

„Reaktivität von aktiviertem Lignin und Humus“

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Forstwissenschaften und Waldökologie
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Sonja Lütkemeyer-Wagner
geboren in Paderborn

Themenbearbeitung am Lehrstuhl für Forstbotanik
Abteilung Molekulare Holzbiotechnologie und Technische Mykologie
der Georg-August-Universität Göttingen

D7

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Hüttermann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Wulf
3. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Bürger-Arndt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.09.2007

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde am Forstbotanischen Institut der Georg-August-Universität Göttingen, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Hüttermann angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Hüttermann für die Vergabe dieses Dissertationsthemas, die sehr qualifizierte Betreuung in Form von zahlreichen anregenden Gesprächen und vielen motivierenden Worten, welche die Anfertigung dieser Arbeit im Wesentlichen unterstützt haben.

Für die tatkräftige Hilfe und Unterstützung bei den Versuchen möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hüttermann recht herzlich bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Christin Ortmann, Theres Riemekasten, Nicola Schwedhelm und Merle Fastenrath.

Für die Durchführung der Elektronenspinresonanzspektroskopie möchte ich mich bei der Abteilung für Biophysik 1 der Universität des Saarlandes, Prof. Dr. J. Hüttermann und Dr. Kappl recht herzlich bedanken. Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. G. Maas und Dr. Wertz, Institut für Organische Chemie 1 der Universität Ulm, für die Untersuchung der Proben im Kernspinresonanzspektrometer.

Für das sehr freundliche Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei den Arbeiten möchte ich mich bei allen Kollegen des Instituts für Forstbotanik bedanken. Besonders erwähnen möchte ich hier Konrad Wehr, Gisbert Kettner-Langer, Karin Lange, Christian Schöpfer und Lars Kloeser.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. A. Kharazipour und Herrn Prof. Dr. F. Beese dafür bedanken, dass sie sich bereit erklärt haben diese Arbeit als Gutachter zu beurteilen.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meiner Familie, die mich immer unterstützt hat und mir ermöglicht hat diesen Weg einzuschlagen. Bei meinem Mann Philipp möchte ich mich besonders dafür bedanken, dass er mir in allen Belangen eine große Hilfe war und mir seine Unterstützung auch bei kleinen Motivationstiefs stets gewiss war.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die antike Lacktechnik als Strategie für industrielle Anwendungen	4
1.2	Anwendung im industriellen Maßstab als Bindemittel für Holzwerkstoffe.....	6
1.3	Polymerisation des Lignins.....	10
1.4	Zielsetzung.....	14
2	Stärke	15
2.1	Einleitung	15
2.1.1	Aufbau des Stärkemoleküls	16
2.1.2	Modifikation der Stärke	18
2.1.2.1	Stärke als Kunststoffersatz	18
2.1.2.1.1	Einsatz der Stärkegemische mit anderen Komponenten	18
2.1.2.1.2	Chemische Modifikation der Stärke mit kovalent gebundenen Substituenten.....	19
2.1.3	Biologische Abbaubarkeit der Kunststoffe auf Stärkebasis.....	20
2.1.4	Lignin	20
2.1.5	Hypothese.....	22
2.1.6	Zielsetzung	24
2.2	Material und Methoden.....	24
2.2.1	Aktivitätsbestimmung der Laccase nach Gutierrez	24
2.2.1.1	Material	24
2.2.1.2	Methode.....	24
2.2.2	Grundrezept zur Herstellung der Wachsmaisstärke-Lignin-Verbundwerkstoffe	25
2.2.2.1	Material	25
2.2.2.2	Methode.....	26

2.2.3	Stärkeauswaschung (nach DIN) mit Hilfe des Boehringer-Tests	27
2.2.3.1	Material	27
2.2.3.2	Methode	27
2.2.4	Stärkeeichreihe	29
2.2.4.1	Material	29
2.2.4.2	Methode	29
2.2.5	Berechnung der ausgewaschenen Stärkemenge	30
2.3	Ergebnisse und Diskussion	31
2.3.1	Aktivitätsbestimmung nach Gutierrez	31
2.3.2	Ermittlung der Stärkeauswaschung mit Hilfe des Boehringer-Tests	32
3	Mediatoren	35
3.1	Einleitung	35
3.1.1	Wirkungsweise von Laccase-Mediator-Systemen bei der Zellstoffbleiche	36
3.1.2	Enzymatische Aktivierung der Holzfasern zur Herstellung bindemittelfreier Faserplatten	39
3.1.3	Zielsetzung	40
3.2	Material und Methoden	40
3.2.1	Aktivierung des fasereigenen Lignins durch Zugabe von Mediatoren	40
3.2.1.1	Material	40
3.2.1.2	Methode	41
3.2.2	Aufarbeitung der Proben für die HPLC	42
3.2.2.1	Material	42
3.2.2.2	Methode	42
3.2.2.3	Aufbau und Methodik der HPLC	43
3.2.3	Untersuchung der Proben mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie ..	46
3.2.4	Optische Bonitierung der Ablösung des fasereigenen Lignins	46
3.2.4.1	Material	46
3.2.4.2	Methode	46
3.2.5	Elektronenspinresonanz-Bestimmung der Faserproben	47
3.2.5.1	Material	47
3.2.5.2	Methode	47

