p>(3,5-Dimethoxy-phenyl)-hydroxyessigsäure (71,9 %)</p>
3	 <p>3-(4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl)-propenal (93,7 %)</p>	6	 <p>Phthalsäuremonoethylester (60,5 %)</p>

Die identifizierten Strukturen zeigen gute bis sehr gute Übereinstimmungen mit der NIST-Datenbank. Es werden typische Fragmente des Lignins erhalten. Diese weisen sowohl Methoxygruppen, als auch andere funktionelle Gruppen, wie Hydroxygruppen oder Carbonyl- und Carboxylfunktion. Des Weiteren finden sich Strukturen, bei denen der Aromat mit einer kurzkettigen Säure verestert ist.

5 Ausblick

Im Hinblick auf die Isolierung und Charakterisierung ligninolytischer Enzyme sind in Zukunft weitere Untersuchungen zu Pilzspezies notwendig, die sowohl Lignin- als auch Manganperoxidasen und versatile Peroxidasen sezernieren. Da Laccasen auch am Aufbau des Ligninpolymers beteiligt sind (vgl. Kapitel 2.1.3.2), kann es beim biokatalytischen Abbau des Lignins zu einer erneuten Polymerisation kommen. Dadurch ist der Anteil von niedermolekularen Abbauprodukten, der durch die ligninolytischen Enzyme erzielt werden soll, bei der Verwendung von Laccasen voraussichtlich geringer als bei Peroxidasen.

Ziel sollte hierbei auch sein, durch die Wahl der Enzyme und Abbaubedingungen Einfluss auf die Abbauwege und die damit verbundenen unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Abbauprodukte Einfluss zu nehmen. Des Weiteren kann durch Zugabe aktivierender Substanzen die Leistungsfähigkeit der Enzyme gesteigert werden, um eine hohe Ausbeute an monomeren aromatischen Verbindungen zu erhalten. Ziel kann hierbei die qualitative und quantitative analytische Erfassung der einzelnen Bruchstücke des Lignins in Hinblick auf die stoffliche Verwertbarkeit und mögliche Effizienz des Verfahrens sein. Hierzu sind größere Mengen des Enzyms erforderlich, die im Labormaßstab herzustellen und aufzureinigen sind. Dies könnte durch eine rekombinante Herstellung der Enzyme durch ein Expressionssystem erfolgen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ligninolytische Enzyme verschiedener Pilzmycelien isoliert und charakterisiert. Anschließend erfolgten Untersuchungen zur biokatalytischen Anwendbarkeit der isolierten Enzyme.

Zur Anregung der Ausschüttung ligninolytischer Enzyme wurde daher zu Beginn ein Anzuchtmedium für Weißfäulepilze auf der Grundlage einer Ablauge aus dem sauren Sulfitverfahren entwickelt. Anhand von Wachstumsversuchen auf Agarplatten wurde ein Sulfitablaugengehalt von 2,5 % (bezogen auf die Trockenmasse) festgelegt. Aufgrund des Zuckergehalts der Ablauge ist nur die Zugabe einer Stickstoffquelle notwendig, um den Pilzen ein Wachstum zu ermöglichen. Hierbei erzielte die Verwendung einer komplexen organischen Stickstoffquelle (Pepton) die besten Wachstumsergebnisse.

Im Zuge eines Laborscreenings wurden verschiedene Pilzkulturen auf dem oben beschriebenen Anzuchtmedium (2,5 % Sulfitablauge, 10 g/L Pepton, pH 5,6) inkubiert. Durch die in der Ablauge vorliegenden Ligninderivate konnten zehn Pilzmycelien erfolgreich zur Ausschüttung ligninolytischer Enzyme angeregt werden.

Während der Anzucht des Pilzmycels von *Calocera viscosa* konnte festgestellt werden, dass dieser vor Beginn der Enzymsezernierung die in der Ablauge vorhandenen Monosaccharide (D-Glucose, D-Galactose, D-Mannose, L-Arabinose, D-Xylose, und L-Rhamnose) sukzessiv abbaut.

Die Mycelien von *Agaricus brasiliensis*, *Grifola frondosa* und *Pleurotus ostreatus* exprimierten jeweils zwei Laccasen, während von *Clitocybe maxima*, *Hericium coralloides*, *Hericium erinaceus*, *Hypsizygus tessulatus*, *Pleurotus eryngii* und *Trametes versicolor* jeweils eine Laccase ausgeschüttet wurde.

Das Pilzmycelium von *C. viscosa* exprimierte im Gegensatz zu den anderen Mycelien eine Manganperoxidase. Diese Manganperoxidase wurde bisher nach bestem Wissen des Autors noch nicht in wissenschaftlichen Veröffentlichungen beschrieben.

Nach der erfolgreichen Anzucht der Weißfäulepilze auf dem oben beschriebenen Anzuchtmedium wurde ein Aufreinigungsprotokoll zur Isolierung der gebildeten Enzyme aus den Anzuchtmedien entwickelt. Dieses umfasst eine Ammoniumsulfat-Fällung, die Verwendung eines wässrigen Zweiphasensystems unter Einsatz von Polyethylenglycol 6000 sowie eine Anionenaustauschchromatographie.

Im Anschluss an die erfolgreiche Isolierung der Enzyme wurden diese charakterisiert. Die Charakterisierung der Enzyme umfasste die Bestimmung der Molekülmasse per SDS-PAGE, des isoelektrischen Punktes, sowie photometrische Assays zur Untersuchung des pH-Optimums, des Temperaturoptimums, der kinetischen Parameter und des Einflusses verschiedener Metallsalz- und Inhibitorlösungen auf die Enzymaktivität.

Die isolierten Laccasen wiesen die für Laccasen typischen Molekülmassen und isoelektrischen Punkte auf. Im Gegensatz dazu zeigte die Manganperoxidase von *C. viscosa* eine im Vergleich zu anderen Manganperoxidasen relativ hohe Molekülmasse von 65 kDa, aber einen für Manganperoxidasen typischen isoelektrischen Punkt von 3,2. Das UV/VIS-Spektrum der Manganperoxidase zeigte den typischen Rotshift der Soretbande von Peroxidasen nach Zugabe von Wasserstoffperoxid.

Bezüglich der Einflüsse des pH-Werts und der Temperatur zeigten sich insbesondere bei den Temperaturoptima große Unterschiede zwischen den einzelnen Enzymen. Obwohl einige Enzyme erhöhte Aktivitäten bei höheren Temperaturen aufwiesen, zeigten diese Enzyme nur geringe Stabilitäten in diesem Bereich. Bei Temperaturen unter 40 °C konnte bei den betrachteten Enzymen im Gegensatz dazu nur ein geringer bis gar kein Verlust der enzymatischen Aktivität beobachtet werden. Die pH-Optima lagen bei allen Laccasen und bei der Manganperoxidase von *C. viscosa* im sauren pH-Bereich.

Der Einfluss verschiedener Metallsalze und Inhibitoren auf die isolierten Enzyme war von der Konzentration als auch vom enthaltenden Kation der Metallsalzlösung bzw. vom enthaltenen Inhibitor und vom betrachteten Enzym abhängig. Dies konnte sowohl für die Laccasen als auch für die Manganperoxidase festgestellt werden.

Nach erfolgreicher Isolierung und Charakterisierung der Enzyme wurde eine Laccase von *A. brasiliensis* und die Manganperoxidase von *C. viscosa* zur ersten Anwendung auf Ligninmodellsubstanzen und Ablaugen aus der Zellstoff- und Papierindustrie ausgewählt, um erste Anhaltspunkte zu erhalten, ob durch Einsatz der Enzyme eine biokatalytische Spaltung von Ligninen zu monomeren aromatischen Bausteinen erreicht werden kann. Dies konnte sowohl bei Verwendung der Modellsubstanzen als auch bei der Inkubation der verdünnten Ablaugen mit beiden Enzymen bestätigt werden.

Die biokatalytische Spaltung der Modellsubstanzen führte mit beiden Enzymen zu monomeren aromatischen Verbindungen, die nach dem Abbau teilweise oxidierte Substituenten aufwiesen.

Ebenso konnten durch eine Inkubation der Prozessabläuge aus dem Sulfit- und dem Sulfatverfahren mit den Enzymen von *A. brasiliensis* und *C. viscosa* monomere aromatische Verbindungen gebildet werden, die erfolgreich mittels GCxGC-(ToF)MS identifiziert werden können. Hierbei handelte es sich um aromatische Verbindungen, die mit lignintypischen Seitengruppen (z.B. Methoxy-, Hydroxy- und Carboxylgruppen) substituiert waren.

7 Experimenteller Teil

7.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

7.1.1 Ablaugen aus der Zellstoffindustrie

Die Ablaugen aus dem Sulfitverfahren wurden von der Firma Sappi Alfeld GmbH, Alfeld, Deutschland zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um eine „Dünnlauge“ (ca. 16 % Trockenmasse) und eine „Dicklauge“ (ca. 61 % Trockenmasse).

Die Ablauge aus dem Sulfatverfahren stammt von der Zellstoff- und Papierfabrik (ZPR) Rosenthal GmbH & Co.KG, Blankenstein, Deutschland und wird im Rahmen dieser Arbeit als „Schwarzlauge“ bezeichnet.

7.1.2 Chemikalien für die Pilzanzucht

Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Ammoniumchlorid, $\geq 99,8$ %	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ammoniumsulfat, p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Fleischpepton, für die Mikrobiologie	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Glycin, p.a.	Biomol GmbH, Hamburg, D
Harnstoff, $\geq 99,5$ %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Hefeextrakt, für die Bakteriologie	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Kaliumnitrat, p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Kupfersulfat Pentahydrat, ≥ 99 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
Malzextrakt, für Nährböden	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid, 99 %	Grüssing GmbH Analytika, Filsum, D
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D

7.1.3 Chemikalien für die Enzymisolierung

Ammoniumsulfat, p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Essigsäure 96 %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Polyethylenglycol 6.000	SERVA Electrophoresis GmbH Heidelberg, D
Polyethylenglycol 40.000	SERVA Electrophoresis GmbH Heidelberg, D
Natriumchlorid	Grüssing GmbH Analytika, Filsum, D
Natriumhydroxid	Grüssing GmbH Analytika, Filsum, D
Q-Sepharose fast flow	Amersham Biosciences, Uppsala, S

7.1.4 Chemikalien für die Enzymtests

2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure (ABTS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Bariumchlorid Monohydrat, p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, D
Calciumchlorid Dihydrat, p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Citronensäure, p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
L-Cystein, p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, D
2,6-Dimethoxyphenol (DMP), ≥ 99 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Dinatriumhydrogenphosphat, p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dithiothreitol (DTT)	International Biotechnologies, Inc. New Haven, CT, USA
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat, ≥ 97 %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Ethylendiamintetraessigsäure, Na-Salz, p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Harnstoff, ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid, p.a.	Acros Organics, Fair Lawn, NJ, USA
Kupfersulfat Pentahydrat, ≥ 99 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid Hexahydrat, ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Malonsäure, 99 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat, ≥ 98 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumazid, ≥ 99 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumchlorid, p.a.	Grüssing GmbH Analytika, Filsum, D
Natriumdihydrogenphosphat, p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (SDS), ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid, 99 %	Grüssing GmbH Analytika, Filsum, D

7.1.5 Chemikalien für gelelektrophoretische Arbeiten

Acrylamid (30 %)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Ammoniumpersulfat (APS), ≥ 98 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
L-Asparagin, 98 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Bromphenolblau	Biomol GmbH, Hamburg, D
Coomassie-Brillant-Blau R-250	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Dithiothreitol (DTT)	International Biotechnologies, Inc. New Haven, CT, USA
Essigsäure 96 %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Glycin, p.a.	Biomol GmbH, Hamburg, D
Glycerin, p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, D
Methanol technisch	
Natriumdodecylsulfat (SDS), ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
<i>ortho</i> -Phosphorsäure, 85 %, p.a.	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
L-Serin, p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, D
Trichloressigsäure, p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D

7.1.6 Chemikalien zur Zuckeranalytik

L-Arabinose, p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Dichlormethan, HPLC-grade	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Essigsäureanhydrid	Merck KGaA, Darmstadt, D
D-Galactose, p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
D-Glucose Monohydrat, p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Hydroxylamin-Hydrochlorid, 98 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<i>myo</i> -Inositol, ≥ 99 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
D-Mannose, p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
1-Methylimidazol, p.a.	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumsulfat, p.a.	Grüssing GmbH Analytika, Filsum, D
L-Rhamnose Monohydrat, p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
D-Xylose, p.a.	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

7.1.7 Chemikalien für die Synthese von Modellsubstanzen

Eisen(II)-sulfat Heptahydrat, $\geq 99\%$	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Kaliumhydroxid	Grüssing GmbH Analytika, Filsum, D
Kaliumperoxodisulfat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Salzsäure, 37 %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Vanillin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D

7.1.8 Lösungsmittel für die Kernspinresonanzspektroskopie

Chloroform $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ (99,8 %)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Dimethylsulfoxid DMSO-d_6 (100 %)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

7.1.9 Chemikalien für die Chromatographie

Acetonitril, MS-grade	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Ammoniumacetat, $\geq 98\%$	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Dichlormethan, HPLC-grade	VWR International GmbH, Darmstadt, D
<i>N,N</i> -Dimethylformamid (DMF), $\geq 99,8\%$	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Methanol, MS-grade	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Pyridin, wasserfrei	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Trimethylsulfoniuhydroxid (TMSH)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
synthetische Luft 5.0	Messer Industriegase GmbH, Bad Soden, D
Wasserstoff 5.0	Messer Industriegase GmbH, Bad Soden, D
Helium 5.0	Messer Industriegase GmbH, Bad Soden, D

7.1.10 Verbrauchsmaterial

Dialyseschlauch	Visking Cellulose Typ 36/32 inch, Wandstärke 0,020 mm, Breite 44 mm (MWCO: 14 kDa) Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Konzentrator-Tubes	Vivaspin 20; 30 kDa MWCO, PES Vivaspin 500; 30 kDa MWCO, PES Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Einmalinjektionskanüle	Sterican (Ø 0,90 x 70 mm) B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Einmalspritze	Injekt Solo 2 mL bzw. 10 mL B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Spritzenvorsatzfilter	regenerierte Cellulose (Ø 25 mm, 0,20 µm) A-Z Analytik Zubehör GmbH, Langen, D
Faltenfilter	Faltenfilter Typ 615 (Ø 110 mm) Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
Einmalküvetten	Einmal-Küvetten, PS (Halbmikro, 1,5 mL) Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Vials	Kurzgewindeflaschen 1,5 mL A-Z Analytik Zubehör GmbH, Langen, D
Deckel für Vials	PTFE (1,0 mm; 9 mm ID) A-Z Analytik Zubehör GmbH, Langen, Deutschland
Probefläschchen	Rotalibo®-Probenfläschchen, 4 mL, klar Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Schraubkappen	Schraubkappe ohne Loch für Rotalibo®-Probenfläschchen Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Septen	Septen für Rotalibo®-Probenfläschchen, PTFE (Ø 12 mm) Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
NMR-Röhrchen	Wilmad 507-PP oder höherwertig Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Eppis	Reaktionsgefäße 2 mL, PP Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D

7.2 Geräteparameter

7.2.1 Ionenaustauschchromatographie

IC-System

Pumpe:	ISMATEC ISM 834 IDEX Health & Science GmbH, Wertheim, D
Säule:	Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, Uppsala, S; Länge:8 cm, Durchmesser: 1,3 cm)
Detektor:	Single Path Monitor UV-1 Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, S Optical Unit und Control Unit
Schreiber:	Kipp & Zonen BD 112
Fraktionssammler:	Fraction Collection Frac-300 Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, S

IC-Bedingungen

Aufgabevolumen :	700 µL
Fluss :	1,0 mL/min
Gradient :	Stufengradient NaCl in 25 mM Na-acetatpuffer pH 5,5
	0-5 min: 0,05 mM NaCl
	5-10 min: 0,1 mM NaCl
	10-15 min: 0,25 mM NaCl
	15-20 min: 0,5 mM NaCl
	20-35 min: 0,75 mM NaCl
	35-60 min: 1,0 mM NaCl
Detektionswellenlänge :	280 nm

7.2.2 Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID)

GC-FID-System

Gaschromatograph: HP 6890 G1530A
Agilent Technologies Inc., Santa Clara CA, USA
Autosampler: 7683 Series
Agilent Technologies Inc., Santa Clara CA, USA
Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID)
Software: GC-Chemstation Rev. A.09.03 [1417]
Agilent Technologies Inc., Santa Clara CA, USA
Säule: Zebron ZB-5MSi (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Phenomenex Inc., Aschaffenburg, D

GC-FID-Bedingungen

Injektortemperatur: 320 °C
Injektionsvolumen: 1 µL
Trägergas: Helium
Trägergasfluss: 1,6 mL/min
Split/ Splitless: Splitless
Temperaturprogramm: 150 °C (1 min) – 2 °C/min – 320 °C (5 min)
Brenngase: synthetische Luft, Wasserstoff
Make-up Gas: Stickstoff

7.2.3 Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC-GC-(ToF)MS)

GC-GC-(ToF)MS -System

Gaschromatograph:	6890 N Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA
Autosampler:	7683 Series Agilent Technologies Inc., Santa Clara CA, USA
Detektor:	Flugzeitmassenspektrometer (time of flight; ToF) LECO® Corporation, St. Joseph MI, USA
Steuerungssoftware:	LECO® ChromaTOF Version 3.32 LECO® Corporation, St. Joseph MI, USA
Auswertesoftware:	LECO® ChromaTOF Version 3.34 LECO® Corporation, St. Joseph MI, USA
Säule 1.Dimension:	Zebron ZB-5MSi (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) Phenomenex Inc., Aschaffenburg, D
Säule 2. Dimension:	Zebron ZB50 (10 m × 0,1 mm × 0,1 µm) Phenomenex Inc., Aschaffenburg, D

GC-GC-(ToF)MS -Bedingungen

Injektortemperatur:	320 °C
Injektionsvolumen:	1 µL
Trägergas:	Helium
Trägergasfluss:	1,6 mL/min
Split/ Splitless:	Splitless
Temperaturprogramm:	70 °C (1 min) – 10 °C/min – 300 °C (5 min)
Transferlinientemperatur:	300 °C
Ionenquellentemperatur:	200 °C
Scanmodus:	EI, 70 eV
Detektorspannung:	1600 V
Messbereich:	50 bis 500 Da
Aufnahmerate:	200 Spektren/s
solvent delay:	150 s/ 500 s (silylierte Proben)