3.3	Ergebnisse und Diskussion	48
3.3.1	Molekulargewichtstandards	49
3.3.2	Chromatogramme der Proben	50
3.3.3	Tabelle zur Bonitierung der Mediatorwirkung.....	52
3.3.4	REM-Aufnahmen der Faserproben	55
3.3.5	Elektronenspindichte der Proben.....	56
4	Fasern.....	58
4.1	Einleitung	58
4.1.1	Herstellung faserverstärkter Verbundstoffe mit Hilfe des Spritzgussverfahrens	59
4.1.2	Thermoplastische Herstellung faserverstärkter Verbundstoffe	60
4.1.3	Herstellung glasfaserverstärkter Verbundstoffe	62
4.1.4	Wirkung von Laccase auf die Copolymerisation von Acrylat.....	64
4.1.5	Zielsetzung	65
4.2	Material und Methoden.....	66
4.2.1	Herstellung eines kaltgepressten Holzfaservlieses.....	66
4.2.1.1	Material	66
4.2.1.2	Methode.....	66
4.2.2	Beschichtung kaltgepresster Holzfaserprüflinge mit 10%iger Ligninsulfonsäure.....	66
4.2.2.1	Material	66
4.2.2.2	Methode.....	67
4.2.3	Auftrag einer Acrylamidlösung auf LSS-beschichtete und mit Bidest ausgewaschene Holzfaserprüflinge	68
4.2.3.1	Material	68
4.2.3.2	Methode.....	68
4.2.3.2.1	Berechnung Tertiärbutylhydroperoxid	68
4.2.3.2.2	Ansatz der Acrylamidlösungen	69
4.2.3.3	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Fasern	70
4.2.4	Beschichtung kaltgepresster Holzfaserprüflinge mit einer Acrylamid- und Bisacrylamidlösung mit und ohne vorherige LSS-Beschichtung	70
4.2.4.1	Acrylamid- und Bisacrylamidbeschichtung.....	70

4.2.4.1.1	Material	70
4.2.4.1.2	Methode	71
4.2.5	Beschichtung kaltgepresster Holzfaserprüflinge mit einer Brenzkatechinlösung.....	72
4.2.5.1	Material	72
4.2.5.2	Methode	72
4.2.5.3	Erstellen einer Brenzkatechin-Eichreihe	73
4.2.5.3.1	Material	73
4.2.5.3.2	Methode	73
4.2.5.3.3	Berechnung der ausgewaschenen Brenzkatechinmenge	74
4.3	Ergebnis und Diskussion	75
4.3.1	Ligninauswaschung der Faserprüflinge	75
4.3.2	Ergebnis der Acrylamid-Auswaschung	77
4.3.3	REM-Aufnahmen der Fasern	78
4.3.4	Bindung von Acrylamid/Bisacrylamid an beschichtete und unbeschichtete Faserprüflinge	82
4.3.5	Bindung von Brenzkatechin an die Faseroberfläche.....	83
4.3.5.1	Brenzkatechin-Eichreihe	83
4.3.5.2	Ermittlung der Brenzkatechinbindung an die Faseroberfläche.....	84
5	Modellversuche zur Humusdynamik.....	86
5.1	Einleitung	86
5.1.1	Mechanismen des Humusabbaus.....	86
5.1.2	Mechanismen der Humusdynamik.....	87
5.1.3	Gelöster organischer Kohlenstoff in der Bodenlösung.....	89
5.1.4	Modell der Bildung und des Zusammenbruchs Huminsäure-ähnlicher Substanzen	91
5.1.5	Zielsetzung	93
5.2	Material und Methoden.....	93
5.2.1	Grundrezept der Humus-Aktivierung	93
5.2.1.1	Material	93
5.2.1.2	Methode	94
5.2.2	Aufarbeitung der Humus-Proben für die HPLC	94

5.2.3	Aufbereitung der Humus-Proben für die ESR	94
5.3	Ergebnisse und Diskussion	95
5.3.1	Anwendung der Ionpair-Size-Exclusion-Chromatographie auf Humusproben	95
5.3.1.1	Überprüfung der Trennleistung der HPLC-Säule	96
5.3.1.2	Überprüfung des Molekulargewichtsbereichs	97
5.3.1.3	Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode	97
5.3.1.4	Überprüfung der Chromatographiemuster	98
5.3.1.5	Überprüfung der Molekulargewichte von humusähnlichen Substanzen	99
5.3.1.6	Überprüfung der Molekulargewichte einer typischen Humusextraktion	100
5.3.1.7	Einfluss der Gaszusammensetzung auf die Extraktion	100
5.3.1.8	Polymerisation von Huminsäure durch Laccase	101
5.3.2	Nachweis und Erhöhung von Phenoxy-Radikalen durch Inkubation mit Laccase	103
6	Modellversuche zur Humusbildung	105
6.1	Einleitung	105
6.1.1	Die Polyphenol –Theorie.....	107
6.1.2	Zielsetzung	108
6.2	Material und Methoden.....	109
6.2.1	Gewinnung von reinem Humus aus Komposterde.....	109
6.2.1.1	Material	109
6.2.1.2	Methode.....	109
6.2.2	Reaktion von CPG-Propylamin mit Humus	110
6.2.2.1	Material	110
6.2.2.2	Methode.....	110
6.2.2.3	Photometrische Bestimmung der CPG-Propylamin-Humus-Bindung ..	111
6.2.3	Aufbereitung von Dimethylammoniumhydrochlorid.....	112
6.2.3.1	Material	112
6.2.3.2	Methode.....	112
6.2.3.2.1	Berechnung der Säure-Äquivalente.....	112
6.2.3.2.2	Chlorverdrängung	113