7.2.4 Comprehensive zweidimensionale Gaschromatographie gekoppelt mit einem Flugzeitmassenspektrometer (GCxGC-(ToF)MS)

GCxGC-(ToF)MS -System

Gaschromatograph:	6890 N Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA
Autosampler:	7683 Series Agilent Technologies Inc., Santa Clara CA, USA
Detektor:	Flugzeitmassenspektrometer (time of flight; ToF) LECO® Corporation, St. Joseph MI, USA
Modulator:	LECO® Thermal Modulation System LECO® Corporation, St. Joseph MI, USA
Steuerungssoftware:	LECO® ChromaTOF Version 3.32 LECO® Corporation, St. Joseph MI, USA
Auswertesoftware:	LECO® ChromaTOF Version 3.34 LECO® Corporation, St. Joseph MI, USA
Säule 1.Dimension:	Zebtron ZB-5MSi (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Phenomenex Inc., Aschaffenburg, D
Säule 2. Dimension:	Zebtron ZB50 (10 m x 0,1 mm x 0,1 µm) Phenomenex Inc., Aschaffenburg, D

GCxGC-(ToF)MS -Bedingungen

Injektortemperatur:	320 °C
Injektionsvolumen:	1 µL
Trägergas:	Helium
Trägergasfluss:	1,6 mL/min
Split/ Splitless:	Splitless
Temperaturprogramm:	70 °C (1 min) - 10 °C/min - 300 °C (5 min)
Modulation:	3,0 s Modulationszeit (hot jets: 0,9 s; cold jets: 0,6 s)
Transferlinientemperatur:	300 °C
Ionenquellentemperatur:	200 °C
Scanmodus:	EI, 70 eV
Detektorspannung:	1600 V
Messbereich:	50 bis 500 Da
Aufnahmerate:	200 Spektren/s
solvent delay:	150 s/ 500 s (silylierte Proben)

7.2.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Diodenarray-Detektor (HPLC-DAD)

HPLC-DAD-System

Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, D

Pumpen: Prominence LC - 20 AD xr
 Autosampler: Prominence Autosampler SIL - 20^a xr
 Kommunikationsmodul: Prominence Communications Module CBM - 20a
 Degasser: Prominence Degasser DGU - 10AS
 Säulenofen: Prominence Column Oven CTO - 20A
 Säule: μ Bondapak™ C18, 10 μ m, 150 x 3,9 mm ID
 Waters Corporation, Milford MA, USA
 Diodenarray-Detektor: Prominence DAD SPD - M20A
 Software: Shimadzu LC-Solution 1.24

HPLC-DAD-Bedingungen

Injektionsvolumen: 5 μ L

Fluss: 0,4 mL/min

Gradient: A: 10 mM Ammoniumacetat in Wasser
 B: Methanol

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0.00	95	5
2.00	95	5
35.00	50	50
32.00	15	85
39.00	15	85
46.00	95	5
61.00	95	5

Detektionswellenlänge: 280 nm

Referenzwellenlänge: 360 nm

7.2.6 weitere Geräte

Brutschrank, 25 °C:	KB 720 Binder Inc., Bohemia, NY, USA
Gelelektrophorese-Set:	Minigel-Twin Biometra GmbH, Göttingen, D SE250-10A-.75 Hoefer Inc., San Francisco, CA, USA
Netzgeräte:	EA-3050 Elektro-Automatik, Viersen
pH-Meter:	VWR International pH 100
pH-Elektrode:	WTW pH-Elektrode SenTix 22
Rundschüttler:	Braun HT-Schüttler
UV/VIS-Spektralphotometer:	Thermo Spectronic Helios γ Shimadzu UV-2101-PC
Wasserbad:	Messgeräte Werk Lauda RM 6
Zentrifugen:	Heraeus Biofuge fresco Heraeus Multifuge 4 KR
Waagen:	Sartorius Handy H51 Sartorius Laboratory Pro 32/34F Sartorius AG, Göttingen, D

7.3 Nährmedien und Kultivierung

7.3.1 Zusammensetzung der Nährmedien zur Optimierung der Anzuchtbedingungen

Die Weißfäulepilze wurden auf sterilen Nährböden kultiviert, die eine Sulfitablauge aus der Zellstoff- und Papierindustrie enthielt. Die verwendete Abblauge wurden von der Firma Sappi Alfeld GmbH zur Verfügung gestellt. Laut Hersteller entstammen sie einem Sulfitaufschluss bei dem Massenanteile von 50 % Fichten- und 50 % Buchenholz eingesetzt wurden. Die Trockenmasse der Dicklauge beträgt 61 %. Neben der enthaltenen Ligninsulfonate, die einen Anteil von ca. 44 % (bezogen auf die Trockenmasse) ausmachen, sind vor allem Kohlenhydrate in Form von Monosacchariden (ca. 30 % bezogen auf die Trockenmasse) enthalten. Weitere Bestandteile sind anorganische Salze und Proteine in geringen Mengen. Vor ihrer Verwendung wurden die Nährmedien autoklaviert (121 °C, 25 min). Zur Anzucht wurde ein steriles Mycelstück auf die Medienplatte gegeben. Die Anzucht erfolgte im Dunkeln bei 25 °C. Tabelle 25 zeigt die Zusammensetzung der Medien zur Optimierung der Anzuchtbedingungen.

Tabelle 25: Zusammensetzung der Nährmedien zur Optimierung der Anzuchtversuche

Variation des Dicklaugengehalts (pH 5,6)			
Dicklauge bezogen auf die Trockenmasse	Gehalt Dicklauge [g/L]	Gehalt Pepton [g/L]	Gehalt Agar-Agar [g/L]
1 %	17,5	10	15
2 %	35,1		
3 %	52,6		
4 %	70,2		
5 %	87,7		
Variation der Stickstoffquelle (N = 1,6 g/L; pH 5,6)			
Stickstoffquelle	Gehalt N-quelle [g/L]	Gehalt Dicklauge [g/L]	Gehalt Agar-Agar [g/L]
Ammoniumchlorid	6,1	43,8	15
Ammoniumsulfat	15,1		
Rinderserumalbumin	10,0		
Glycin	8,6		
Harnstoff	6,9		
Kaliumnitrat	11,6		
Pepton	10,0		

Variation des Peptongehalts (pH 5,6)

Pepton	Gehalt Pepton [g/L]	Gehalt Dickklauge [g/L]	Gehalt Agar-Agar [g/L]
0,25 %	2,5	43,8	15
0,5 %	5		
1,0 %	10		
1,5 %	15		
2,0 %	20		

Dickklauge-Kupfer-Medium (pH 5,6)

Gehalt Dickklauge [g/L]	Gehalt Pepton [g/L]	Gehalt Kupfersulfat Heptahydrat [g/L]
43,8	10	0,1

Dickklauge-Mangan-Medium (pH 5,6)

Gehalt Dickklauge [g/L]	Gehalt Pepton [g/L]	Gehalt Manganchlorid Tetrahydrat [g/L]
43,8	10	0,1

Anzuchtmedium Holz

Buchenspäne [g/L]
62,5

7.3.2 Kultivierung der Pilzmycelien in Flüssigmedien zur Enzymgewinnung

Das optimierte Flüssignährmedium (Anzuchtmedium Dickklauge“) setzt sich aus 43,8 g/L Dickklauge (2,5 % bezogen auf die Trockenmasse) und 10 g/L Pepton zusammen. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf pH 5,6 eingestellt. Die autoklavierten Nährmedien (121 °C, 25 min) wurden mit dem Pilzmycel, das von Festmedien entnommen wurde, angeimpft und im Dunkeln bei 25 °C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden mittels steriler Einmalpipetten Proben von ca. 1 mL entnommen und zum Enzymtest (7.5) eingesetzt.

7.3.3 verwendete Pilzmycelien

Die untersuchten Pilze stammen aus der bestehenden Sammlung des Arbeitskreises. Alle Pilze wurden auf einen Malz/Hefe-Medium bei 25 °C vorkultiviert. In Tabelle 26 sind die in Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pilzmycelien aufgelistet.

Tabelle 26: Übersicht über die verwendeten Pilzmycelien

Name	Trivialname
<i>Agaricus bisporus</i>	Champignon
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Brasil. Mandelegerling
<i>Bovista plumbea</i>	Bleigrauer Zwergbovist
<i>Clitocybe maxima</i>	Riesentrichterling
<i>Calocera viscosa</i>	Klebriger Hörnling
<i>Flammulina velutipes</i>	Samtfußröbling
<i>Gandoderma lucidum</i>	Glänzender Lackporling
<i>Grifola frondosa</i>	Klapperschwamm
<i>Hericium coralloides</i>	Astiger Stachelbart
<i>Hericium erinaceus</i>	Igelstachelbart*
<i>Hypsizygus tessulatus</i>	Buchenrasling „Schimeji“
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	Gemeines Stockschwämmchen
<i>Lentinula edodes</i>	Shiitake
<i>Morchella esculenta</i>	Speisemorchel
<i>Pleurotus eryngii</i>	Kräuterseitling
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Austernseitling
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Lungenseitling
<i>Trametes versicolor</i>	Schmetterlingstramete

7.4 Puffer und Lösungen

7.4.1 Puffer

50 mM Natriummalonatpuffer pH 4,5

5,20 g Malonsäure wurden in ca. 800 mL dest. Wasser gelöst. Nach Einstellen des pH-Werts mit 1 M Natronlauge (NaOH) wurde auf 1 L aufgefüllt.

100 mM Natriummalonatpuffer pH 4,5

10,41 g Malonsäure wurden in ca. 800 mL dest. Wasser gelöst. Nach Einstellen des pH-Werts mit 1 M Natronlauge (NaOH) wurde auf 1 L aufgefüllt.

25 mM Natriumcitratpuffer (pH 2,0 – pH 5,5)

4,80 g Citronensäure wurden in ca. 800 mL dest. Wasser gelöst. Nach Einstellen des pH-Werts mit 1 M Natronlauge wurde auf 1 L aufgefüllt.

25 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,0 – pH 7,0)

Entsprechend der gewünschten pH-Werte wurden Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$) und Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$) in ca. 800 mL Wasser gelöst.

pH 6,0: 3,25 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$ + 0,53 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$

pH 6,5: 2,88 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$ + 1,49 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$

pH 7,0: 3,12 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$ + 3,46 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$

Nach Einstellen des pH-Werts mit 1 M Natronlauge (NaOH) wurde auf 1 L aufgefüllt.

25 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5)

1,56 g Essigsäure (96 %) wurden in ca. 800 mL dest. Wasser gelöst. Nach Einstellen des pH-Werts mit 1 M Natronlauge wurde auf 1 L aufgefüllt.

7.4.2 Substratlösungen zur Bestimmung der Enzymaktivität

0,3 mM ABTS in 50 mM Natriummalonatpuffer pH 4,5

16,5 mg ABTS wurden in einem 100 mL-Messkolben in 50 mM Natriummalonatpuffer pH 4,5 gelöst.

0,3 mM ABTS in Wasser

16,5 mg ABTS wurden in einem 100 mL-Messkolben in Wasser gelöst.

0,01 mM – 10,0 mM ABTS in Wasser

137,2 mg ABTS wurden in einem 100 mL-Messkolben in Wasser gelöst (10,0 mM). Aus dieser Stammlösung wurden Lösungen unterschiedlicher Konzentration durch Verdünnen mit Wasser hergestellt.

0,3 mM ABTS in Wasser

16,5 mg ABTS wurden in einem 100 mL-Messkolben in Wasser gelöst.

2,3 mM DMP in Wasser

35,5 mg DMP wurden in einem 100 mL-Messkolben in Wasser gelöst.

0,01 mM – 15,0 mM DMP in Wasser

231,2 mg DMP wurden in einem 100 mL-Messkolben in Wasser gelöst (15,0 mM). Aus dieser Stammlösung wurden Lösungen unterschiedlicher Konzentration durch Verdünnen mit Wasser hergestellt.

1 mM Mn(II)-malonat

19,8 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ wurden in einem 100 mL-Messkolben in 100 mM Natriummalonatpuffer pH 4,5 gelöst.

0,1 mM – 5,0 mM Mn(II)-malonat

99,0 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ wurden in einem 100 mL-Messkolben in 100 mM Natriummalonatpuffer pH 4,5 gelöst (5,0 mM). Aus dieser Stammlösung wurden Lösungen unterschiedlicher Konzentration durch Verdünnen mit 100 mM Natriummalonatpuffer pH 4,5 hergestellt.

6 mM H_2O_2

30 μL einer 35 %igen Wasserstoffperoxidlösung wurden in einem 50 mL-Messkolben in Wasser gelöst.

7.4.3 Metallsalzlösungen

Von den Metallsalzen NaCl , KCl , $\text{MgCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ und ZnCl_2 wurden wässrige Lösungen mit einer Konzentration von 10 mM angesetzt. Daraus wurden Verdünnungen mit den Konzentrationen 1,0 mM und 0,1 mM hergestellt.

7.4.4 Inhibitorlösungen

Von den Inhibitoren L-Cystein, Dithiothreitol (DTT), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Natriumazid (NaN_3) und Natriumdodecylsulfat (SDS) wurden wässrige Lösungen mit einer Konzentration von 10 mM angesetzt. Daraus wurden Verdünnungen mit den Konzentrationen 1,0 mM und 0,1 mM hergestellt.

7.4.5 Bradford-Reagenz

In einem 1 L Messkolben wurden 90 mg Coomassie-Brillant-Blau G-250 in 50 mL Ethanol gelöst. Zur Lösung wurden 130 mL 85 %ige wässrige Phosphorsäure hinzugegeben und mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Mischung wird 24 h gerührt und anschließend filtriert und bei 4 °C dunkel gelagert [202].

7.4.6 Lösungen für gelektrophoretische Bestimmungen

Gelpuffer

75 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) und je 0,1 M L-Serin, Glycin und L-Asparagin wurden in ca. 40 mL Wasser gelöst. Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 7,4 wurde auf 50 mL aufgefüllt [203]. Bis zur weiteren Verwendung wurden Aliquots von 4 mL bei -18 °C gelagert.

SDS-Probenpuffer

10 % Glycerin, 0,1 M DTT, 2 % SDS und 4,8 mL des Gelpuffers wurden mit 0,05 % Bromphenolblau in einem 10 mL-Messkolben in Wasser gelöst [203]. Bis zur weiteren Verwendung wurden Aliquots von 1 mL bei -18 °C gelagert.

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris, 19,2 mM Glycin und 0,1 % SDS wurden in 1 L Wasser gelöst [203].

Färbelösung SDS-Gele

In einem 1 L Messkolben wurden 400 mg Coomassie-Brillant-Blau R-250 in 400 mL Methanol und 100 mM Essigsäure gelöst. Nach Auffüllen mit dest. Wasser wurde die Lösung für mindestens 30 Minuten gerührt und anschließend filtriert [203]. Das Reagenz wurde bei 4 °C dunkel gelagert.

Entfärbelösung SDS-Gele

Zur Entfärbung der SDS-Gele diente eine 40 %ige wässrige Methanollösung.

IEF-Kathodenpuffer

3,48 g L-Arginin und 2,92 g L-Lysin wurden in 1 L dest. Wasser gelöst.

IEF-Anodenpuffer

2,31 g 85 %ige Phosphorsäure wurden in 1 L dest. Wasser gelöst.

Färbelösung IEF-Gele

100 mg SERVA Violet 17 wurden in 50 mL Wasser gelöst. Vor der Färbung wurde diese Lösung 1:1 mit 20 %iger Phosphorsäure gemischt.

Entfärbelösung IEF-Gele (3 %-ige H₃PO₄)

20 ml 85 %ige H₃PO₄ wurden mit Wasser auf 1 L verdünnt.

Konservierung IEF-Gele

300 mL Ethanol und 50 g Glycerin wurden mit Wasser auf 1 L verdünnt.

7.4.7 Lösungen für die Analytik der Monosaccharide

Hydroxylamin in 1-Methylimidazol

1,25 g Hydroxylaminhydrochlorid wurden in 50 mL 1-Methylimidazol gelöst [204,205].

Kalibrierlösungen und interner Standard

Zur Kalibrierung wurde eine Stammlösung hergestellt, die die in der Sulfitablauge enthaltenen Zucker beinhaltet. Hierbei handelt es sich um L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Xylose, D-Galactose, D-Glucose und D-Mannose. Die Stammlösung enthielt 2,5 mg/mL jedes Zuckers in Wasser. Als Kalibrierung dienten Lösungen im Konzentrationsbereich von 0,02 mg/mL bis 0,4 mg/mL.

Als interner Standard wurde eine wässrige *myo*-Inositollösung (2,5 mg/mL) verwendet.

7.5 Enzym-Assays zur Bestimmung der Enzymaktivität im Laborscreening, während der Inkubation und bei der Charakterisierung

Die Leistungsfähigkeit von Enzymen ist nicht unbedingt abhängig von ihrer Konzentration im betrachteten Medium, sondern von ihrer Aktivität, d.h. von der Menge an Substrat, die in einem bestimmten Zeitraum zum gewünschten Produkt umgesetzt wird. Die Enzymaktivität wird dabei meist in unit (U) angegeben. 1 U ist definiert als die Enzymmenge, die unter Standardbedingungen ein μmol Substrat pro Minute umsetzt. Die Bestimmung der Enzymaktivität, meist als Volumenaktivität in U/L berechnet, wird durch den Abbau eines Substrates oder der Bildung eines Produktes z.B. photometrisch oder fluorimetrisch bestimmt. Als schnelle und zuverlässige Methode haben sich photometrische Tests erwiesen. Sie beruhen auf einem Farbumschlag des Substrats während der katalytischen Umsetzung und der Messung der resultierenden Absorptionsänderung [206-208].

Nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz (1) gilt dabei:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \Leftrightarrow \quad \Delta E = \varepsilon \cdot \Delta c \cdot d \quad (1)$$

$$\text{mit} \quad \Delta c = \frac{\Delta n}{V} \quad (2) \quad \text{und} \quad EA = \frac{\Delta n \cdot 10^6}{t} \quad (3)$$

$$\text{gilt} \quad EA = \frac{\Delta E \cdot V \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot d \cdot t} \quad (4)$$

- E: Extinktion
- ε : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient [L/(mol · cm)]
- d: Schichtdicke [cm]
- c: Konzentration der absorbierenden Verbindung [mol/L]
- n: Stoffmenge der absorbierenden Verbindung [mol]
- V: Volumen des Testansatzes [L]
- EA: Enzymaktivität [U]
- t: Zeit [min]

Wird die Enzymaktivität EA auf das Volumen der Enzymlösung bezogen, erhält man die Volumenaktivität (5). Bei der spezifischen Aktivität bezieht sich die Angabe der Enzymaktivität auf den Proteingehalt der untersuchten Lösung (6):

$$\text{Volumenaktivität [U/L]} = \frac{\Delta E \cdot V \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot d \cdot t \cdot V_{\text{Enzym}}} \quad (5)$$

$$\text{spezifische Aktivität [U/mg]} = \frac{\text{Volumenaktivität [U/L]}}{\text{Proteingehalt [mg/L]}} \quad (6)$$

Alle photometrischen Aktivitätsbestimmungen wurden mindestens als Dreifachbestimmung durchgeführt.

7.5.1 ABTS-Assay

Die photometrische Bestimmung der Enzymaktivität von Laccasen und Peroxidasen erfolgte mit 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) als Substrat (Abbildung 83) [162].