6.2.4	Anbindung unterschiedlicher markierter Stickstoffverbindungen an Humus	113
6.2.4.1	Material	113
6.2.4.2	Methode	114
6.2.5	Dünnschichtchromatographie der umgesetzten Humusverbindungen.	115
6.2.5.1	Material	115
6.2.5.2	Methode	115
6.2.6	Überprüfung der Bindung von ¹⁵ N-markierten Stickstoffverbindungen an Humus und Indulin mittels der Dünnschichtchromatographie	117
6.2.6.1	Material	117
6.2.6.2	Methode	117
6.2.6.3	Messung der NMR-Spektren	119
6.2.6.4	Massenspektrometrische Bestimmung	119
6.2.7	Bindung von BSA an LSS und Indulin im Beisein und in Abwesenheit von 4-HBS	120
6.2.7.1	Material	120
6.2.7.2	Methode	120
6.3	Ergebnisse und Diskussion	125
6.3.1	Versuche mit CPG-Propylamin	125
6.3.2	Bindung von Ligninsulfonat an CPG-Propylamin	125
6.3.3	Bindung von Humus an CPG-Propylamin	127
6.3.4	Reaktion von ¹⁵ N-markierten Stickstoffverbindungen mit Humus	128
6.3.5	Dünnschichtchromatographische Überprüfung des Reinheitsgrades der hergestellten Kopplungsverbindungen	128
6.3.6	Untersuchung des Stickstoffgehalts der umgesetzten Proben	128
6.3.7	Untersuchung des ¹⁵ N-Gehalts der umgesetzten Proben	129
6.3.8	NMR-Spektren	130
6.3.9	Untersuchung der Bindung von Protein an Lignin	135
7	Zusammenfassung	137
8	Abbildungsverzeichnis	143
9	Tabellenverzeichnis	146

10	Abkürzungsverzeichnis	147
11	Literaturverzeichnis	150

1 Einleitung

Die Eroberung der Kontinente durch Pflanzen war vermutlich der schwierigste Evolutionsschritt in der Entwicklung des Lebens auf der Erde (Gordon und Olson, 1995). Dieser Schritt fand erst nach mehr als 3 Milliarden Jahren Leben in einer aquatischen Umwelt statt, zuerst in den Ozeanen und dann auch im Süßwasser. Der Grund für diese lange Zeitverzögerung war wahrscheinlich die geringe Feuchtigkeit der Atmosphäre, die zunächst bestimmte Adaptionsprozesse seitens der Pflanzen erforderte. Um die Oberflächen der Kontinente zu besiedeln, mussten die Pflanzen ein leitendes System ausbilden, das in der Lage war, große Wassermengen mit einer beträchtlichen Geschwindigkeit zu transportieren. Das bedeutete für die Pflanzen die Ausbildung druckstabiler Zellwände, um dem Unterdruck standzuhalten, welcher beim innerpflanzlichen Wassertransport entsteht (Bernoulli Prinzip). Die Lösung dieses Problems war die verholzte Zellwand. Diese ermöglichte es der Pflanze, nicht nur Wasser zu transportieren, sondern bildete zugleich die Basis für die Konstruktion eines oberirdischen Pflanzenkörpers (Wunderlich und Gloede, 1977). An die verholzte pflanzliche Zellwand werden hohe Anforderungen in Bezug auf ihre technischen Eigenschaften gestellt. Sie stellt den höchstentwickelten biologischen Verbundwerkstoff dar, der bekannt ist.

Ihre Zugfestigkeit erhält sie durch die Verdrillung von Zellulosefasern auf mindestens vier Ebenen. Durch die Einlagerung von Lignin auf allen Ebenen erhält das System zusätzlich seine Druckfestigkeit (Abb.1).

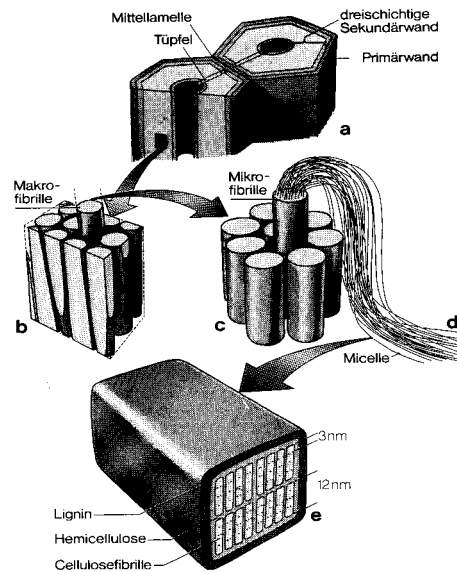


Abb.1: Schema des Aufbaus einer verholzten Zellwand (Zeichnung: Tambour)

Die verholzte Zellwand ist ein klassisches Verbundmaterial, bestehend aus einem Fasersystem, eingebettet in ein Grundgerüst. Sie besteht aus einem Basiselement, der Lignozellulose. Der Lignozellulosekomplex ist mechanisch auf mindestens vier aufeinanderfolgenden Ebenen strukturiert. Die Zellulosefasern sind parallel angeordnet und mechanisch sehr stabil. Diese Faserbündel wiederum sind eingebettet in eine Schicht aus Hemizellulose, was eine bessere Flexibilität verspricht (Fengel und Wegener, 1989). Die Bereiche zwischen den Kohlenhydratkomplexen sind auf allen Ebenen mit Lignin als Gerüstsubstanz gefüllt. Lignin ist zu etwa 30% in Holz enthalten. Es ist ein aromatisches Polymer und in den Zellwänden mit Zellulose und Hemizellulose komplexiert zu finden. Lignin besteht aus den Phenylpropanolen: Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol (Abb.2).

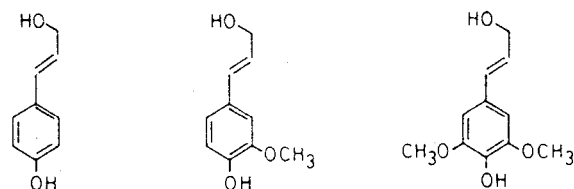


Abb.2: Ligninmonomere
(von links: Cumarylalkohol, Coniferylalkohol, Sinapylalkohol)

Erst seine molekulare Organisation, die Bildung eines dreidimensionalen Netzwerks durch radikalische Polymerisation, macht den besonderen Charakter und die außergewöhnlichen Eigenschaften aus (Abb.3).

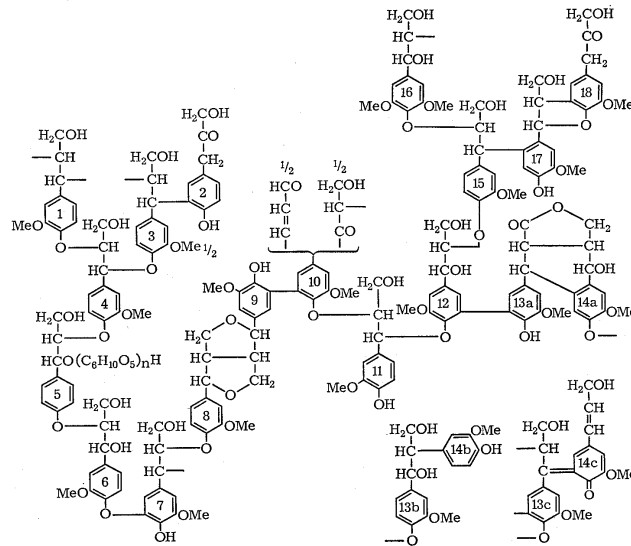


Abb.3: Strukturformel von Lignin

Die Polymerisation erfolgt während des Zellwand-Aufbaus in den Zwischenräumen der verdrehten Zellulose-Hemizellulose-Fasern. Der relative Anteil der drei Monomere ist je nach Pflanzenordnungen verschieden.

Phenolische Monomere werden durch den katalytischen Einsatz von Phenoloxidasen (Laccase) oder Peroxidasen polymerisiert. Durch eine Ein-Elektron-Transfer-Reaktion werden die Moleküle zu Radikalen umgewandelt und zu Lignol polymerisiert, einer Vorstufe des Lignins. Diese wiederum reagieren in einer Kettenreaktion mit zusätzlichen Lignolradikalen weiter, und bilden so die typische Ligninstruktur aus. Der ausschlaggebende Aktivierungsschritt, der es den Lignolen ermöglicht, mit Nucleophilen zu reagieren, ist die Oxidation zu einem Chinonmethid. Diese Oxidation wird entweder durch Phenoloxidasen oder durch Peroxidasen katalysiert. Das Chinonmethid reagiert mit dem Sauerstoff des Zuckers, und bildet eine stabile Ether-Bindung aus. Somit verketteten sich die aromatischen Teile des Lignozellulosekomplexes mit Kohlenhydraten. Der aromatische Kern reagiert mit zusätzlichem Phenol-Alkohol oder Lignol, um das Lignin der verholzten Zellwand zu bilden (Dean und Eriksson, 1994; Higuchi, 1997).

Die Zugabe von Monomeren zu den bereits bestehenden Ligninmolekülen führt durch eine einfache Radikalreaktion, katalysiert durch Laccase oder Peroxidase,

letztendlich zu der sehr komplexen Ligninstruktur, welche ein zufälliges dreidimensionales Netzwerk in der Mittellamelle verholzter Pflanzen bildet (Goring, 1989). In einem ausgewachsenen Baum existiert dieses leitfähige Gewebe von den Wurzelspitzen bis in die äußerste Baumkrone (Zimmermann, 1983).

1.1 Die antike Lacktechnik als Strategie für industrielle Anwendungen

Eine der ältesten bekannten Biotechnologien ist die Lacktechnik. Sie wurde vor über 6000 Jahren von ostasiatischen Künstlern entwickelt. Dies geschah entweder noch vor oder aber zur selben Zeit wie die Einführung der alkoholischen Fermentation, des Brotbackens mit Sauerteig und die Entwicklung verschiedener Molkereitechniken für die Verarbeitung von Milch (Rehm und Präve, 1994). Im Altertum war es die erste Biotechnologie, die außerhalb der Lebensmittelherstellung genutzt wurde und das scheinbar schon 2000 Jahre vor der Papyrusherstellung (Hüttermann et al., 1995).

Schon damals wurden die Inhaltsstoffe der pflanzlichen Zellwand, Phenole und Kohlenhydrate, zusammen mit einer Phenoloxidase für die Herstellung von Lackarbeiten benutzt (Watt und Ford, 1991). Ausgangsmaterial für das Kunsthandwerk ist der Wundsaft des Lack-Baumes (*Rhus verniciflua*) (Abb.4).