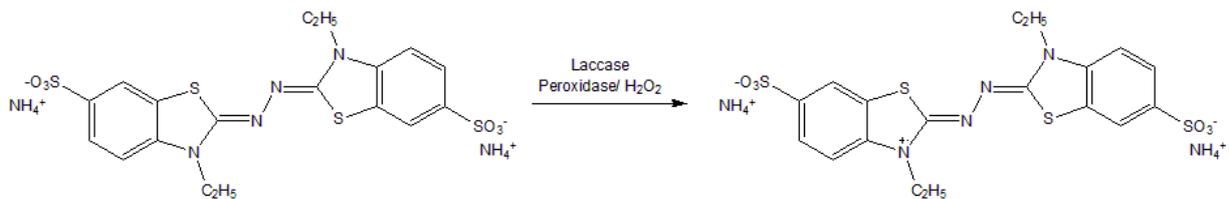


Abbildung 83: Oxidation von ABTS zum Radikalkation (ABTS^{•+}) [209]

Der molare dekadische Extinktionskoeffizient von ABTS^{•+} beträgt $\epsilon_{420} = 3,6 \cdot 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ [162]. Die Änderung der Absorption wurde in Polystyrolküvetten ($d = 1 \text{ cm}$) und in Intervallen von 15 Sekunden über 3 Minuten verfolgt. Die Bestimmung der Laccasen erfolgte unter Verwendung von 750 μL 0,3 mM ABTS in 50 mM Natriummalonatpuffer (pH 4,5) oder Wasser, 30, 50 oder 100 μL Enzymlösung und entsprechend 720, 700 oder 650 μL dest. Wasser bzw. Pufferlösung.

Die Bestimmung der Peroxidasen erfolgte unter Verwendung von 750 μL 0,3 mM ABTS in 50 mM Natriummalonat-Puffer (pH 4,5) oder Wasser, 30, 50 oder 100 μL Enzymlösung und entsprechend 670, 650 oder 700 μL dest. Wasser oder Pufferlösung sowie 50 μL 6 mM H₂O₂.

7.5.2 DMP-Assay

Des Weiteren wurden die Enzymaktivitäten der Laccasen mit dem Substrat 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) bestimmt (Abbildung 84) [210].

Der molare dekadische Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon_{468} = 1,48 \cdot 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ [211]. Die Änderung der Absorption wurde in Polystyrolküvetten ($d = 1 \text{ cm}$) und in Intervallen von 15 Sekunden über 3 Minuten verfolgt.

Die Bestimmung der Laccasen erfolgte unter Verwendung von 750 μL 2,3 mM DMP in Wasser, 30, 50 oder 100 μL Enzymlösung und entsprechend 720, 700 oder 650 μL der entsprechenden Pufferlösung.

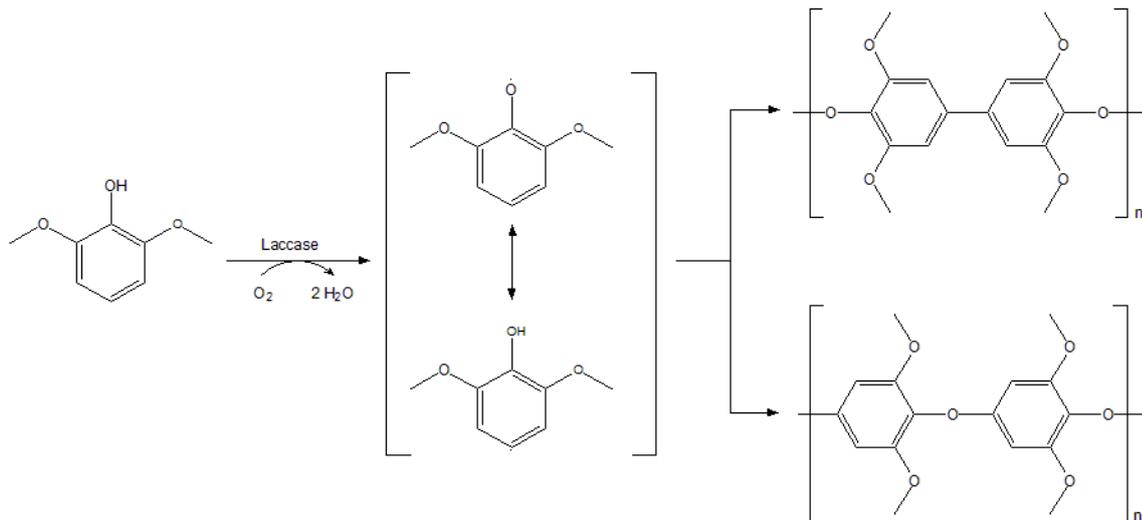


Abbildung 84: Oxidation von 2,6-Dimethoxyphenol durch Laccasen nach [210]

7.5.3 Mn(II)-malonat-Assay

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten der Manganperoxidase erfolgte neben dem ABTS-Assay mit dem Substrat Mn(II)-malonat (Abbildung 85) [163].

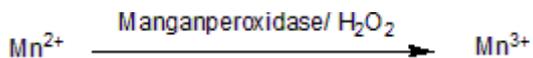


Abbildung 85: Oxidation von Mangan(II) zu Mangan(III) durch eine Manganperoxidase

Der molare dekadische Extinktionskoeffizient von Mn(III)-malonat beträgt $\epsilon_{270} = 1,159 \cdot 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ [163]. Die Änderung der Absorption wurde in Quarzküvetten ($d = 1 \text{ cm}$) und in Intervallen von 15 Sekunden über 3 Minuten verfolgt. Die Bestimmung der Peroxidase erfolgte unter Verwendung von $750 \mu\text{L}$ $1,0 \text{ mM}$ Mangan(II)chlorid in 100 mM Natriummalonatpuffer (pH 2,0 bis pH 5,5), $30, 50$ oder $100 \mu\text{L}$ Enzymlösung und entsprechend $720, 700$ oder $650 \mu\text{L}$ Wasser.

7.6 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte photometrisch unter Verwendung des Bradford-Reagenz (vgl. Kapitel 7.4.5) bei 595 nm [202]. Als Proteinstandard wurde der lineare Teil einer Kalibrierung mit Rinderserumalbumin (BSA) verwendet ($20 - 300 \text{ mg/L}$).

7.7 Isolierung der ligninolytischen Enzyme

Die Isolierung der ligninolytischen Enzyme aus dem „Anzuchtmedium Dickklauge“ erfolgte nach Erreichen des Aktivitätsmaximums.

Abbildung 86 zeigt eine schematische Darstellung des entwickelten Aufreinigungsprotokolls.

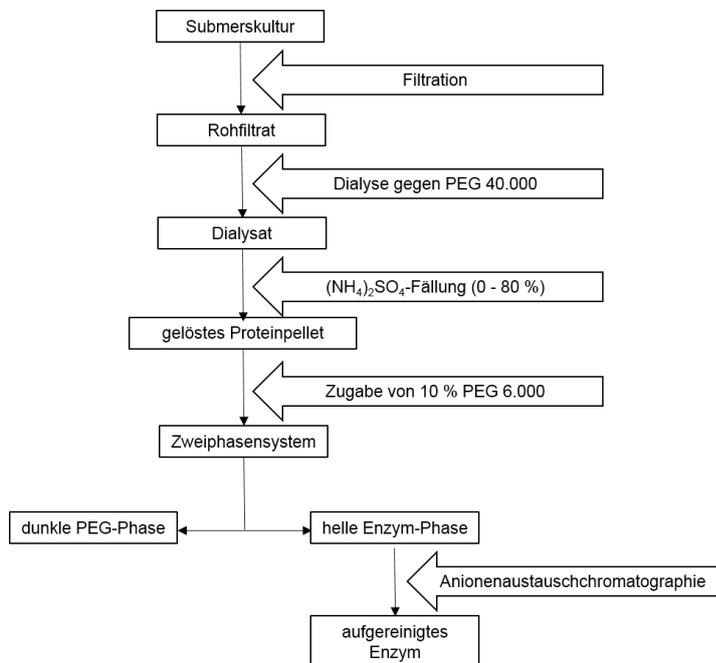


Abbildung 86: Schematische Darstellung der Enzymisolierung und -aufreinigung

Nach einer Filtration, bei der das Pilzmycel abgetrennt wurde, erfolgte über Nacht eine Dialyse gegen Polyethylenglycol 40.000 (PEG 40.000). Die im Dialysat enthaltenen Proteine wurden im Anschluss mit Ammoniumsulfat (80 %-Sättigung) ausgefällt. Im Anschluss wurde das Proteinpellet in dest. Wasser aufgenommen und mit 10 % (w/v) Polyethylenglycol 6.000 (PEG 6.000) versetzt. Die Zugabe von PEG 6.000 bewirkt die Ausbildung eines wässrigen Zweiphasensystems. In der dunklen, hochviskösen Phase ist ein Großteil der Ligninsulfonate gelöst, während die ligninolytischen Enzyme nahezu ausschließlich in der hellen Phase zu finden sind. Nach Aufkonzentrierung der hellen Phase mittels Ultrafiltration (Vivaspin 20; 30 kDa MWCO, PES) erfolgte eine Anionenaustauschchromatographie (IC) mit UV-Detektion (vgl. Kapitel 7.2.1). Hierbei wurde das Eluat mittels Fraktionensammler in 1 mL-Aliquots fraktioniert. Die enzymhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration entsalzt und aufkonzentriert. Auf jeder Aufarbeitungsstufe erfolgte die Bestimmung der Enzymaktivität mittels ABTS-Assay (vgl. Kapitel 7.5.1) und des Proteingehalts nach Bradford (vgl. Kapitel 7.6).

7.8 Charakterisierung der ligninolytischen Enzyme

7.8.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Molekulargewicht der Enzyme wurde mittels SDS-PAGE ermittelt. Das Trenngel wurde durch Zugabe von 5,3 mL Acrylamid (30 %), 100 μ L Ammoniumpersulfat (APS, 10 %) und 20 μ L *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zu 4 mL des Gel-Puffers (vgl. Kapitel 7.4.6) zwischen zwei Glasplatten hergestellt. Nach abgeschlossener Polymerisation kann das Gel verwendet werden.

30 μ L des aufgereinigten Enzyms wurden mit 10 μ L Probenpuffer (vgl. Kapitel 7.4.6) in einem 2 mL Reaktionsgefäß gemischt und 10 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert. Nach Abkühlen im Eisbad wurden 15 μ L in eine Geltasche pipettiert.

Die gelelektrophoretische Trennung (Biometra Minigel-Twin) erfolgte bei einer Spannung von 35 Volt. Als Vergleich wurden 5 μ L eines Molekulargewichtsstandards (Low molecular weight standard 14,4 - 97,4 kDa; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D) aufgetragen.

Nach der Trennung wurde das Gel mit der Färbelösung SDS-Gele über Nacht gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit einer 40 %-igen wässrigen Methanollösung (vgl. Kapitel 7.4.6).

7.8.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte analog zur Gebrauchsanweisung zum „SERVAGel™ IEF 3-10 Starter Kit; Precast Vertical Gels for Isoelectric Focussing (Kat.-Nr. 43205.01)“. 15 μ L des aufgereinigten Enzyms wurden mit 15 μ L Probenpuffer in einem 2 mL Reaktionsgefäß gemischt, Hiervon wurden 15 μ L in eine Geltasche pipettiert.

Die gelelektrophoretische Trennung (Hoefer SE-250) erfolgte unter folgenden Bedingungen:

60 min U = 50 V = konstant

60 min U = 200 V = konstant

30 min U = 500 V = konstant

Als Vergleich wurden 5 μ L des IEF Marker 3-10, Liquid Mix (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D) verwendet.

Nach der Trennung erfolgte eine 20 minütige Fixierung mit 20 % (w/v) Trichloressigsäurelösung. Nach einem Waschschrift mit Wasser wurde das Gel mit der Färbelösung für zwei Stunden gefärbt. Anschließend erfolgte die Entfärbung mit 3 %-iger H_3PO_4 und eine Konservierung mit 30 % (v/v) Ethanol und 5 % (w/v) Glycerin über Nacht.

7.8.3 Bestimmung des pH-Optimums

Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte für die Substrate ABTS und DMP im Bereich von pH 2,0 bis pH 7,0 und für das Substrat Mn(II)-malonat im Bereich von pH 2,0 bis pH 5,5. Das Substrat lag gelöst in Wasser vor. Folgende Puffer wurden für die Substrate ABTS und DMP verwendet (vgl. Kapitel 7.4.1):

pH 2,0 – pH 5,5: 25 mM Natriumcitratpuffer

pH 6,0 – pH 7,0: 25 mM Natriumphosphatpuffer

7.8.4 Bestimmung der pH-Stabilität

In je einem 50 mL-Zentrifugenröhrchen wurden 24 mL eines Puffers und 1,5 mL einer Enzymlösung gemischt und bei 25 °C inkubiert. Folgende Puffer wurden verwendet (vgl. Kapitel 7.4.1):

pH 2,0 – pH 5,5: 25 mM Natriumcitratpuffer

pH 6,0 – pH 7,0: 25 mM Natriumphosphatpuffer

Innerhalb von 48 Stunden wurden zu definierten Zeitpunkten jeweils drei Enzymtests durchgeführt. Hierbei wurden 750 µL ABTS in Wasser und 750 µL (Laccasen) bzw. 700 µL (Manganperoxidase) des in Puffer inkubierten Enzyms verwendet. Bei der Manganperoxidase erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 50 µL 6 mM H₂O₂.

7.8.5 Bestimmung des Temperaturoptimums

Die Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgte nach Temperieren des in Wasser gelösten Substrates und des Puffers, dessen pH-Wert dem pH-Optimum entsprach, auf Temperaturen zwischen 0 °C und 90 °C.

7.8.6 Bestimmung der Temperaturstabilität

In je 36 2 mL-Reaktionsgefäßen pro Temperaturstufe wurden 720 µL (Laccasen) bzw. 670 µL (Manganperoxidase) des Puffers mit dem pH-Wert am pH-Optimum des zu charakterisierenden Enzyms und 30 µL des Enzyms vorgelegt. Die Reaktionsgefäße wurden bei den verschiedenen Temperaturen (30 °C, 40 °C, 50 °C; 60 °C, 70 °C, 80 °C) inkubiert. Innerhalb der ersten fünf Inkubationsstunden wurden zu definierten Zeitpunkten jeweils drei Reaktionsgefäße entnommen und mittels Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Unmittelbar nach dem Abkühlen erfolgte die Bestimmung der Enzymaktivität 750 µL der

ABTS-Substratlösung in Wasser. Bei der Manganperoxidase erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 50 μL 6mM H_2O_2 .

7.8.7 Einfluss verschiedener Metallsalze auf die Enzymaktivität

Statt der Zugabe von Puffer oder Wasser zum ABTS-Assay wurden verschiedene Metallsalzlösungen mit den Konzentrationen 0,1 mM, 1,0 mM und 10 mM verwendet. Das Substrat wurde in dem Puffer mit dem pH- Optimums des zu charakterisierenden Enzyms gelöst.

7.8.8 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Enzymaktivität

Der Einfluss verschiedener Inhibitoren wurde analog zum Einfluss verschiedener Metallsalze untersucht.

7.8.9 Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Bestimmung der kinetischen Parameter K_m (Michaelis-Konstante) und v_{\max} (maximale Umsatzgeschwindigkeit) erfolgte anhand verschiedener Enzymassays mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen (0,01 mM – 10,0 mM ABTS; 0,01 mM – 15,0 mM DMP; 0,1 mM – 5,0 mM Mn(II)-malonat (vgl. Kapitel 7.4.2)). Anhand einer Auftragung nach Lineweaver und Burk erfolgte die Berechnung von K_m und v_{\max} .

7.8.10 Aufnahme von UV/VIS-Spektren

Die UV/VIS-Spektren der Manganperoxidase von *C. viscosa* wurden in wässriger Lösung gegen Wasser aufgenommen. Durch Zugabe von 50 μL einer 6 mM Wasserstoffperoxidlösung erfolgte die Aktivierung der Manganperoxidase.

7.9 Kernspinresonanzspektroskopie

20 mg Probe wurden in 500 μL deuteriertem Lösungsmittel direkt im NMR-Röhrchen gelöst (Vanillin: $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$; Dehydrodivanillin: DMSO-d_6). ^1H und ^{13}C -NMR-Messungen wurden an einem Bruker Advance III 600 Spektrometer durchgeführt. Als interne Standard dienten die deuterierten Lösungsmittel. Alle chemischen Verschiebungen werden in ppm angegeben.

7.10 Synthese der Modellspezies 6,6'-Dihydroxy-5,5'-dimethoxy-biphenyl-3,3'-dicarbaldehyd (Dehydrodivanillin)

Die Modellspezies 6,6'-Dihydroxy-5,5'-dimethoxy-biphenyl-3,3'-dicarbaldehyd (Dehydrodivanillin) erfolgte nach Elbs *et al.* [201].

7,5 g Vanillin wurden in einem 500 mL-Dreihalskolben mit Rückflusskühler in 250 mL dest. Wasser suspendiert und unter Erhitzen gelöst. Zur Lösung wurden langsam 0,46 g Eisen(II)-sulfat und 7,1 h Kaliumperoxodisulfat gegeben. Dabei bildet sich ein brauner Niederschlag, der für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt wurde. Der Niederschlag wurde abgesaugt und in ca. 100 mL 1M Kalilauge gelöst. Das Dehydrodivanillin wurde durch die langsame Zugabe von ca. 100 mL ausgefällt. Der hellbraune Niederschlag wurde abgesaugt, mit Methanol gewaschen und lyophilisiert.

Ausbeute: 60,9 %

7.11 Durchführung der Abbaueversuche

7.11.1 Abbaueversuche mit der Laccase und 1-Hydroxybenzotriazol

15 mg der Modellspezies, 30 mg der getrockneten Dicklaue bzw. 30 mg der bis pH 2 gefällten und anschließend getrockneten Schwarzlaue wurden in 4 mL 50 mM Natriummalonatpuffer pH 4,5, der den Mediator 1-Hydroxybenzotriazol (1mM) enthielt, suspendiert. Nach Zugabe von 250 µL Enzymlösung (Laccase von *A. brasiliensis*: 4000 U/L) wurde für 1 Woche im Dunkeln bei 25 °C inkubiert. Als Kontrolllösung wurde jeweils ein Ansatz mit zusätzlich 250 µL des Puffers anstatt der Enzymlösung angesetzt.

7.11.2 Abbaueversuche mit der Manganperoxidase

15 mg der Modellspezies, 30 mg der getrockneten Dicklaue bzw. 30 mg der bis pH 2 gefällten und anschließend getrockneten Schwarzlaue wurden in 4 mL 50 mM Natriummalonatpuffer pH 4,5, der 2,5 mM MnCl₂ enthielt, suspendiert. Nach Zugabe von 250 µL Enzymlösung (Manganperoxidase von *C. viscosa*: 4000 U/L) und 50 µL 6 mM H₂O₂ wurde für 1 Woche im Dunkeln bei 25 °C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde der Peroxidgehalt mittels Teststäbchen kontrolliert (Quantofix® Peroxid 25, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D) und gegebenenfalls durch Zugabe von 50 µL 6 mM H₂O₂ erhöht. Als Kontrolllösung wurde jeweils ein Ansatz mit zusätzlich 250 µL des Puffers anstatt der Enzymlösung angesetzt.