Abb.4: Teil einer Lackschnitzerei

Dieser Saft ist eine „Wasser-in-Öl“-Emulsion, welche aus Urushiol (60-65%), einer komplexen Mischung aus Diphenolen mit einer langen aliphatischen Seitenkette mit 1-3 Doppelbindungen, Gummi (6,5-10%), dem Enzym Laccase (0,1-1%) und Wasser (20-30%) besteht (Kumanotani, 1988). Die Mischung ist hervorragend dazu geeignet, Pflanzen vor Pilzen, Insekten und Phytophagen zu schützen, da der

Wundsaft im Beisein von Sauerstoff geliert und einen beständigen Wundverschluss bildet.

Um Lack herzustellen wird der Pflanzensaft gesammelt, sofort nach der Entnahme gefiltert und je nach Lacktechnik weiterverarbeitet. Während des Trocknungsprozesses wird Urushiol im Beisein von Luft und einem hohen Feuchtegehalt, oxidiert (Abb.5).

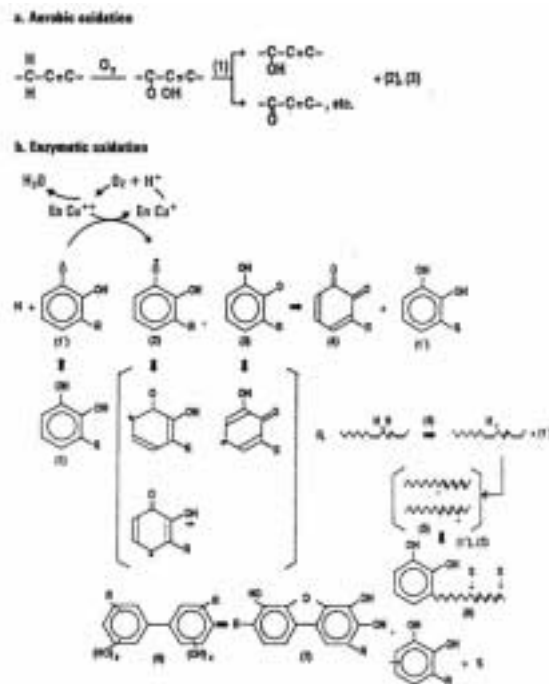


Abb.5: Die Oxidation des Urushiols

Hierbei finden zwei Reaktionen statt: Zuerst die nicht enzymatische Oxidation der aliphatischen Seitenkette, gefolgt von der enzymatischen Polymerisation, welche mit der Entfernung eines Elektrons aus dem Phenolring beginnt (Abb.5).

Für die Lacktechnik fügen die Künstler dem Lack Pigmente zu, da dieser nahezu farblos ist. Eine Möglichkeit ist der direkte Lackauftrag, das Malen auf einer glatten Holzoberfläche. Mit dieser Technik kann man Bilder herstellen, deren Farbbrillanz Jahrtausende anhält (Abb.6). Eine andere Möglichkeit sind Lackarbeiten, welche aus mehreren übereinanderliegenden Lackschichten herausgearbeitet werden (Abb.4).



Abb.6: Japanisches Lackbild

1.2 Anwendung im industriellen Maßstab als Bindemittel für Holzwerkstoffe

Um den Prozess der pflanzlichen Zellwand-Synthese oder das Kunsthandwerk der ostasiatischen Künstler in industriellem Maßstab zu nutzen, benötigt man ein kostengünstiges Phenol. Dieses wird mit Hilfe eines Enzyms in aktive Radikale überführt, die mit unterschiedlichen Komponenten reagieren, um einen Verbundwerkstoff zu bilden. Eine günstige und weitverbreitete Ligninquelle ist das Material, welches bei der Zellstoff- und Papierherstellung anfällt. Die technischen Lignine in diesen Industriereststoffen werden zu mehreren Millionen Tonnen jährlich produziert und sind weltweit in ausreichender Menge verfügbar. Der geeignete Enzym-Kandidat, der in der Lage ist, Lignin in freie Radikale umzuwandeln, ist das Enzym Laccase. Dieses wird ebenfalls beim Ligninabbau durch Weißfäulepilze eingesetzt. Laccase hat ein geringes Redoxpotential und benötigt eine freie phenolische Hydroxylgruppe für die Reaktion. In Anwesenheit von verschiedenen organischen Redox-Systemen, den sogenannten Mediatoren, ist das Enzym in der Lage, Substrate zu oxidieren. So kann beispielsweise Lignin aus Zellstoff, welches sonst nicht mit diesem Enzym reagiert, dennoch umgesetzt werden (Call und Mücke, 1997). Laccase ist darüber hinaus in der Lage, Phenole zu polymerisieren (Haars

und Hüttermann, 1980 a, b). In der ersten Zeit nach ihrer Entdeckung hat sich die Suche nach ligninabbauenden Enzymen zumeist auf die Peroxidasen beschränkt. Jetzt konzentriert sie sich zunehmend auf die Laccase. Dieser Wandel hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass Laccase für die Oxidation lediglich Sauerstoff benötigt und inzwischen auch industriell erworben werden kann (Novo Nordisk, Dänemark). Diverse Studien haben gezeigt, dass Laccase Lignin in vivo (Hüttermann et al., 1977) und in vitro (Haars und Hüttermann, 1980 a, b) polymerisieren kann (Hüttermann et al., 2001). Da Lignin und Laccase in großen Mengen kostengünstig zur Verfügung stehen, eignen sie sich besonders für die industrielle Anwendung in der Holzwerkstoffindustrie.

Die Produktion von Holzwerkstoffen, wie Faser- oder Spanplatten, folgt immer demselben Prinzip: Massivholz wird in Späne, Hackschnitzel oder Fasern zerkleinert, mit einem Bindemittel versetzt und anschließend gepresst. Bei diesem Ansatz wird die Anisotropie des Holzes reduziert. Holz in geringen Dimensionen oder recyceltes Holz kann somit in ein nützliches Produkt umgewandelt und weiterverwendet werden. Während dieses Prozesses wird dem Holz bislang eine Komponente zugegeben, welche nicht natürlich vorkommt: das Bindemittel. Die wichtigsten Bindemittel für Holzwerkstoffe sind derzeit Harnstoff-Formaldehyd, Phenol-Formaldehyd und Phenyl-diisocyanate. Nimz et al. waren allerdings bereits 1972 in der Lage, Lignin als Bindemittel einzusetzen. Unglücklicherweise war der Wasserstoffperoxid-Gehalt, der für die Reaktion benötigt wurde, so hoch, dass der industrielle Einsatz zu gefährlich wurde (Roffael, 1979). Nimz et al. (1972) schlugen den Einsatz von Peroxidasen und Sauerstoffperoxid vor. Es gab jedoch keine verwertbaren Ergebnisse, welche als Grundlage für technische Prozesse dienen konnten.

Ein anderer Ansatz war der Einsatz von leicht zu produzierender Laccase als Radikal-Donator (Kharazipour, 1995). Indem zwei Bretter zusammengeleimt wurden, konnten bei Holzwerkstoffen gute Bruchfestigkeiten erreicht werden (Hüttermann und Haars, 1981).

Das größte Problem war die mangelnde Wasserfestigkeit der Spanplatten. Die Enzymreaktion fand in wässriger Lösung mit einem wasserlöslichen Enzym und einem hydrophilen Substrat statt. Das Reaktionsprodukt musste jedoch wasserunlöslich und hydrophob sein, um den technischen Ansprüchen zu genügen. Aufgrund der hohen Hydrophilie der Ligninsulfonate hatten die ersten hergestellten

Platten zwar gute Bruchfestigkeitseigenschaften, zerfielen jedoch, sobald sie mit Wasser in Berührung kamen. Die intensive Forschung auf diesem Gebiet spiegelt sich in den relevanten Publikationen wider (Haars et al., 1986, 1987, 1989; Hüttermann et al., 1989, 1990; Hüttermann und Kharazipour, 1996; Kharazipour, 1995; Kharazipour et al., 1991; Kharazipour und Hüttermann, 1992, 1998). Inzwischen wird mit wasserunlöslichem Lignin gearbeitet und nur geringe Mengen petrochemischer Harze werden hinzugegeben. Auf diesem Wege wurden emissionsfreie Spanplatten mit guter Qualität hergestellt. Diese Ergebnisse wurden bestätigt durch Yamaguchi et al. (1991, 1992), die an der Polymerisation von Vanillinsäure mit Laccase für die Bindung von thermomechanischem Zellstoff arbeiteten und Pappe mit zunehmender Spaltfestigkeit erhielten. Die Copolymerisation des Lignins mit dem restlichen Lignin auf der Zellstoff-Oberfläche war verantwortlich für die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften (Yamaguchi et al., 1994). Jin et al. (1991) benutzten erfolgreich Braunfäule-Lignin zusammen mit Laccase oder Peroxidase als Bindemittel für Holzwerkstoffe.

Die Herstellung von Pfropf-Copolymeren durch die Einführung von Lignin in die zentrale Polymerstruktur schien eine geeignete Methode zu sein, Lignin zu einer neuen, absatzfähigen Gruppe von Kunststoffen zu machen (Glasser, 1989). Durch Pfropfung wurde die Abbaubarkeit verbessert. Beispielsweise wurden Styrol-Pfropf-Copolymere des Lignins durch Weißfäulepilze komplett abgebaut, während Polystyrol-Homopolymere nicht abgebaut wurden (Milstein et al., 1992). Zahlreiche Studien über die Pfropf-Copolymerisation von Acryl-Monomeren auf Lignin, entweder durch chemische Radikal-Starter (Meister et al., 1984, 1991; Chen et al., 1986; Huang et al., 1992) oder durch Bestrahlung (Koshijima und Muraki, 1968; Phillips et al., 1972) folgten. Alle Systeme basierten auf Peroxidgemischen, welche Hydroxy- oder Alkoxy-Radikale nach homolytischer oder reduzierender Spaltung der Peroxidbindung bildeten. Meister et al. (1984) produzierten ein Pfropf-Polymer und ein Homopolymer gleichzeitig in einem Verfahren. Das System bestand aus einem Chlorid-Ion, hinzugefügt als Calciumchlorid, und einem Peroxid wie Wasserstoffperoxid oder Dioxan-Peroxid. Die Copolymerisation von Organosolv-Lignin und Acrylamid in einer 70%igen Dioxan-Lösung wurde untersucht. Dazu benutzten die Wissenschaftler eine Phenoloxidase (Laccase), um Lignin-Radikale und Dioxan-Peroxide durch eine Autoxidation der Lösung herzustellen (Mai, 1998; Kharazipour et al., 1998 a; Mai et al., 1999, 2000 b). Die Ergebnisse zeigten, dass