7.12 Probenvorbereitung zur Analyse der Abbauprobungen mittels GCxGC-(ToF)MS

Abbauprobe mit Dehydrodivanillin, Schwarzlauge

100 µL des Abbauprobens bzw. des entsprechenden Blindversuchs wurden in einem GC-Vial an der Luft getrocknet. Nach Zugabe von 100 µL Pyridin und 500 µL BSTFA wurde das verschlossene Vial eine Stunde bei 80 °C im Trockenschrank belassen. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung direkt zur Analyse eingesetzt.

Die Abbauprobungen mit Dehydrodivanillin wurden ebenfalls mit TMSH derivatisiert. Dazu wurden 100 µL des Abbauprobens bzw. des entsprechenden Blindversuchs in einem GC-Vial an der Luft getrocknet. Nach Zugabe von 500 µL Methanol und 250 µL TMSH wurde die Lösung direkt zur Analyse eingesetzt.

Abbauprobe mit Dimer=O (1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxy-phenoxy)-ethanon)

100 µL des Abbauprobens bzw. des entsprechenden Blindversuchs wurden in einem GC-Vial an der Luft getrocknet. Nach Zugabe von 100 µL Dichlormethan und 100 µL Pyridin und 500 µL BSTFA wurde das verschlossene Vial eine Stunde bei 80 °C im Trockenschrank belassen. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung direkt zur Analyse eingesetzt.

Abbauprobe mit Dicklauge

100 µL des Abbauprobens bzw. des entsprechenden Blindversuchs wurden in einem GC-Vial an der Luft getrocknet. Nach Zugabe von 100 µL DMF und 50 µL Pyridin und 500 µL BSTFA wurde das verschlossene Vial eine Stunde bei 80 °C im Trockenschrank belassen. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung direkt zur Analyse eingesetzt.

7.13 Quantifizierung der Monosaccharide

Die Quantifizierung der Monosaccharide erfolgte gaschromatographisch nach Derivatisierung zu Aldonitrilacetaten [204,205]. Im ersten Schritt der Derivatisierung werden die Monosaccharide mit Hydroxylamin zu Oximen umgesetzt. Diese reagieren dann mit Essigsäureanhydrid zu Aldonitrilacetaten. Das zugehörige Derivatisierungsschema ist in Abbildung 87 dargestellt.

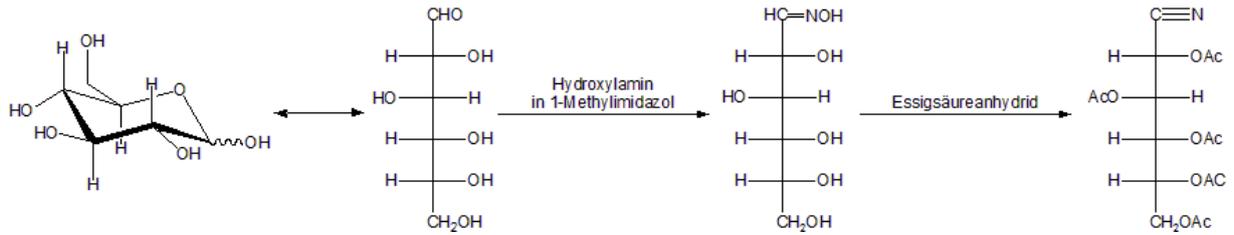


Abbildung 87: Derivatisierung von Monosacchariden zu Aldonitrilacetaten am Beispiel Glucose [205]

250 μL Probe bzw. Kalibrierstandard wurden mit 100 μL internem Standard (*myo*-Inositol) und 400 μL Hydroxylamin in 1-Methylimidazol versetzt und 10 Minuten bei 80 $^{\circ}\text{C}$ unter Rühren inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde 1 mL Essigsäureanhydrid langsam zugegeben. Anschließend wurde zur abgekühlten Lösung 1,5 mL Dichlormethan und 1 mL dest. Wasser. Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Phase verworfen. Die organische Phase wurde nach zweimaligen Waschen mit je 1 mL dest. Wasser mit Natriumsulfat getrocknet und über einen Spritzenvorsatzfilter in ein GC-Vial überführt. Die filtrierten Lösungen wurden zur gaschromatographischen Analyse eingesetzt.

Abbildung 88 zeigt ist ein Chromatogramm der Trennung der Aldonitrilacetate.

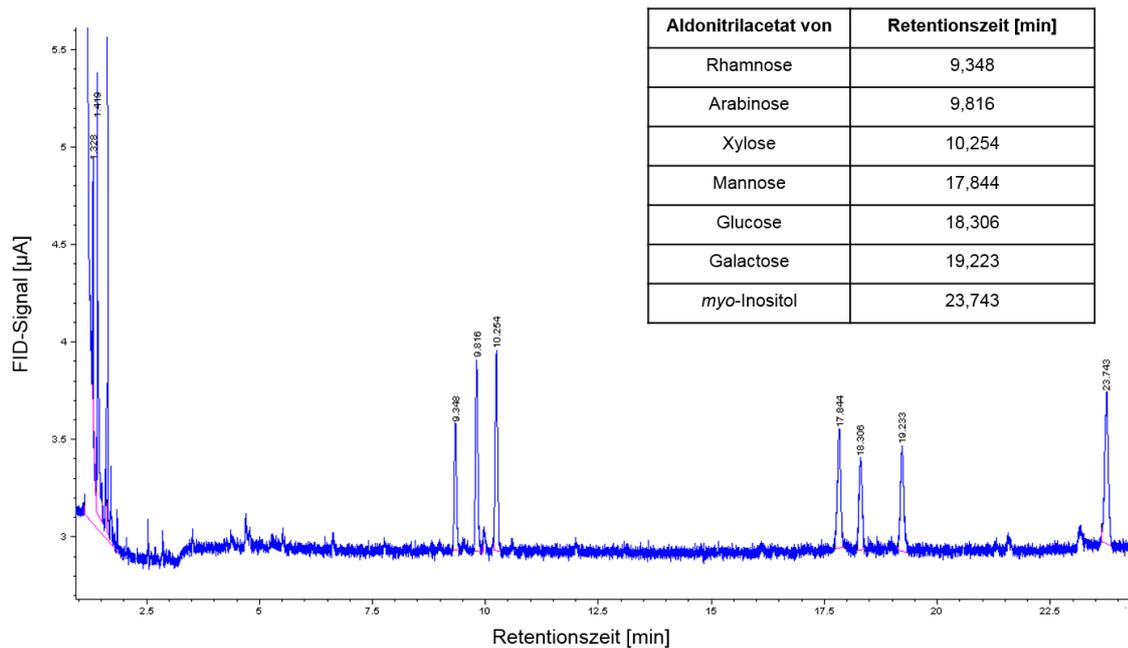


Abbildung 88: GC-FID-Chromatogramm der Trennung von Aldonitrilacetaten

8 Literaturverzeichnis

- [1] GDCh, DECHEMA, DGMK und VCI (2010); „*Positionspapier - Rohstoffbasis im Wandel*“
- [2] Oertel, D. (2007); „*Industrielle stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe, Arbeitsbericht Nr.14, Sachstandsbericht zum Monitoring "Nachwachsende Rohstoffe"*“
- [3] Kamm, B. et al. (2010); „*Biorefineries - Industrial processes and products*“; 1. Auflage; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Weinheim
- [4] Kamm, B. und Kamm, M. (2007); „*International biorefinery systems*“; Pure and Applied Chemistry 79 (11) 1983 - 1997
- [5] Zobelein, H. (2001); „*Dictionary of renewable resources*“; 2. überarbeitete und erweiterte Auflage; Wiley-VCH Verlag GmbH; Weinheim
- [6] Bresinsky, A. et al. (2008); „*Strasburger Lehrbuch der Botanik*“; 36. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg
- [7] Wilson, B.F. (1964); „*A model for cell production by the cambium of conifers*“ in Zimmermann, M.H.; The formation of wood in forest trees; S. 19 - 36; Academic Press Inc.; New York, London
- [8] Mombächer, R. (1988); „*Holz-Lexikon; Nachschlagewerk für die Holz- und Forstwirtschaft*“; 3., neubearbeitete Auflage; DRW-Verlag Weinbrenner-KG; Leinfelden-Echterdingen
- [9] Sadava, D. et al. (2011); „*Purves Biologie*“; 9. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg
- [10] Franke, W. (1997); „*Nutzpflanzenkunde*“; 6. überarbeitete und erweiterte Auflage; Georg Thieme Verlag; Stuttgart
- [11] Schubert, W.J. (1965); „*Lignin biochemistry*“; Academic Press Inc.; New York, London
- [12] Meier, H. (1964); „*General chemistry of cell walls and distribution of the chemical constituents across the walls*“ in Zimmermann, M.H.; The formation of wood in forest trees; S. 137 - 151; Academic Press Inc.; New York, London
- [13] Fengel, D. und Wegener, G. (2003); „*Wood - chemistry, ultrastructure, reactions*“; Kessel Verlag; Remagen
- [14] Sjöström, E. (1993); „*Wood chemistry - fundamentals and applications*“; 2. Auflage; Academic Press, Inc.; London
- [15] Higuchi, T. (1997); „*Biochemistry and molecular biology of wood*“; Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York
- [16] Kamm, B. et al. (2010); „*Lignocellulose-based chemical products and product family trees*“ in Kamm, B., Gruber, P.R., Kamm, M.; Biorefineries - Industrial processes and

- products - Status quo and future directions Volume 2; Kapitel 3; S. 97 - 149; 1. Auflage; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Weinheim
- [17] Shmulsky, R. und Jones, P.D. (2011); „*Forest products and wood science: an introduction*“; 6. Auflage; Wiley-Blackwell; Hoboken
- [18] Kollmann, F.F.P. und Côté, W.A. (1968); „*Principles of wood science and technology I. Solid wood*“; Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York
- [19] Sanchez, C. (2009); „*Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi*“; Biotechnology Advances **27** (2) 185 - 194
- [20] Sixta, H. (2006); „*Handbook of Pulp Volume 1*“; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Weinheim
- [21] Fengel, D. et al. (1983); „*Charakterisierung von drei Tropenholzligninen*“; *Holzforschung* **37** (3) 121 - 124
- [22] Timell, T.E. (1960); „*Isolation and properties of an O-acetyl-4-O-methylglucuronoxylglycan from the wood of white birch (Betula papyrifera)*“; *Journal of the American Chemical Society* **82** (19) 5211 - 5215
- [23] Timell, T.E. (1959); „*The polysaccharides of yellow birch (Betula lutea) .2. The constitution of the main hemicellulose*“; *Journal of the American Chemical Society* **81** (18) 4989 - 4994
- [24] Gillham, J.K. und Timell, T.E. (1958); „*The hemicellulose of white elm (Ulmus americana) .1. Identification of 2-ortho-(4-ortho-methyl-D-glucopyranosyluronic acid)-D-xylopyranose*“; *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie* **36** (2) 410 - 413
- [25] Johansson, M.H. und Samuelson, O. (1977); „*Reducing end groups in birch xylan and their alkaline-degradation*“; *Wood Science and Technology* **11** (4) 251 - 263
- [26] Odzuck, W. und Kauss, H. (1972); „*Biosynthesis of pure araban and xylan*“; *Phytochemistry* **11** (8) 2489 - 2494
- [27] Ebringerová, A. et al. (1969); „*Structural features of (4-O-methylglucurono)xylan from hornbeam wood (Carpinus betulus)*“; *Holzforschung* **23** (3) 89 - 92
- [28] Ebringerová, A. et al. (1967); „*Fractional extraction of hemicelluloses from the wood of hornbeam (Carpinus betulus L.)*“; *Holzforschung* **21** (3) 74 - 77
- [29] Gillham, J.K. und Timell, T.E. (1958); „*The hemicellulose of white elm (Ulmus americana) .2. Constitution of the methyl glucurono-xylan*“; *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie* **36** (11) 1467 - 1474
- [30] Jones, J.K. et al. (1961); „*Constitution of a 4-O-methylglucuronoxylan from wood of trembling aspen (Populus Tremuloides Michx)*“; *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie* **39** (5) 1059 - 1066
- [31] Timell, T.E. (1959); „*The constitution of a hemicellulose from sugar maple (Acer saccharum)*“; *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie* **37** (5) 893 - 898

- [32] Han, M. und Swan, B. (1968); „*Methylation studies of xylans from eucalyptus and birchwood*“; Svensk Papperstidning **71** (16) 552 - 557
- [33] Mian, A.J. und Timell, T.E. (1960); „*Ginkgo biloba. III. Constitution of a glucomannan from the wood*“; Svensk Papperstidning **63** 884 - 888
- [34] Ebringerová, A. et al. (1972); „*Glucomannan from the wood of hornbeam (Carpinus betulus)*“; Holzforschung **26** (3) 89 - 92
- [35] Mian, A.J. und Timell, T.E. (1960); „*Isolation and properties of a glucomannan from the wood of red maple (Acer rubrum L)*“; Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie **38** (9) 1511 - 1517
- [36] Timell, T.E. und Zinbo, M. (1967); „*Polysaccharides in the wood of eastern hemlock: structure and degree of branching of an arabino-4-O-methylglucuronoxylan*“; Tappi **50** (4) 195 - 198
- [37] Harwood, V.D. (1972); „*Cell wall polysaccharides of Pinus radiata, I. Isolation and structure of a xylan*“; Sv Papperstidn **75** (6) 207 - 212
- [38] Zinbo, M. und Timell, T.E. (1965); „*Degree of branching of hardwood xylans*“; Svensk Papperstidning **68** (19) 647 - 662
- [39] Schwarz, F.C.A. und Timell, T.E. (1963); „*Characterization of three hemicelluloses from the wood of amabilis fir*“; Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie **41** (6) 1381 - 1388
- [40] Kooiman, P. und Adams, G.A. (1961); „*Constitution of a glucomannan from tamarack (Larix laricina)*“; Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie **39** 889 - 896
- [41] Mills, A.R. und Timell, T.E. (1963); „*Constitution of three hemicelluloses from wood of Engelmann spruce (Picea engelmannii)*“; Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie **41** (6) 1389 - 1395
- [42] Rogers, J.K. und Thompson, N.S. (1969); „*Galactoglucomannan polysaccharides of Engelmann spruce*“; Svensk Papperstidning **72** (3) 61 - 67
- [43] Bishop, C.T. und Cooper, F.P. (1960); „*Constitution of a Glucomannan from Jack Pine (Pinus banksiana, Lamb)*“; Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie **38** (6) 793 - 804
- [44] Hoffmann, G.C. und Timell, T.E. (1970); „*Isolation and characterization of a galactoglucomannan from red pine (Pinus resinosa) wood*“; Tappi **53** (10) 1896 - 1899
- [45] Timell, T.E. (1962); „*Polysaccharides in the wood of eastern hemlock (Tsuga canadensis). III. Structure of an alkali-soluble galactoglucomannan*“; Tappi **45** 799 - 802
- [46] Thompson, N.S. und Kaustinen, O.A. (1964); „*Noncellulosic polysaccharides of spruce holocellulose*“; Paperi ja Puu **46** (11) 637 - 650
- [47] Lindberg, B. et al. (1973); „*Positions of the O-acetyl groups in pine glucomannan*“; Svensk Papperstidning **76** (10) 383 - 384

- [48] Fengel, D. et al. (1978); „*Analysis of wood and cellulose by total hydrolysis with trifluoroacetic acid*“; *Cellulose Chemistry and Technology* **12** (1) 31 - 37
- [49] Timell, T.E. (1969); „*Chemical composition of tension wood*“; *Svensk Papperstidning* **72** (6) 173 - 183
- [50] Côté, W.A. et al. (1966); „*Studies on compression wood .2. Chemical composition of wood and bark from normal and compression regions of 15 species of gymnosperms*“; *Svensk Papperstidning-Nordisk Cellulosa* **69** (17) 547 - 558
- [51] Sarkanen, K.V. und Ludwig, C.H. (1971); „*Lignins: occurrence, formation, structure and reactions*“; Wiley Interscience; New York, London, Sydney, Toronto
- [52] Eriksson, K.E.L. (1993); „*Concluding remarks - where do we stand and where are we going - lignin biodegradation and practical utilization*“; *Journal of Biotechnology* **30** (1) 149 - 158
- [53] Campbell, M.M. und Sederoff, R.R. (1996); „*Variation in lignin content and composition - Mechanism of control and implications for the genetic improvement of plants*“; *Plant Physiology* **110** (1) 3 - 13
- [54] Henriksson, G. (2009); „*Lignin*“ in Ek, M., Gellerstedt, G., Henriksson, G.; *Pulp and paper chemistry and technology: Wood chemistry and wood biotechnology - Volume 1; Kapitel 6; S. 121 - 146; 1. Auflage; Walter de Gruyter GmbH & Co.KG; Berlin*
- [55] Adler, E. (1977); „*Lignin chemistry - past, present and future*“; *Wood Science and Technology* **11** (3) 169 - 218
- [56] Nimz, H. (1974); „*Das Lignin der Buche - Entwurf eines Konstitutionsschemas*“; *Angewandte Chemie* **86** (9) 336 - 344
- [57] Sandermann, H., Jr. et al. (1983); „*Metabolism of environmental chemicals by plants - copolymerization into lignin*“; *Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium* **37** 407 - 420
- [58] Higuchi, T. (1979); „*Biochemistry of lignification*“; *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 84
- [59] Pearl, I.A. (1967); „*The chemistry of lignin*“; Marcel Dekker, Inc.; New York
- [60] Glasser, W.G. (1980); „*Lignin*“ in Casey, J.P.; *Pulp and paper - Chemistry and chemical technology - Volume I; Kapitel 2: Lignin; S. 39 - 111; 3. Auflage; John Wiley & sons; New York, Chichester, Brisbane, Toronto*
- [61] Freudenberg, K. und Neish, A.C. (1968); „*Constitution and biosynthesis of lignin*“; Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York
- [62] Brown, S.A. und Neish, A.C. (1955); „*Shikimic acid as a precursor in lignin biosynthesis*“; *Nature* **175** (4459) 688 - 689
- [63] Gross, G.G. et al. (1973); „*Three novel enzymes involved in reduction of ferulic acid to coniferyl Alcohol in higher plants: ferulate-CoA Ligase, feruloyl-CoA reductase and coniferyl alcohol oxidoreductase*“; *Febs Letters* **31** (3) 283 - 286