Phenoxyradikale allein nicht genug Reaktivität für die Copolymerisation mit Acrylamid besaßen. Vielmehr wurden organische Peroxide benötigt. Die chemoenzymatische Pfropf-Effizienz war effektiver als bei den nicht enzymatischen Systemen. In früheren Studien wurde versucht, in die Grundstruktur des Acryl-Polymers ligninähnliche phenolische Mischungen durch chemoenzymatische Aktivierung einzubinden (Mai et al., 2001). Verschiedene ligninähnliche Phenole wurden auf ihre Fähigkeit, mit Acrylamid und Acrylsäure copolymerisiert zu werden, getestet. Die kombinierte Aktivierung durch Laccase und eine Fenton-ähnliche Reaktion ergab ein gutes Resultat. Diese Copolymere zeigten eine starke Veränderung in ihrem durchschnittlichen Molekulargewicht in Abhängigkeit vom jeweiligen, als Comonomer eingesetzten, Phenol. Es wurde beobachtet, dass eine Aktivierung von Laccase und t-Butylhydroperoxid (t-BHP) allein mit beiden Acryl-Monomeren ein höheres mittleres Molekulargewicht ergab, als eine Aktivierung durch die Fenton-ähnliche Reaktion oder eine Kombination aus beiden Systemen. Dieser Unterschied war bei den Acrylsäure-Copolymeren besonders hoch. Die Ergebnisse zeigten, dass man durch die chemoenzymatische Copolymerisation in der Lage war, Molekulargewichte und Reaktionsprodukte zu kontrollieren. Durch diese Methode erhoffte man, ein neues, wasserlösliches Polymer mit vielen Einsatzmöglichkeiten herzustellen (Hüttermann et al., 2001).

Eine Behandlung mit Pilzenzym allein reichte nicht aus um die mechanische Festigkeit zu verbessern. Die inneren Bindungskräfte der Zellwände bei den behandelten Fasern konnten jedoch verstärkt werden (Kühne, 1993). Es zeigte sich, dass mit Weiß- oder Braunfäulepilzen inkubierte Hackschnitzel einen geringeren Energiebedarf bei der Zerkleinerung hatten. Es wurde eine geringere Menge petrochemischer Harze für die Bindung benötigt. Außerdem war eine eindeutige Faser-Bindung während des Pressens auch ohne die Zugabe von petrochemischem Bindemittel zu verzeichnen. Während des Produktionsprozesses wurde das Lignin der Mittellamelle, welches das natürliche Bindeglied zwischen zwei Holzzellen ist, über den Glasübergangspunkt hinaus plastifiziert. Bei diesem Prozess trennten sich die Zellen. Nach dem Herunterkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lignin wieder fest und hinterließ eine glasige Kruste auf der Oberfläche der Holzfasern. Diese Kruste bildete eine Barriere und reduzierte die Bindungsfähigkeit der zugegebenen Harze (Wagenführ, 1988). Kharazipour und Hüttermann (1993) haben bewiesen,

dass eine Behandlung mit Laccase zu einem Anstieg der optischen Dichte (OD(280)) des Überstandes führte. Untersuchungen der behandelten Fasern unter dem Elektronenmikroskop ergaben, dass die Ligninkruste nach einer Laccasebehandlung vollständig beseitigt wurde. Das Lignin der Faseroberfläche war tatsächlich sehr empfänglich für die Ligninreaktion. Da Lignin während der Inkubation mit Laccase in ein Substrat umgewandelt wurde, wurden und werden immer noch die geeigneten Konditionen für die Herstellung von Faserplatten getestet (Kharazipour und Hüttermann, 1993; Kharazipour, 1995; Kharazipour et al., 1997). Die besten mechanischen Eigenschaften, das heißt maximale interne Bindungsfestigkeit und minimale Quellung, erhielt man bei Versuchen im pH-Bereich 5, dem Reaktionsoptimum für Laccase.

Schließlich war es möglich, Holzwerkstoffe ohne Zugabe von Bindemitteln herzustellen. Konventionelle chemische Kleber wurden für die Herstellung von Spanplatten durch die Zugabe von Pilz-Kulturen oder isolierten Pilz-Enzymen substituiert (Mai et al., 2004). Die Bindung entstand allein durch eine Aktivierung der selbstklebenden, im Holz vorkommenden Kräfte. Diese so erzeugten Spanplatten erfüllten die deutsche Industrie Norm (DIN).

Eine hohe Zerfaserungstemperatur kann eine positive Auswirkung auf die mechanische Festigkeit von MDF-Platten haben. Der fortschreitende Zusammenbruch des Ligninpolymers bei ansteigender Zerfaserungstemperatur macht es zu einem guten Substrat für die Laccase, welche bei der Plattenherstellung über die Blowline ohne lange Inkubationszeiten zugegeben wurde. Interne Bindungskräfte und Feuchtequellungseigenschaften verbesserten sich bei einem Anstieg der Zerfaserungstemperatur (Widsten et al., 2003).

1.3 Polymerisation des Lignins

Der Vorteil dieser Prozesse ist, dass es sich um Simulationen natürlicher Prozesse handelt. Die Produkte haben keine Emissionsprobleme, weder während ihrer Herstellung, noch in der Zeit ihrer Anwendung. Zudem sind diese ligningebundenen Verbundmaterialien kompatibel mit dem terrestrischen Kohlenstoffkreislauf und lassen sich durch Kompostierung recyceln. Langfristig wird mit einer hohen

Akzeptanz dieser Produkte gerechnet. Diese beschriebenen Techniken befinden sich zur Zeit in den unterschiedlichsten Entwicklungsstadien. Bislang verspricht die Inkubation von Lignin und Laccase den größten Erfolg. Diese Reaktion führt zu einer Polymerisation des Lignins (Hüttermann et al., 1977; Hüttermann, 1978). Nach einiger Zeit kann eine Depolymerisationsreaktion folgen (Haars und Hüttermann; 1980 b). Die gängige Sichtweise der zugrundeliegenden Mechanismen für die Polymerisations-Reaktion ist die Bildung von Phenoxylradikalen durch den Elektronen-Transfer des Lignins. Sie reagieren weiter, um das polymerisierte Lignin zu bilden (Abb.7).