- [64] Gross, G.G. et al. (1975); „*Hydroxycinnamate:Coenzyme - A ligase from lignifying tissue of higher plants - some properties and taxonomic distribution*“; *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **168** (1-4) 41 - 51
- [65] Boerjan, W. et al. (2003); „*Lignin biosynthesis*“; *Annual Review of Plant Biology* **54** 519 - 546
- [66] Hatakka, A. (2001); „*Biodegradation of lignin*“ in Hofrichter, M., Steinbüchel, A.; *Biopolymers Volume 1: Lignin, humic substances and coal*; Kapitel 5; S. 129 - 180; Wiley-VCH; Weinheim
- [67] Sjöström, E. (1993); „*Lignin*“ in *Wood chemistry - Fundamentals and applications*; Kapitel 4; S. 71 - 89; 2. Auflage; Academic Press, Inc.; San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto
- [68] Lai, Y.Z. und Sarkanen, K.V. (1975); „*Structural variation in dehydrogenation polymers of coniferyl alcohol*“; *Cellulose Chemistry and Technology* **9** (3) 239 - 245
- [69] Kirk, T.K. et al. (1975); „*Preparation and microbial decomposition of synthetic [C-14]lignins*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72** (7) 2515 - 2519
- [70] Marjamaa, K. et al. (2009); „*The role of xylem class III peroxidases in lignification*“; *Journal of Experimental Botany* **60** (2) 367 - 376
- [71] Wong, D.W.S. (2009); „*Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes*“; *Applied Biochemistry and Biotechnology* **157** (2) 174 - 209
- [72] Azadi, P. et al. (2013); „*Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review*“; *Renewable & Sustainable Energy Reviews* **21** 506 - 523
- [73] Wardrop, A.B. (1964); „*The structure and formation of the cell wall in xylem*“ in Zimmermann, M.H.; *The formation of wood in forest trees*; S. 87 - 134; Academic Press Inc.; New York, London
- [74] Shimada, M. et al. (1972); „*O-Methyltransferase activity from japanese black pine*“; *Phytochemistry* **11** (9) 2657 - 2662
- [75] Gilbertson, R.L. (1980); „*Wood-rotting fungi of North-America*“; *Mycologia* **72** (1) 1 - 49
- [76] Eriksson, K.E.L. et al. (1990); „*Biodegradation of lignin*“ in Eriksson, K.E.L., Blanchette, R.A., Ander, P.; *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood compounds*; Kapitel 4; S. 225 - 333; 1. Auflage; Springer Verlag; New York, Berlin, Heidelberg
- [77] Kirk, T.K. und Farrell, R.L. (1987); „*Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin*“; *Annual Review of Microbiology* **41** (1) 465 - 505
- [78] Hofrichter, M. und Steinbüchel, A. (2001); „*Biopolymers*“; 1; Wiley-VCH; Weinheim
- [79] Tien, M. und Kirk, T.K. (1983); „*Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds*“; *Science* **221** (4611) 661 - 662

- [80] Martinez, A.T. et al. (2005); „*Biodegradation of lignocellulosics: microbial chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin*“; *International Microbiology* **8** (3) 195 - 204
- [81] Reid, I.D. (1995); „*Biodegradation of Lignin*“; *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **73** (S1) S1011 - S1018
- [82] Lundell, T.K. et al. (2010); „*Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes - ecological, functional and phylogenetic review*“; *Journal of Basic Microbiology* **50** (1) 5 - 20
- [83] Blanchette, R.A. (1984); „*Selective delignification of eastern hemlock by Ganoderma tsugae*“; *Phytopathology* **74** (2) 153 - 160
- [84] Blanchette, R.A. (1984); „*Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation*“; *Applied and Environmental Microbiology* **48** (3) 647 - 653
- [85] Blanchette, R.A. (1984); „*Selective delignification of wood by white-rot fungi*“; *Applied Biochemistry and Biotechnology* **9** (4) 323 - 324
- [86] Blanchette, R.A. (1995); „*Degradation of the lignocellulose complex in wood*“; *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **73** (S1) S999 - S1010
- [87] Ander, P. und Eriksson, K.E. (1977); „*Selective degradation of wood components by white-rot fungi*“; *Physiologia Plantarum* **41** (4) 239 - 248
- [88] Otjen, L. et al. (1987); „*Assessment of 30 white rot basidiomycetes for selective lignin degradation*“; *Holzforschung* **41** (6) 343 - 349
- [89] Martinez, A.T. et al. (1994); „*Progress in biopulping of non-woody materials - chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat-straw delignification with ligninolytic fungi from the genus Pleurotus*“; *FEMS Microbiology Reviews* **13** (2-3) 265 - 274
- [90] Guillen, F. et al. (1992); „*Substrate-specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus Pleurotus eryngii*“; *European Journal of Biochemistry* **209** (2) 603 - 611
- [91] Gutierrez, A. et al. (1994); „*Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase-activities in ligninolytic fungi of the genus Pleurotus*“; *Applied and Environmental Microbiology* **60** (6) 1783 - 1788
- [92] Dashtban, M. et al. (2010); „*Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin*“; *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **1** (1) 36 - 50
- [93] Hatakka, A. (1994); „*Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation*“; *FEMS Microbiology Reviews* **13** (2-3) 125 - 135
- [94] Vares, T. und Hatakka, A. (1997); „*Lignin-degrading activity and ligninolytic enzymes of different white-rot fungi: Effects of manganese and malonate*“; *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **75** (1) 61 - 71
- [95] Orth, A.B. et al. (1993); „*Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi*“; *Applied and Environmental Microbiology* **59** (12) 4017 - 4023

- [96] Suzuki, M.R. et al. (2006); „Fungal hydroquinones contribute to brown rot of wood"; Environmental Microbiology **8** (12) 2214 - 2223
- [97] Guillen, F. et al. (1997); „Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical"; Archives of Biochemistry and Biophysics **339** (1) 190 - 199
- [98] Piontek, K. et al. (1993); „Low pH crystal-structure of glycosylated lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å resolution"; FEBS Letters **315** (2) 119 - 124
- [99] Piontek, K. et al. (2001); „Lignin peroxidase structure and function"; Biochemical Society Transactions **29** 111 - 116
- [100] Renganathan, V. und Gold, M.H. (1986); „Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular heme enzyme from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*"; Biochemistry **25** (7) 1626 - 1631
- [101] Kersten, P.J. et al. (1985); „The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes"; Journal of Biological Chemistry **260** (5) 2609 - 2612
- [102] Schoemaker, H.E. et al. (1985); „On the mechanism of enzymatic lignin breakdown"; FEBS Letters **183** (1) 7 - 12
- [103] Schoemaker, H.E. et al. (1994); „The oxidation of veratryl alcohol, dimeric lignin models and lignin by lignin peroxidase: The redox cycle revisited"; FEMS Microbiology Reviews **13** (2-3) 321 - 332
- [104] Glenn, J.K. et al. (1983); „An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*"; Biochemical and Biophysical Research Communications **114** (3) 1077 - 1083
- [105] Tien, M. und Kirk, T.K. (1984); „Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* - purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase"; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences **81** (8) 2280 - 2284
- [106] Poulos, T.L. et al. (1993); „Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å"; Journal of Biological Chemistry **268** (6) 4429 - 4440
- [107] Hofrichter, M. (2002); „Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)"; Enzyme and Microbial Technology **30** (4) 454 - 466
- [108] Reddy, G.V.B. et al. (2003); „Cleavage of nonphenolic beta-1 diarylpropane lignin model dimers by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* - Evidence for a hydrogen abstraction mechanism"; European Journal of Biochemistry **270** (2) 284 - 292
- [109] Wariishi, H. et al. (1989); „Thiol-mediated oxidation of nonphenolic lignin model compounds by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*"; Journal of Biological Chemistry **264** (24) 14185 - 14191
- [110] Wesenberg, D. et al. (2003); „White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents"; Biotechnology Advances **22** (1-2) 161 - 187

- [111] Hofrichter, M. et al. (1998); „Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide"; FEBS Letters **434** (3) 362 - 366
- [112] Glenn, J.K. und Gold, M.H. (1985); „Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*"; Archives of Biochemistry and Biophysics **242** (2) 329 - 341
- [113] Kuwahara, M. et al. (1984); „Separation and characterization of two extracellular hydrogen peroxide-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium* "; FEBS Letters **169** (2) 247 - 250
- [114] Sundaramoorthy, M. et al. (1994); „The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution"; Journal of Biological Chemistry **269** (52) 32759 - 32767
- [115] Asgher, M. et al. (2008); „Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system"; Biodegradation **19** (6) 771 - 783
- [116] Hofrichter, M. et al. (2010); „New and classic families of secreted fungal heme peroxidases"; Applied Microbiology and Biotechnology **87** (3) 871 - 897
- [117] Camarero, S. et al. (1999); „Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites"; Journal of Biological Chemistry **274** (15) 10324 - 10330
- [118] Ruiz-Dueñas, F.J. et al. (1999); „Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*"; Molecular Microbiology **31** (1) 223 - 235
- [119] Maciel, M.J.M. et al. (2010); „Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review"; Electronic Journal of Biotechnology **13** (6)
- [120] Claus, H. (2004); „Laccases: structure, reactions, distribution"; Micron **35** (1-2) 93 - 96
- [121] Thurston, C.F. (1994); „The structure and function of fungal laccases"; Microbiology **140** (1) 19 - 26
- [122] Eggert, C. et al. (1997); „Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*"; FEBS Letters **407** (1) 89 - 92
- [123] Youn, H.D. et al. (1995); „Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi"; FEMS Microbiology Letters **132** (3) 183 - 188
- [124] Call, H.P. und Mucke, I. (1997); „History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process)"; Journal of Biotechnology **53** (2-3) 163 - 202
- [125] Eggert, C. et al. (1996); „A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase"; FEBS Letters **391** (1-2) 144 - 148
- [126] Kawai, S. et al. (2002); „Degradation mechanisms of a nonphenolic beta-O-4 lignin model dimer by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole"; Enzyme and Microbial Technology **30** (4) 482 - 489

- [127] Castro, A.I.R.P. et al. (2003); „*Degradation of biphenyl lignin model compounds by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and heteropolyanion [SiW₁₁VO₄₀]⁵⁻*“; *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **22** (1-2) 13 - 20
- [128] Johannes, C. und Majcherczyk, A. (2000); „*Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems*“; *Applied and Environmental Microbiology* **66** (2) 524 - 528
- [129] Li, K.C. et al. (1999); „*Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound*“; *Applied and Environmental Microbiology* **65** (6) 2654 - 2660
- [130] Srebotnik, E. und Hammel, K.E. (2000); „*Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system*“; *Journal of Biotechnology* **81** (2-3) 179 - 188
- [131] Woolridge, E.M. (2014); „*Mixed enzyme systems for delignification of lignocellulosic biomass*“; *Catalysts* **4** (1) 1 - 35
- [132] Bourbonnais, R. und Paice, M.G. (1990); „*Oxidation of nonphenolic substrates - An expanded role for laccase in lignin biodegradation*“; *FEBS Letters* **267** (1) 99 - 102
- [133] Jakob, H. et al. (1999); „*Delignifizierung von Zellstoff mit Laccase und Mediator - Ein Konzept mit Zukunft?*“; *Papier* **53** (2) 85 - 95
- [134] Bourbonnais, R. et al. (1997); „*Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds*“; *Applied and Environmental Microbiology* **63** (12) 4627 - 4632
- [135] Becker, G. (2010); „*Der Wald und seine Nutzung*“ in Depenheuer, O.; *Waldeigentum - Dimensionen und Perspektiven*; Kapitel 9; S. 150 - 162; Springer Verlag; Berlin, Heidelberg
- [136] Biermann, C.J. (1996); „*Handbook of pulping and papermaking*“; 2. Auflage; Elsevier; San Diego
- [137] Bryce, J.R.G. (1980); „*Pulping: Sulfite pulping*“ in Casey, J.P.; *Pulp and paper - Chemistry and chemical technology - Volume I*; Kapitel 4: Pulping; S. 291 - 376; 3. Auflage; John Wiley & sons, Inc.; New York, Chichester, Brisbane, Toronto
- [138] McGovern, J.N. (1980); „*Pulping: Introduction to pulping*“ in Casey, J.P.; *Pulp and paper - Chemistry and chemical technology - Volume I*; Kapitel 4: Pulping; S. 161 - 167; 3. Auflage; John Wiley & sons; New York, Chichester, Brisbane, Toronto
- [139] Blechschmidt, J. (2010); „*Taschenbuch der Papiertechnik*“; 1. Auflage; Carl Hanser Verlag GmbH & Co.KG; München
- [140] Rydholm, S.A. (1965); „*Pulping processes*“; Interscience Publishers; New York, London, Sydney
- [141] Kurdin, J.A. (1980); „*Pulping: Refiner mechanical and thermomechanical pulping*“ in Casey, J.P.; *Pulp and paper - Chemistry and chemical technology - Volume I*; Kapitel 4: Pulping; S. 197 - 252; 3. Auflage; John Wiley & sons; New York, Chichester, Brisbane, Toronto

- [142] Gierer, J. (1985); „*Chemistry of delignification Part 1. General concept and reactions during pulping*“; Wood Science and Technology **19** (4) 289 - 312
- [143] Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (2009); „*Gülfzower Fachgespräche (Band 31) - Stoffliche Nutzung von Lignin*“;
- [144] Pye, E.K. (2010); „*Industrial lignin production and applications*“ in Kamm, B., Gruber, P.R., Kamm, M.; Biorefineries - Industrial processes and products - Status quo and future directions Volume 2; Kapitel 5; S. 165 - 200; 1. Auflage; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Weinheim
- [145] Bryce, J.R.G. (1980); „*Pulping: Alkaline pulping*“ in Casey, J.P.; Pulp and paper - Chemistry and chemical technology - Volume I; Kapitel 4: Pulping; S. 377 - 492; 3. Auflage; John Wiley & sons, Inc.; New York, Chichester, Brisbane, Toronto
- [146] Gellerstedt, G. (2009); „*Chemistry of chemical pulping*“ in Ek, M., Gellerstedt, G., Henriksson, G.; Pulp and paper chemistry and technology: Pulping chemistry and technology - Volume 2; Kapitel 5; S. 91 - 120; 1. Auflage; Walter de Gruyter GmbH & Co.KG; Berlin
- [147] Sixta, H. (2006); „*Handbook of pulp - Volume 2*“; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Weinheim
- [148] Hirth, T. et al. (2012); „*Stoffliche Nutzung von Lignin - Ein Beitrag zur ganzheitlichen stofflichen Nutzung von Biomasse Teil 1: Hintergrund, Rohstoffe, Gewinnung und Nutzung unter Erhalt der polymeren Struktur*“; Holztechnologie **53** (1) 47 - 51
- [149] Gosselink, R.J.A. et al. (2004); „*Co-ordination network for lignin - standardisation, production and applications adapted to market requirements (EUROLIGNIN)*“; Industrial Crops and Products **20** (2) 121 - 129
- [150] Pavlov, D. et al. (2000); „*A new generation of highly efficient expander products and correlation between their chemical composition and the performance of the lead-acid battery*“; Journal of Power Sources **85** (1) 79 - 91
- [151] Gutiérrez, A. et al. (2006); „*Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase-mediator system*“; Applied Microbiology and Biotechnology **72** (4) 845 - 851
- [152] Wüning, P. (2001); „*Application and use of lignin as raw material*“ in Hofrichter, M., Steinbüchel, A.; Biopolymers Volume 1: Lignin, humic substances and coal; Kapitel 4; S. 117 - 127; Wiley-VCH; Weinheim
- [153] Narra, S. et al. (2012); „*Erzeugung von Bioagglomeraten auf Basis ligninhaltiger Ablaugen der Papier- und Zellstoffindustrie*“ in Thrän, D., Pfeiffer, D.; Konferenzband: Energetische Biomassenutzung - Neue Technologien und Konzepte für die Bioenergie der Zukunft; S. 247 - 264; DBFZ Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH; Leipzig
- [154] Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (2013); „*Basisdaten Bioenergie Deutschland August 2013*“

- [155] Zeng, L. und vanHeiningen, A.R.P. (1997); „*Pilot fluidized-bed testing of kraft black liquor gasification and its direct causticization with TiO₂*“; *Journal of Pulp and Paper Science* **23** (11) J511 - J516
- [156] Reid, I.D. et al. (2010); „*Biopulping and biobleaching*“ in Heitner, C., Dimmel, D.R., Schmidt, J.A.; *Lignin and lignans - Advances in chemistry*; Kapitel 15; S. 521 - 554; 1. Auflage; CRC Press Taylor & Francis Group; London, New York
- [157] Singh, A.P. und Singh, T. (2014); „*Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review*“; *Biomass & Bioenergy* **62** 198 - 206
- [158] Scott, G.M. und Akhtar, M. (2001); „*Biotechnological applications of lignin-degrading fungi (white-rot fungi)*“ in Hofrichter, M., Steinbüchel, A.; *Biopolymers Volume 1: Lignin, humic substances and coal*; Kapitel 6; S. 181 - 207; Wiley-VCH; Weinheim
- [159] Virk, A.P. et al. (2012); „*Use of laccase in pulp and paper industry*“; *Biotechnology Progress* **28** (1) 21 - 32
- [160] Nitschke, J. (2011); „*Extraktion und Charakterisierung zellwandgebundener Polysaccharide aus Pilzen (Dissertation)*“; Bergische Universität Wuppertal
- [161] Boyle, D. (1998); „*Nutritional factors limiting the growth of Lentinula edodes and other white-rot fungi in wood*“; *Soil Biology & Biochemistry* **30** (6) 817 - 823
- [162] Wolfenden, B.S. und Willson, R.L. (1982); „*Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: Pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)*“; *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions* **2** (7) 805 - 812
- [163] Wariishi, H. et al. (1992); „*Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium - Kinetic mechanism and role of chelators*“; *Journal of Biological Chemistry* **267** (33) 23688 - 23695
- [164] Kunamneni, A. et al. (2007); „*Fungal laccase - a versatile enzyme for biotechnological applications*“ in Méndez-Vilaz, A.; *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology - Volume 1*; S. 233 - 245; Formatex; Badajoz
- [165] Ullrich, R. et al. (2005); „*Laccase from the medicinal mushroom Agaricus blazei: production, purification and characterization*“; *Applied Microbiology and Biotechnology* **67** (3) 357 - 363
- [166] Zhang, G.Q. et al. (2010); „*Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom Clitocybe maxima*“; *Process Biochemistry* **45** (5) 627 - 633
- [167] Nitheranont, T. et al. (2011); „*Extracellular laccase produced by an edible basidiomycetous mushroom, Grifola frondosa: Purification and characterization*“; *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **75** (3) 538 - 543
- [168] Xing, Z.T. et al. (2006); „*Effect of nutritional parameters on laccase production by the culinary and medicinal mushroom, Grifola frondosa*“; *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **22** (8) 799 - 806

- [169] Zou, Y.J. et al. (2012); „Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Hericium coralloides*“; *Journal of Microbiology* **50** (1) 72 - 78
- [170] Wang, H. und Ng, T.B. (2004); „A new laccase from dried fruiting bodies of the monkey head mushroom *Hericium erinaceum*“; *Biochemical and Biophysical Research Communications* **322** (1) 17 - 21
- [171] Wang, H.X. und Ng, T.B. (2006); „Purification of a laccase from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii*“; *Applied Microbiology and Biotechnology* **69** (5) 521 - 525
- [172] Munoz, C. et al. (1997); „Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation“; *Applied and Environmental Microbiology* **63** (6) 2166 - 2174
- [173] Sannia, G. et al. (1986); „Laccase from *Pleurotus ostreatus*“; *Biotechnology Letters* **8** (11) 797 - 800
- [174] Hublik, G. und Schinner, F. (2000); „Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants“; *Enzyme and Microbial Technology* **27** (3-5) 330 - 336
- [175] Okamoto, K. et al. (2000); „Purification and characterization of extracellular laccase from *Pleurotus ostreatus*“; *Mycoscience* **41** (1) 7 - 13
- [176] Palmieri, G. et al. (1997); „A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*“; *Journal of Biological Chemistry* **272** (50) 31301 - 31307
- [177] Mansur, M. et al. (2003); „The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities“; *Mycologia* **95** (6) 1013 - 1020
- [178] Pozdnyakova, N.N. et al. (2006); „Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* D1: Purification and characterization“; *Applied Biochemistry and Microbiology* **42** (1) 56 - 61
- [179] Han, M.J. et al. (2005); „Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*“; *Journal of Microbiology* **43** (6) 555 - 560
- [180] Hilden, K. et al. (2013); „*Agaricus bisporus* and related *Agaricus* species on lignocellulose: Production of manganese peroxidase and multicopper oxidases“; *Fungal Genetics and Biology* **55** 32 - 41
- [181] Knezevic, A. et al. (2013); „Lignin degradation by selected fungal species“; *Bioresource Technology* **138** 117 - 123
- [182] Wollenberger, U. et al. (2003); „Analytische Biochemie - Eine praktische Einführung in das Messen von Biomolekülen“; Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA; Weinheim
- [183] Kytzia, H.J. (2012); „Enzymatische Aktivitätstests“ in Lottspeich, F., Engels, J.W.; *Bioanalytik*; Kapitel 4; S. 47 - 57; 3. Auflage; Springer Spektrum; Berlin, Heidelberg
- [184] Liu, L.H. et al. (2009); „Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969“; *Enzyme and Microbial Technology* **44** (6-7) 426 - 433

- [185] Freixo, M.D. et al. (2012); „Production, purification and characterization of laccase from *Pleurotus ostreatus* grown on tomato pomace"; World Journal of Microbiology & Biotechnology **28** (1) 245 - 254
- [186] Hassan, M.M. et al. (2012); „Biochemical characterization of an extracellular laccase from *Pleurotus ostreatus* ARC280"; International Journal of Applied Science and Technology **8** (8) 4525 - 4536
- [187] Höfer, C. und Schlosser, D. (1999); „Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} catalyzed by a fungal laccase"; FEBS Letters **451** (2) 186 - 190
- [188] Gianfreda, L. et al. (1999); „Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes"; Bioremediation Journal **3** (1) 1 - 25
- [189] Nadeem, A. et al. (2014); „Mycotechnological production of laccase by *Pleurotus ostreatus*-P1 and its inhibition study"; Journal of Animal and Plant Sciences **24** (2) 492 - 502
- [190] Tlecuitl-Beristain, S. et al. (2008); „Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform"; Mycological Research **112** 1080 - 1084
- [191] Lottspeich, F. (2012); „Bioanalytik"; 3. Auflage; Springer Spektrum; Berlin, Heidelberg
- [192] Shin, K.S. et al. (2005); „Purification and characterization of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*"; Journal of Microbiology **43** (6) 503 - 509
- [193] Asgher, M. et al. (2013); „Purification and characterization of novel manganese peroxidase from *Schizophyllum commune* IBL-06"; International Journal of Agriculture and Biology **15** (4) 749 - 754
- [194] Asgher, M. und Iqbal, H.M.N. (2011); „Characterization of a novel manganese peroxidase purified from solid state culture of *Trametes versicolor* Ibl-04"; Bioresources **6** (4) 4317 - 4330
- [195] Wang, Y.X. et al. (2002); „Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258"; Current Microbiology **45** (2) 77 - 87
- [196] Périé, F.H. et al. (1996); „Purification and characterization of two manganese peroxidase isozymes from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*"; Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology **1297** (2) 139 - 148
- [197] Boer, C.G. et al. (2006); „Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*"; Process Biochemistry **41** (5) 1203 - 1207
- [198] Forrester, I.T. et al. (1990); „Characteristics and N-terminal amino acid sequence of a manganese peroxidase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial wood substrate"; Applied Microbiology and Biotechnology **33** (3) 359 - 365
- [199] Giardina, P. et al. (2000); „Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust"; Archives of Biochemistry and Biophysics **376** (1) 171 - 179

- [200] Cai, Y.J. et al. (2010); „Purification and characterization of novel manganese peroxidase from *Rhizoctonia sp.* SYBC-M3"; *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **15** (6) 1016 - 1021
- [201] Elbs, K. und Lerch, H. (1916); „Dehydrodivanillin"; *Journal für Praktische Chemie* **93** 1 - 9
- [202] Bradford, M.M. (1976); „A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding"; *Analytical Biochemistry* **72** (1-2) 248 - 254
- [203] Ahn, T. et al. (2001); „Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: Use of amino acids as electrolytes"; *Analytical Biochemistry* **291** (2) 300 - 303
- [204] McGinnes, G.D. (1982); „Preparation of aldononitrile acetates using N-Methylimidazole as catalyst and solvent"; *Carbohydrate Research* **108** (2) 284 - 292
- [205] Niederer, B. (1993); „Quantitative Bestimmung unlöslicher Polysaccharide - I: Nebenprodukte bei der Derivatisierung von Monosacchariden zu Aldonitrilacetaten (Dissertation)"; ETH Zürich
- [206] Löffler, G. (2008); „Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie"; Springer Verlag; Berlin, Heidelberg
- [207] Aehle, W. (2004); „Enzymes in industry - Production and applications"; 2. vollständig überarbeitete Auflage; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Weinheim
- [208] Pingoud, A. und Urbanke, C. (1997); „Arbeitsmethoden der Biochemie"; Walter de Gruyter & Co.; Berlin, New York
- [209] Branchi, B. et al. (2005); „Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox"; *Organic & Biomolecular Chemistry* **3** (14) 2604 - 2614
- [210] Wan, Y.Y. et al. (2008); „Enzymatic catalysis of 2,6-dimethoxyphenol by laccases and products characterization in organic solutions"; *Science in China Series B-Chemistry* **51** (7) 669 - 676
- [211] Beloqui, A. et al. (2006); „Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen - Biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships"; *Journal of Biological Chemistry* **281** (32) 22933 - 22942

9 Anhang

9.1 Ergänzende Abbildungen und Tabellen

Tabelle 27: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccasen von *A. brasiliensis*

Aufreinigungsstufe	Gesamtaktivität [U]	Proteingehalt [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Aufreinigung (Faktor)
Rohfiltrat	139,2	103,7	1,343	100,00	1,00
Dialysat	135,9	21,4	6,350	97,58	4,73
Ammoniumsulfatfällung	144,3	33,6	4,301	103,67	3,20
PEG 6.000	119,6	3,6	33,303	85,88	24,80
IC Peak 1	36,0	1,9	18,705	25,89	13,93
IC Peak 2	5,5	0,3	16,340	3,94	12,17
IC gesamt	41,5	2,2	35,045	29,83	26,10

Tabelle 28: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Manganperoxidase von *C. viscosa*

Aufreinigungsstufe	Gesamtaktivität [U]	Proteingehalt [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Aufreinigung (Faktor)
Rohfiltrat	423,4	113,7	3,723	100,00	1,00
Dialysat	427,0	90,5	4,720	100,85	1,27
Ammoniumsulfatfällung	409,7	71,7	5,715	96,78	1,53
PEG 6.000	284,8	22,2	12,838	67,26	3,45
IC	87,0	4,1	21,109	20,54	5,67

Tabelle 29: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccase von *H. coralloides*

Aufreinigungsstufe	Gesamtaktivität [U]	Proteingehalt [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Aufreinigung (Faktor)
Rohfiltrat	39,8	317,5	0,125	100,00	1,00
Dialysat	42,3	97,0	0,436	106,28	3,48
Ammoniumsulfatfällung	37,0	69,7	0,531	92,92	4,23
PEG 6.000	45,4	7,2	6,296	114,02	50,19
IC	4,7	0,7	6,500	11,83	51,82

Tabelle 30: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccase von *H. erinaceus*

Aufreinigungsstufe	Gesamtaktivität [U]	Proteingehalt [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Aufreinigung (Faktor)
Rohfiltrat	13,5	92,6	0,146	100,00	1,00
Dialysat	8,5	51,6	0,164	62,57	1,12
Ammoniumsulfatfällung	6,8	43,9	0,154	50,04	1,05
PEG 6.000	5,3	2,0	2,587	38,84	17,72
IC	1,6	0,4	4,215	11,89	28,87

Tabelle 31: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccase von *H. tessulatus*

Aufreinigungsstufe (HT)	Gesamtaktivität [U]	Proteingehalt [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Aufreinigung (Faktor)
Rohfiltrat	21,3	155,4	0,137	100,00	1,00
Dialysat	19,8	145,3	0,136	5,70	0,04
Ammoniumsulfatfällung	32,3	129,6	0,249	9,30	0,06
PEG 6.000	49,7	8,5	5,883	14,34	1,52
IC	3,9	0,7	5,987	1,12	1,55

Tabelle 32: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccase von *P. eryngii*

Aufreinigungsstufe	Gesamtaktivität [U]	Proteingehalt [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Aufreinigung (Faktor)
Rohfiltrat	354,4	82,2	4,310	100,00	1,00
Dialysat	340,8	76,7	4,440	96,16	1,03
Ammoniumsulfatfällung	341,6	72,2	4,732	96,41	1,10
PEG 6.000	233,3	5,0	46,512	65,83	10,79
IC	60,1	0,4	138,949	16,95	32,24

Tabelle 33: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccasen von *P. ostreatus*

Aufreinigungsstufe	Gesamtaktivität [U]	Protein-gehalt [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Aufreinigung (Faktor)
Rohfiltrat	608,5	126,4	4,816	100,00	1,00
Dialysat	652,2	116,2	5,614	107,17	1,17
Ammonium-sulfatfällung	640,0	107,6	5,946	105,17	1,23
PEG 6.000	127,1	3,1	20,313	20,88	4,22
IC Peak 1	36,6	1,2	30,721	6,02	6,38
IC Peak 2	25,5	1,3	19,113	4,20	3,97
IC gesamt	62,1	2,5	49,834	10,22	10,35

Tabelle 34: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccase von *T. versicolor*

Aufreinigungsstufe (TV)	Gesamtaktivität [U]	Protein-gehalt [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Aufreinigung (Faktor)
Rohfiltrat	346,7	138,0	3,864	100,00	1,00
Dialysat	498,1	125,6	3,967	143,67	1,03
Ammonium-sulfatfällung	501,2	122,3	4,098	144,55	1,06
PEG 6.000	185,5	4,8	38,652	53,51	10,00
IC	175,6	1,4	125,456	50,66	32,47

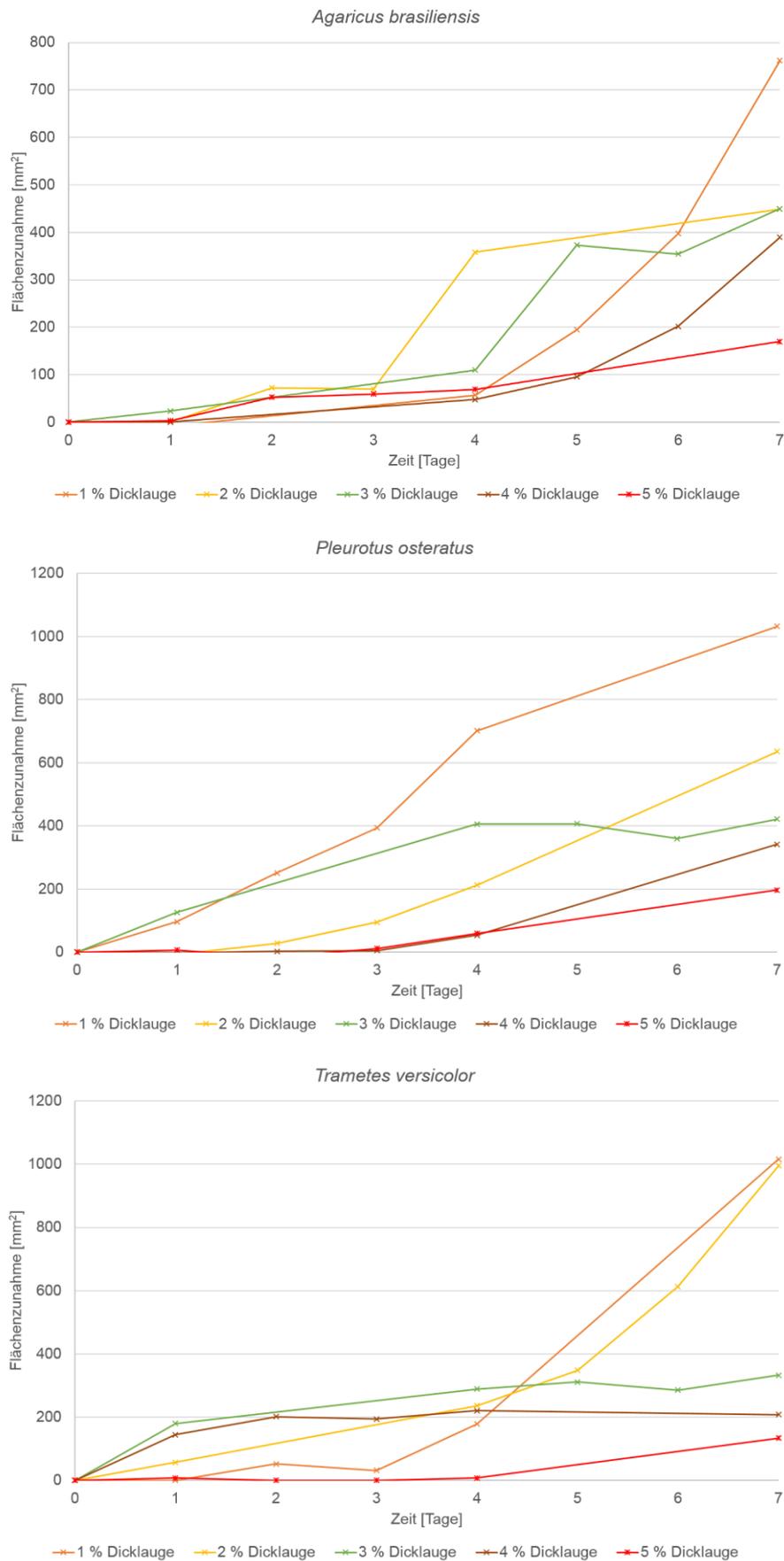


Abbildung 89: Wachstumskinetiken von *A. brasiliensis* (oben), *P. ostreatus* (mitte) und *T. versicolor* (unten) bei verschiedenen Dicklaugenkonzentrationen

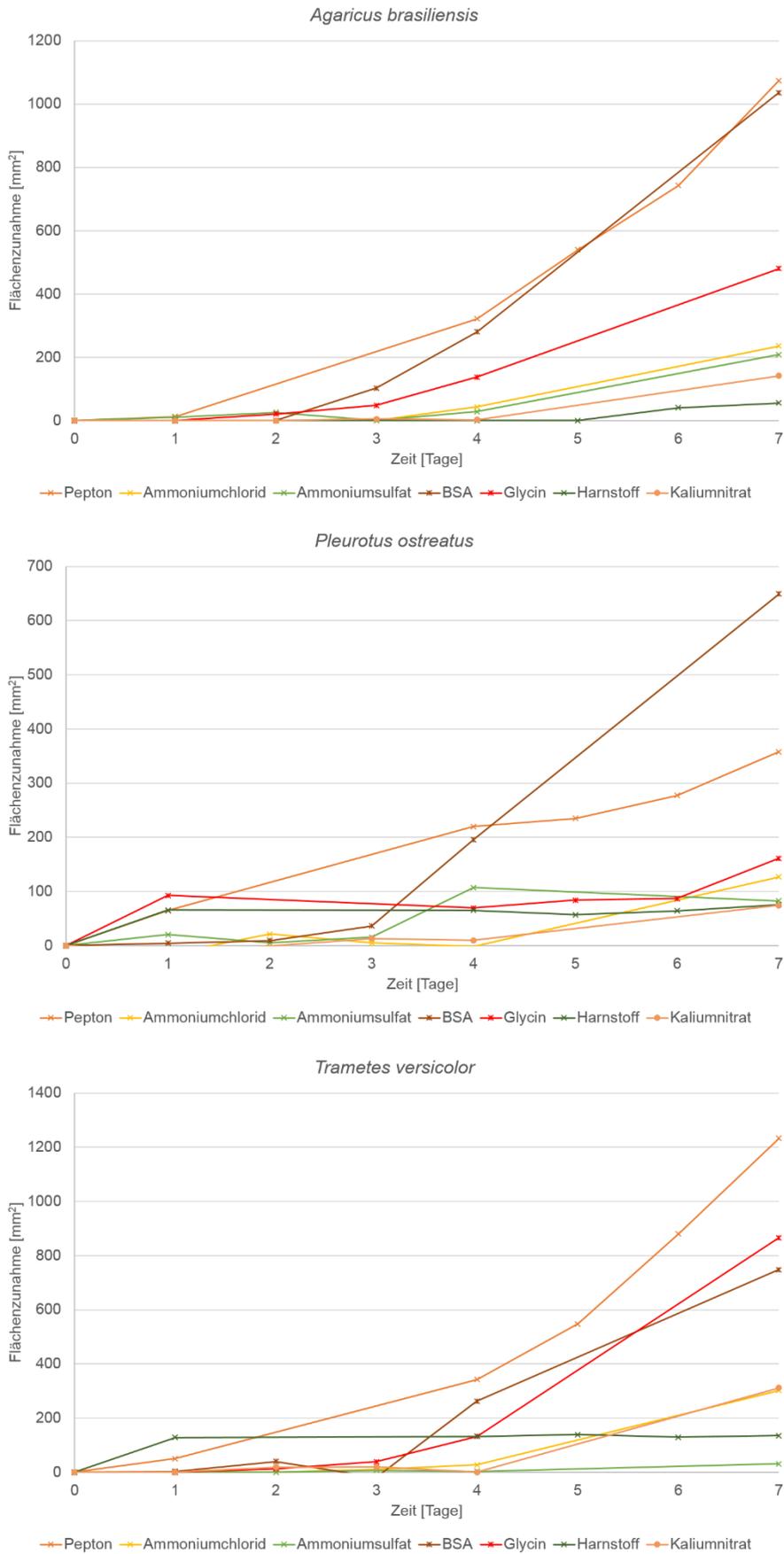


Abbildung 90: Wachstumskinetiken von *A. brasiliensis* (oben), *P. ostreatus* (mitte) und *T. versicolor* (unten) mit verschiedenen Stickstoffquellen

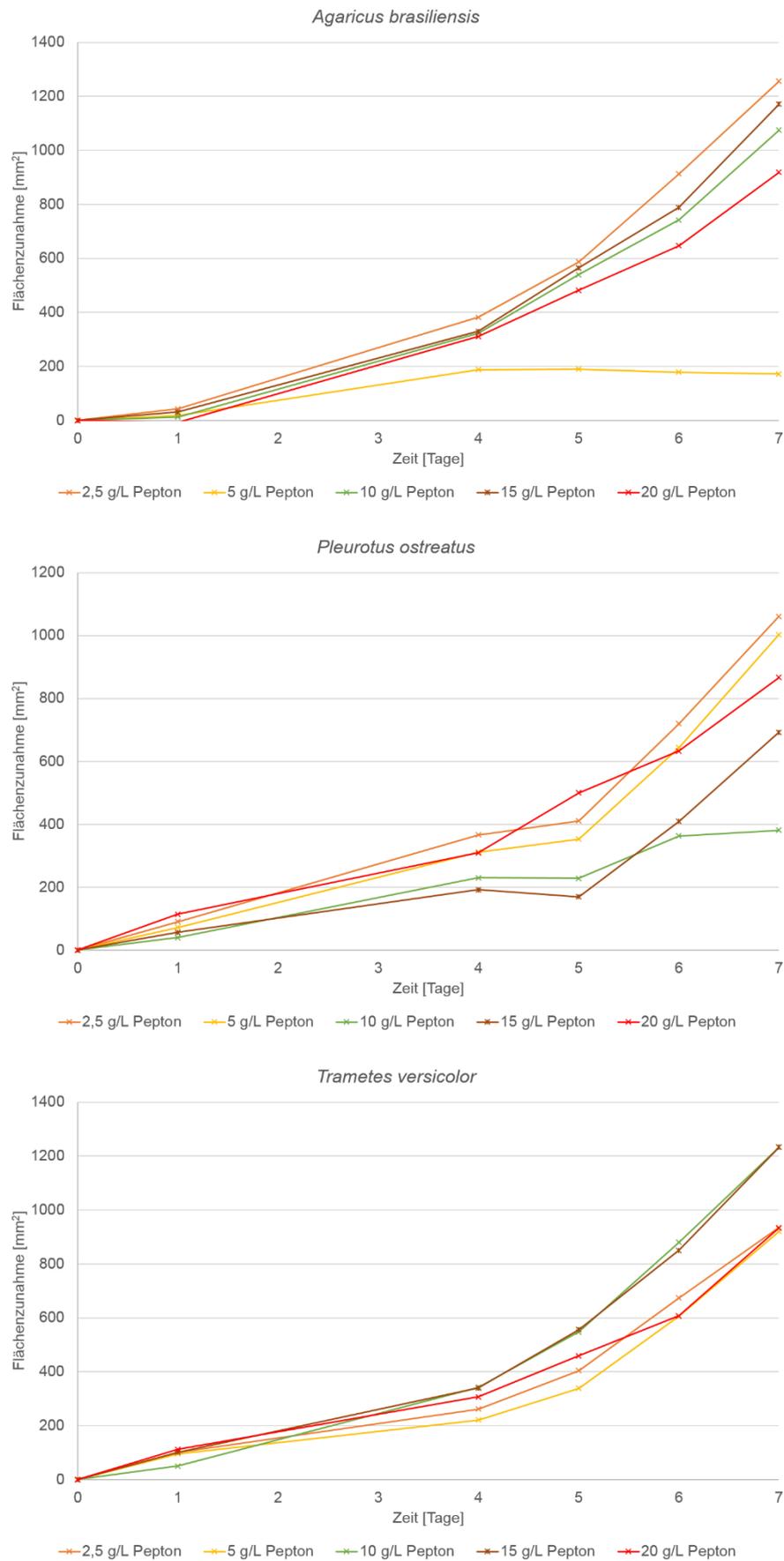


Abbildung 91: Wachstumskinetiken von *A. brasiliensis* (oben), *P. ostreatus* (mitte) und *T. versicolor* (unten) bei verschiedenen Peptongehalten

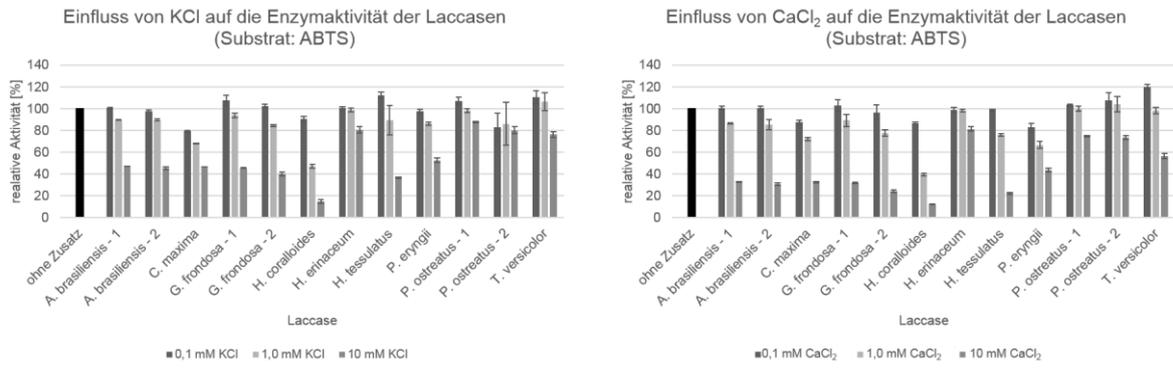


Abbildung 92: Einfluss der Metallsalze KCl und CaCl₂ auf die Aktivitäten der isolierten Laccasen

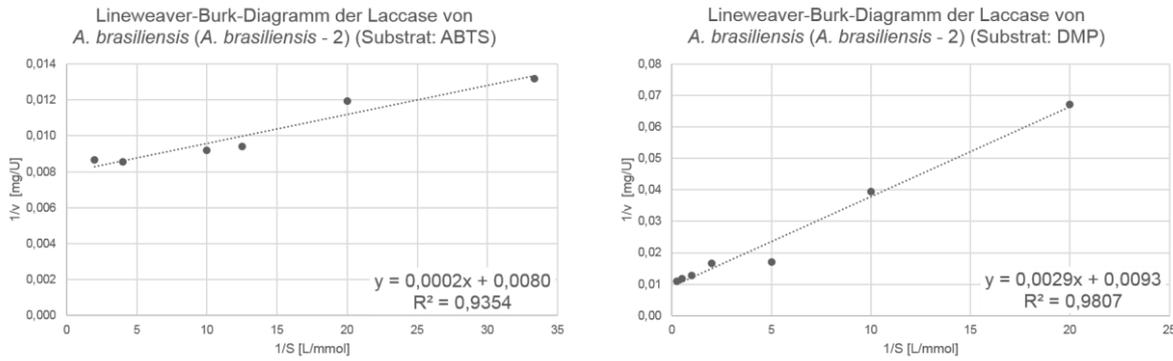


Abbildung 93: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* - 2) mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)

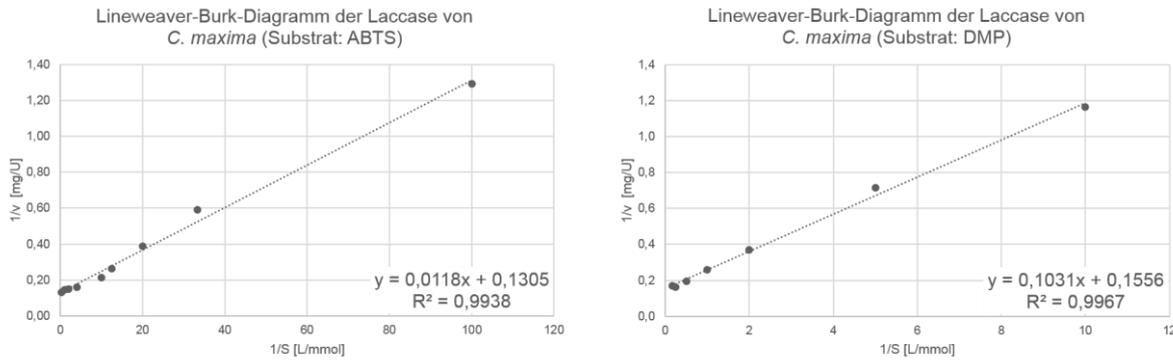


Abbildung 94: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von *C. maxima* mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)

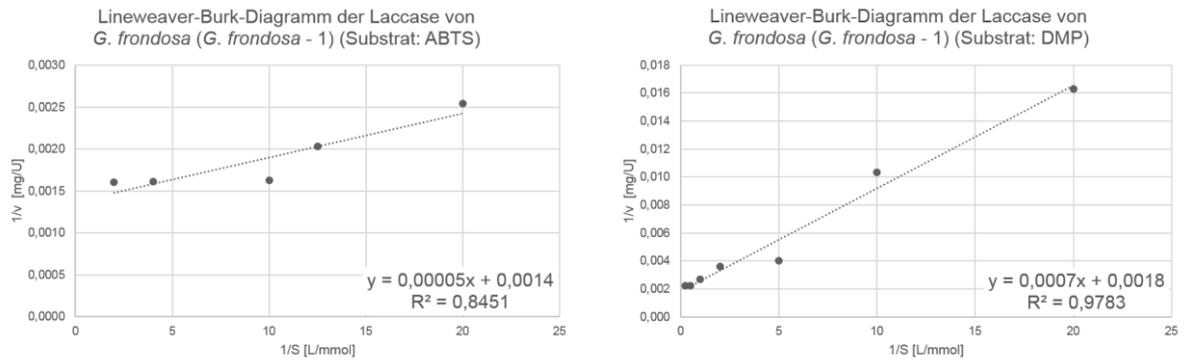


Abbildung 95: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von *G. frondosa* (*G. frondosa* - 1) mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)

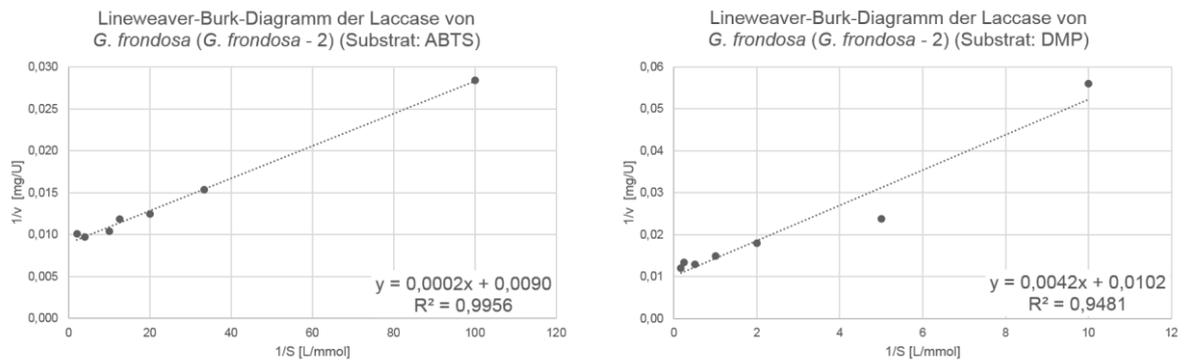


Abbildung 96: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von *G. frondosa* (*G. frondosa* - 2) mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)

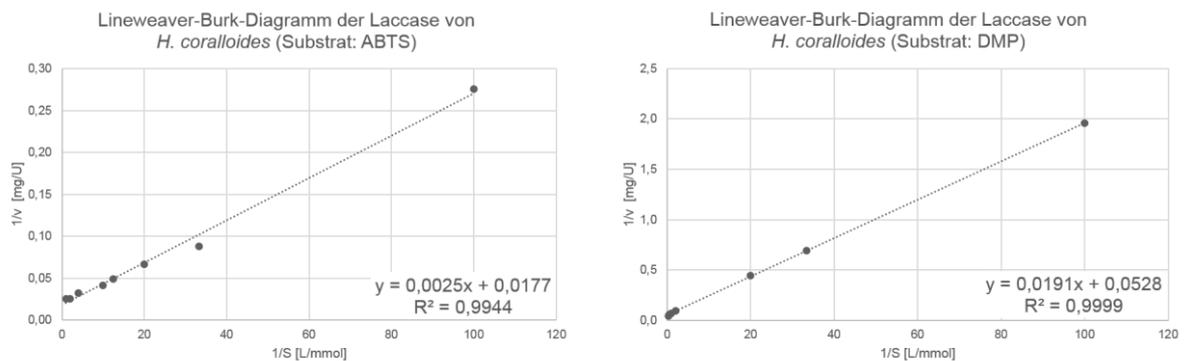


Abbildung 97: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von *H. coralloides* mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)

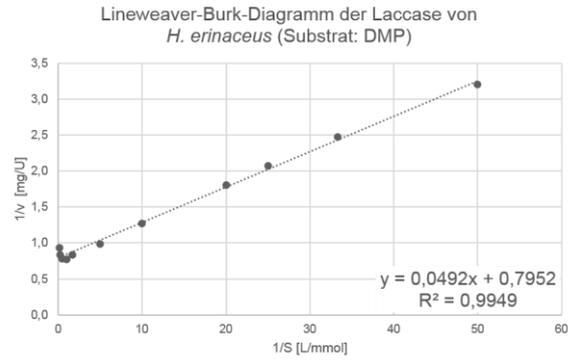
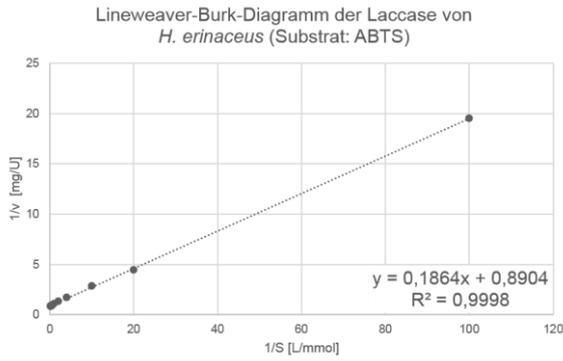


Abbildung 98: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von *H. erinaceus* mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)

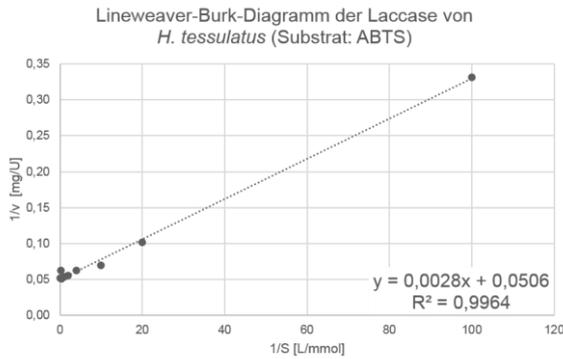


Abbildung 99: Lineweaver-Burk-Diagramm der isolierten Laccase von *H. tessulatus* mit dem Substrat ABTS

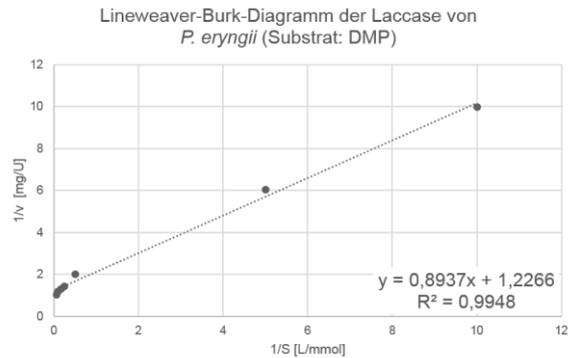
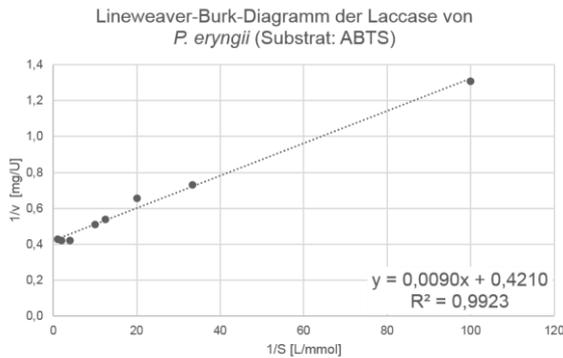


Abbildung 100: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von *P. eryngii* mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)

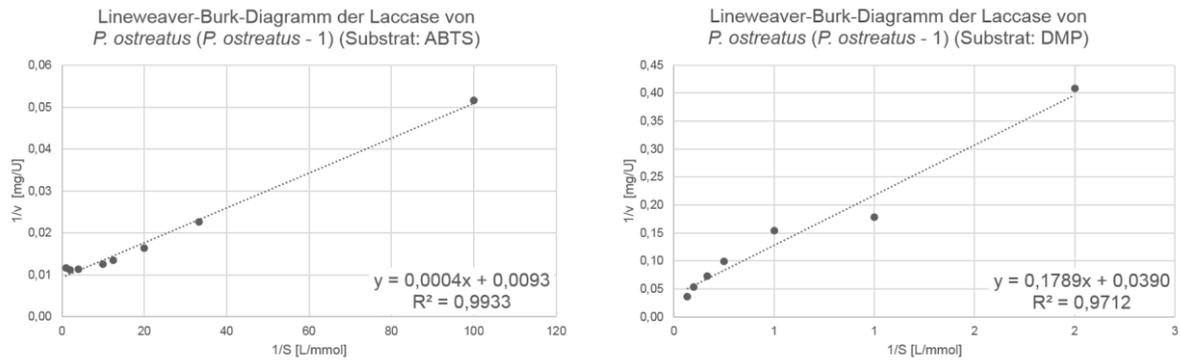


Abbildung 101: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von *P. ostreatus* (*P. ostreatus* - 1) mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)

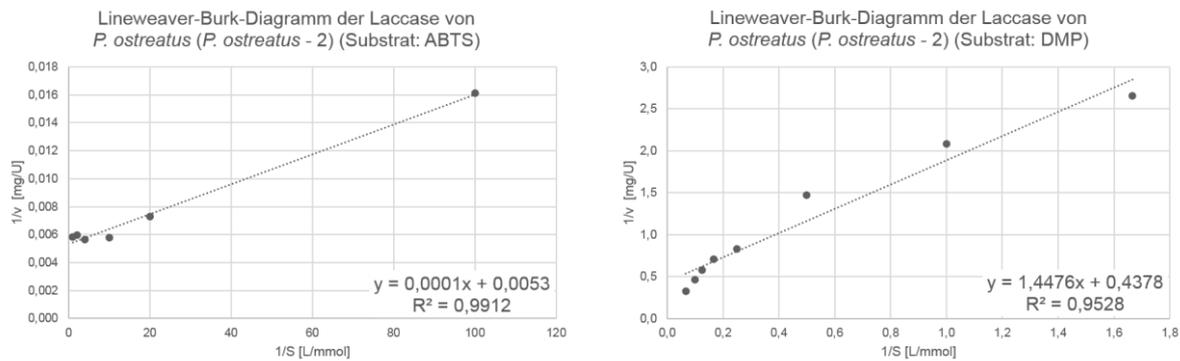


Abbildung 102: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von *P. ostreatus* (*P. ostreatus* - 2) mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)

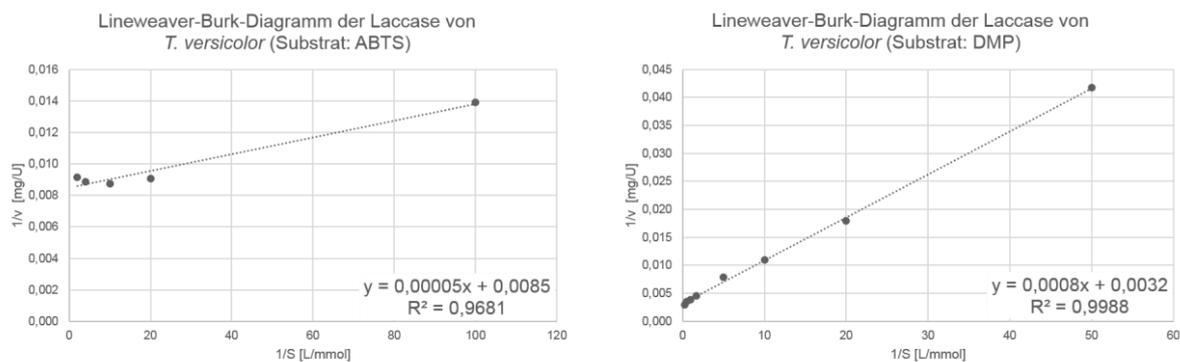


Abbildung 103: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von *T. versicolor* mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ausschnitt aus dem Cellulose-Polymer – Cellobiose-Einheit nach [20].....	4
Abbildung 2: Hemicellulosen im Laubholz nach [13,20].....	5
Abbildung 3: Hemicellulosen im Nadelholz nach [13,20].....	5
Abbildung 4: Ausschnitt aus einem Ligninpolymer [13,55,56].....	7
Abbildung 5: Strukturen der Monolignole nach [13].....	8
Abbildung 6: Bildung der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin aus Glucose nach [11,58,59].....	9
Abbildung 7: Synthese der Monolignole im Phenylpropanoidstoffwechsel nach [51,65].....	10
Abbildung 8: Mesomerie der Phenoxyradikale nach [13].....	11
Abbildung 9: Nomenklatur der Verknüpfungsmöglichkeiten im Lignin.....	11
Abbildung 10: Bindungstypen im Lignin-Polymer nach [71].....	12
Abbildung 11: Enzymsystem der Weißfäulepilze nach [92].....	15
Abbildung 12: Schema des Katalysezyklus der Laccase nach [63].....	16
Abbildung 13: Oxidation von 1-HOBT (oben) und ABTS (unten) durch Laccasen nach [71,131].....	17
Abbildung 14: Schema des Katalysezyklus der Ligninperoxidasen nach [71].....	17
Abbildung 15: Schema der Katalyse der Manganperoxidasen nach [66].....	18
Abbildung 16: Manganperoxidase-katalysierte Spaltung einer phenolischen β -O-4-verknüpften Lignin-modellsubstanz nach [71].....	19
Abbildung 17: Manganperoxidase-katalysierte Spaltung einer nicht-phenolischen β -O-4-verknüpften Lignin-modellsubstanz nach [71].....	20
Abbildung 18: Reaktionen an phenolischen Gruppen des Lignins während des Sulfatprozesses nach [20].....	23
Abbildung 19: Reaktionen an nicht-phenolischen Gruppen des Lignins während des Sulfatprozesses nach [20].....	24
Abbildung 20: Demethylierung der Methoxygruppe im Lignin während des Sulfatprozesses nach [20].....	24
Abbildung 21: Gleichgewichtsreaktion von SO_2 in Wasser [20,54,137].....	26
Abbildung 22: Fragmentierung des Lignins während des Sulfatprozesses nach [139].....	26
Abbildung 23: Wachstumskinetiken von <i>C. maxima</i> (oben) und <i>C. viscosa</i> (unten) bei verschiedenen Dicklaugenkonzentrationen.....	37
Abbildung 24: Wachstumskinetiken von <i>C. maxima</i> (oben) und <i>C. viscosa</i> (unten) mit verschiedenen Stickstoffquellen.....	38
Abbildung 25: Wachstumskinetiken von <i>C. maxima</i> (oben) und <i>C. viscosa</i> (unten) bei verschiedenen Peptongehalten.....	39
Abbildung 26: Vergleich der Anzuchtmedien „Anzuchtmedium Dicklauge“ und Dicklauge/Kupfer-Medium bei der Anzucht von <i>C. maxima</i>	42
Abbildung 27: Vergleich der Anzuchtmedien „Anzuchtmedium Dicklauge“ und Dicklauge/Mangan-Medium bei der Anzucht von <i>C. viscosa</i>	43
Abbildung 28: Zusammenhang zwischen dem Abbau der Monosaccharide und der Ausschüttung von ligninolytischen Enzymen im Nährmedium von <i>C. viscosa</i>	44

Abbildung 29: Vergleich der Enzymaktivitäten bei der Anzucht von <i>C. viscosa</i> auf dem „Anzuchtmedium Dicklauge“ und auf Buchenspänen	45
Abbildung 30: Laccaseaktivität während der Anzucht von <i>C. maxima</i> auf dem „Anzuchtmedium Dicklauge“	46
Abbildung 31: Schematische Darstellung der Enzymisolierung und -aufreinigung	47
Abbildung 32: Anionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung der Laccase von <i>C. maxima</i>	47
Abbildung 33: Enzymaktivitäten in den Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung der Laccase von <i>C. maxima</i>	48
Abbildung 34: Enzymaktivitäten in den Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung der Laccase von <i>G. frondosa</i>	49
Abbildung 35: pH-Profile der Laccasen bei Umsetzung des Substrates 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz (ABTS).....	54
Abbildung 36: pH-Profile der Laccasen bei Umsetzung des Substrates 2,6-Dimethoxyphenol (DMP)	55
Abbildung 37: pH-Stabilitäten der Laccasen von <i>A. brasiliensis</i> (<i>A. brasiliensis</i> - 2), <i>C. maxima</i> und <i>G. frondosa</i> (<i>G. frondosa</i> - 1).....	57
Abbildung 38: Temperaturprofile der Laccasen bei Umsetzung des Substrates 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz (ABTS).....	59
Abbildung 39: Temperaturprofile der Laccasen bei Umsetzung des Substrates 2,6-Dimethoxyphenol (DMP)	61
Abbildung 40: Temperaturstabilitäten der Laccasen von <i>A. brasiliensis</i> (<i>A. brasiliensis</i> - 2), <i>C. maxima</i> und <i>G. frondosa</i> (<i>G. frondosa</i> - 1).....	63
Abbildung 41: Einfluss von Metallsalzen auf die Enzymaktivitäten der isolierten Laccasen (Substrat: ABTS).....	65
Abbildung 42: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Enzymaktivitäten der isolierten Laccasen (Substrat: ABTS).....	68
Abbildung 43: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration bei der Laccase von <i>A. brasiliensis</i> (<i>A. brasiliensis</i> - 1) (Substrat: ABTS)	70
Abbildung 44: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von <i>A. brasiliensis</i> (<i>A. brasiliensis</i> - 1) mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)	71
Abbildung 45: UV/VIS-Spektren der Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i>	73
Abbildung 46: SDS-PAGE der Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i>	74
Abbildung 47: pH-Profile der Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i> mit verschiedenen Substraten	75
Abbildung 48: pH-Stabilität der Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i> (Substrat: ABTS)	76
Abbildung 49: Temperaturprofile der Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i> mit verschiedenen Substraten	76
Abbildung 50: Temperaturstabilität der Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i> (Substrat: ABTS)	77
Abbildung 51: Einfluss von Metallsalzen auf die Aktivität der Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i> (Substrat: ABTS)	78
Abbildung 52: Einfluss von Kupfersulfatlösungen verschiedener Konzentrationen auf die Aktivität der Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i> (Substrat: ABTS)	79
Abbildung 53: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Aktivität der Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i> (Substrat: ABTS).....	80

Abbildung 54: Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagramme der Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i>	81
Abbildung 55: verwendete Ligninmodellsubstanzen	83
Abbildung 56: Synthese von Dehydrodivanillin aus Vanillin mittels Fentonreaktion	84
Abbildung 57: Zuordnung der Signale im NMR zu Edukt (oben) und Produkt (unten)	85
Abbildung 58: GC-GC-(ToF)MS-Chromatogramm und EI-Massenspektrum von Dehydrodivanillin nach Silylierung mit BSTFA (Methode: vgl. Kapitel 6.2.3)	85
Abbildung 59: Fotos der Abbauprobversuche mit Ligninmodellsubstanzen	86
Abbildung 60: GCxGC-(ToF)MS-Chromatogramm des Abbaus von DHDV mit der Laccase von <i>A. brasiliensis</i> nach Derivatisierung mit TMSH (Methode: vgl. Kapitel 6.2.4)	87
Abbildung 61: Massenspektrum von Peak 1 (links) und Vergleich mit dem Massenspektrum von 1-Methylbenzotriazol (rechts)	87
Abbildung 62: Massenspektren der Peaks 2 und 4 (oben) sowie Vergleichsspektren (unten)	88
Abbildung 63: Darstellung der Strukturmöglichkeiten	88
Abbildung 64: Massenspektren von Vanillin (links) und 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure (rechts) beim Abbau von DHDV mit der Laccase von <i>A. brasiliensis</i> (oben) sowie Vergleichsspektren (unten)	89
Abbildung 65: Massenspektrum von Peak 3	89
Abbildung 66: Produkte der Spaltung von 1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-ethanon mit einer Laccase von <i>A. brasiliensis</i>	90
Abbildung 67: GCxGC-(ToF)MS-Chromatogramm nach Derivatisierung mit BSTFA	91
Abbildung 68: Massenspektren der Peaks 1 und 2 (oben) sowie Vergleichsspektren (unten)	92
Abbildung 69: Produkte der Spaltung von 1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-ethanon mit einer Laccase von <i>A. brasiliensis</i>	92
Abbildung 70: Oxidation von 3,3'-Dimethoxy-5,5'-dimethyl-biphenyl-2,2'-diol durch die Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i>	93
Abbildung 71: GCxGC-(ToF)MS-Chromatogramm nach Derivatisierung mit BSTFA	93
Abbildung 72: Massenspektren der Peaks 1 und 2 (oben) sowie Vergleichsspektren (unten)	94
Abbildung 73: Massenspektren der Peaks 3 und 5 (oben) sowie Vergleichsspektren (unten)	94
Abbildung 74: Massenspektrum von Peak 5 (oben) sowie Vergleichsspektrum (unten)	95
Abbildung 75: Produkte der Spaltung von 1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-ethanon mit einer Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i>	95
Abbildung 76: Fotos der Abbauprobversuche von Prozessablaugen mit der Laccase von <i>A. brasiliensis</i>	97
Abbildung 77: Foto einer mit dem Pilzmycel von <i>A. brasiliensis</i> angeimpften Agarplatte „Anzuchtmedium Dickklauge“	98
Abbildung 78: HPLC-DAD-Chromatogramme nach Inkubation der Dickklauge ohne und mit der Laccase von <i>A. brasiliensis</i> bei einer Wellenlänge von 280 nm (Methode: vgl. Kapitel 6.2.5)	99
Abbildung 79: GCxGC-(ToF)MS-Chromatogramm nach Derivatisierung mit BSTFA	99
Abbildung 80: HPLC-DAD-Chromatogramme nach Inkubation der Schwarzklauge ohne und mit der Laccase von <i>A. brasiliensis</i> bei einer Wellenlänge von 280 nm (Methode: vgl. Kapitel 6.2.5)	101
Abbildung 81: GCxGC-(ToF)MS-Chromatogramm nach Derivatisierung mit BSTFA	102
Abbildung 82: GCxGC-(ToF)MS-Chromatogramm nach Derivatisierung mit BSTFA	104

Abbildung 83: Oxidation von ABTS zum Radikalkation (ABTS ^{•+}) [209].....	129
Abbildung 84: Oxidation von 2,6-Dimethoxyphenol durch Laccasen nach [210]	130
Abbildung 85: Oxidation von Mangan(II) zu Mangan(III) durch eine Manganperoxidase..	130
Abbildung 86: Schematische Darstellung der Enzymisolierung und -aufreinigung	131
Abbildung 87: Derivatisierung von Monosacchariden zu Aldonitrilacetaten am Beispiel Glucose [205]	137
Abbildung 88: GC-FID-Chromatogramm der Trennung von Aldonitrilacetaten.....	137
Abbildung 89: Wachstumskinetiken von <i>A. brasiliensis</i> (oben), <i>P. ostreatus</i> (mitte) und <i>T. versicolor</i> (unten) bei verschiedenen Dicklaugenkonzentrationen	155
Abbildung 90: Wachstumskinetiken von <i>A. brasiliensis</i> (oben), <i>P. ostreatus</i> (mitte) und <i>T. versicolor</i> (unten) mit verschiedenen Stickstoffquellen	156
Abbildung 91: Wachstumskinetiken von <i>A. brasiliensis</i> (oben), <i>P. ostreatus</i> (mitte) und <i>T. versicolor</i> (unten) bei verschiedenen Peptongehalten.....	157
Abbildung 92: Einfluss der Metallsalze KCl und CaCl ₂ auf die Aktivitäten der isolierten Laccasen	158
Abbildung 93: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von <i>A. brasiliensis</i> (<i>A.</i> <i>brasiliensis</i> - 2) mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)	158
Abbildung 94: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von <i>C. maxima</i> mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)	158
Abbildung 95: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von <i>G. frondosa</i> (<i>G.</i> <i>frondosa</i> - 1) mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)	159
Abbildung 96: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von <i>G. frondosa</i> (<i>G.</i> <i>frondosa</i> - 2) mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)	159
Abbildung 97: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von <i>H. coralloides</i> mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)	159
Abbildung 98: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von <i>H. erinaceus</i> mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)	160
Abbildung 99: Lineweaver-Burk-Diagramm der isolierten Laccase von <i>H. tessulatus</i> mit dem Substrat ABTS	160
Abbildung 100: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von <i>P. eryngii</i> mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)	160
Abbildung 101: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von <i>P. ostreatus</i> (<i>P.</i> <i>ostreatus</i> - 1) mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)	161
Abbildung 102: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von <i>P. ostreatus</i> (<i>P.</i> <i>ostreatus</i> - 2) mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)	161
Abbildung 103: Lineweaver-Burk-Diagramme der isolierten Laccase von <i>T. versicolor</i> mit den Substraten ABTS (links) und DMP (rechts)	161

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Hauptkomponenten in Nadel- und Laubholz [8]	3
Tabelle 2: Monosaccharidzusammensetzungen von Laub- und Nadelhölzern [48-50]	6
Tabelle 3: Kopplungsmöglichkeiten zweier Monolignol-Phenoxyradikale [60]	11
Tabelle 4: Anteile der Bindungstypen im Lignin des Laub- und Nadelholzes [72].....	12
Tabelle 5: Anteile der Ligninmonomereinheiten in Nadel-, Laub- und Graslignin [8] (Durchschnittswerte)	13
Tabelle 6: Zusammensetzung einer Fichtenablauge [140]	27
Tabelle 7: Stoffliche Nutzung von Lignin [144,148,150-152]	29
Tabelle 8: Heizwerte von Sulfatablauge und weiteren Brennstoffen [154,155]	30
Tabelle 9: Zusammensetzung des „Anzuchtmedium Dickklauge“	40
Tabelle 10: Übersicht über das Laborscreening (Lac: Laccaseaktivität; MnP: Manganperoxidaseaktivität)	41
Tabelle 11: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccase von <i>C. maxima</i>	48
Tabelle 12: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccasen von <i>G. frondosa</i>	50
Tabelle 13: Molekülgrößen der isolierten Laccasen.....	51
Tabelle 14: Ergebnisse der isoelektrischen Fokussierung und Vergleich mit Literaturdaten .	52
Tabelle 15: pH-Optima der isolierten Laccasen bei der Umsetzung der Substrate ABTS und DMP.....	56
Tabelle 16: Temperaturoptima der isolierten Laccasen bei der Umsetzung der Substrate ABTS und DMP	62
Tabelle 17: Einfluss verschiedener Metallsalze auf die Enzymaktivität von <i>G. frondosa</i> und <i>P.</i> <i>ostreatus</i> im Vergleich mit Literaturdaten [167,175]	66
Tabelle 18: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Enzymaktivität der Laccasen von <i>G.</i> <i>frondosa</i> und <i>P. ostreatus</i> im Vergleich mit Literaturdaten [167,190]	69
Tabelle 19: K_m - und v_{max} -Werte der isolierten Laccasen mit dem Substrat ABTS.....	71
Tabelle 20: K_m - und v_{max} -Werte der isolierten Laccasen mit dem Substrat DMP.....	72
Tabelle 21: K_m - und v_{max} -Werte der Manganperoxidase von <i>C. viscosa</i> (Substrate ABTS und Mn(II)-malonat)	81
Tabelle 22: Identifizierte monomere aromatische Strukturen nach Inkubation der Dickklauge mit der Laccase von <i>A. brasiliensis</i> (<i>A. brasiliensis</i> - 1)	100
Tabelle 23: Identifizierte monomere aromatische Strukturen nach Inkubation der Schwarzlauge mit der Laccase von <i>A. brasiliensis</i> (<i>A. brasiliensis</i> - 1)	103
Tabelle 24: Identifizierte monomere aromatische Strukturen nach Inkubation der Dickklauge mit der Mangan-peroxidase von <i>C. viscosa</i>	105
Tabelle 25: Zusammensetzung der Nährmedien zur Optimierung der Anzuchtversuche ...	121
Tabelle 26: Übersicht über die verwendeten Pilzmycelien.....	123
Tabelle 27: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccasen von <i>A. brasiliensis</i> ..	152
Tabelle 28: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Manganperoxidase von <i>C.</i> <i>viscosa</i>	152
Tabelle 29: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccase von <i>H. coralloides</i>	152
Tabelle 30: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccase von <i>H. erinaceus</i>	153
Tabelle 31: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccase von <i>H. tessulatus</i>	153
Tabelle 32: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccase von <i>P. eryngii</i>	153

Tabelle 33: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccasen von *P. ostreatus* 154

Tabelle 34: Enzymaktivitäten während der Aufarbeitung der Laccase von *T. versicolor*..... 154