Lignin + Laccase + O₂ → Lignin*

Lignin* + Laccase → reagiert mit allen Nukleophilen (z.B. Stärke und Zellulose)

Abb.7: Polymerisation des Lignins

Die Reaktion an sich ist langsam und benötigt Stunden der Inkubation. Wenn Phenole zu dem Reaktionsgemisch gegeben werden, können sie ebenfalls mit dem Ligninmolekül reagieren und Copolymere bilden (Milstein et al., 1993). Andere Moleküle können unter diesen Bedingungen nicht mit Lignin reagieren. Selbst Olefine, wie Acrylate, welche eigentlich sehr schnell mit anderen Radikalen reagieren, reagieren während der Inkubation mit Laccase nicht mit dem Lignin-Molekül. Eine Reaktion findet jedoch statt, wenn in der Reaktionsmischung organische Peroxide enthalten sind (Mai et al., 1999).

Im Rahmen der Untersuchungen über den Einsatz von Lignin für die enzymatische Bindung von Holzspänen konnte nachgewiesen werden, dass die Inkubation einer 20%igen Ligninlösung mit hoher Laccasekonzentration und intensiver Belüftung zu einem plötzlichen Anstieg der Reaktivität von Lignin und Zellulose führt (Hüttermann et al., 2000, Abb.8 - 10).

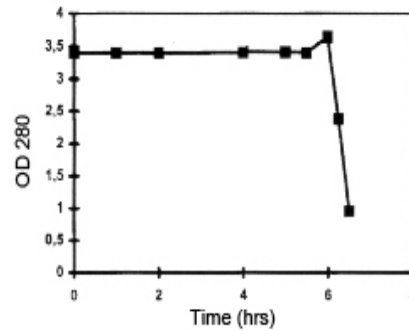


Abb.8: Bindung von Lignin an Zellulose während der Inkubation unter hohem Sauerstoffpartialdruck (Hüttermann et al., 2000)

Nach einer sechsständigen Inkubation mit Laccase und Sauerstoff wurden mehr als 70% des Lignins, welches auf Filterpapier geblottet wurde, in einer Weise gebunden, dass es mit 0,1M Natriumhydroxid (NaOH) nicht mehr von der Zellulose gelöst werden konnte. Die Lokalisierung des Lignins im Reaktionsprodukt wurde untersucht und dabei zeigte sich, dass die größte Menge Lignin an der Oberfläche lokalisiert war. Der Rest war verteilt, jedoch ebenfalls kovalent gebunden (Schindel, 1999).

Dieses ist der erste Bericht in der Literatur über eine enzymatisch katalysierte Reaktion von Lignin mit Zellulose zu einem Produkt, bei dem Lignin kovalent an ein Kohlenhydrat gebunden wurde. Es konnte weder in 0,1M NaOH noch in anderen Auswaschungen als solchen, welche sonst bei Studien der Reaktion von Ligninmonomeren mit Zellulose eingesetzt wurden (Kosikova et al., 1996), gelöst werden.

Um die Gründe für die veränderte Reaktivität des Lignins zu klären, musste die Chemie des aktivierten Lignins erforscht werden. Eine Studie über die Änderung des Molekulargewichts von Lignin während der Inkubation zeigte, dass die zunehmende Reaktivität gegenüber der Zellulose von einem Anstieg des Molekulargewichts des inkubierten Lignins begleitet wurde (Abb.9).

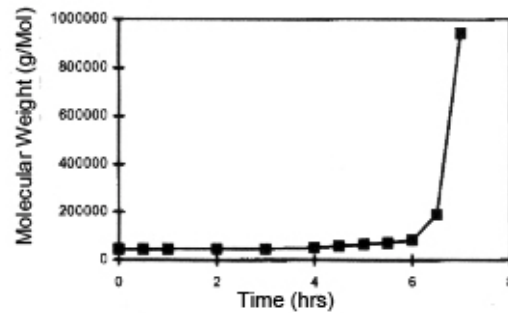


Abb.9: Änderung des Molekulargewichts des Lignins während der Inkubation (aus Hüttermann et al., 2000)

Wenn geringe Mengen aktivierten Lignins zu nicht aktiviertem Lignin gegeben werden, verbessert sich die anschließend durchgeführte Laccase-katalysierte Polymerisation des Lignins (Abb.10).

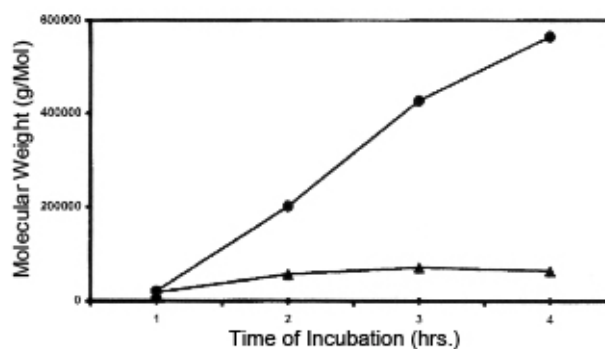


Abb.10: Einfluss von 10mg aktiviertem Lignin auf die Laccase katalysierte Polymerisation von 100mg Lignin (aus Hüttermann et al., 2000)

Die Ergebnisse verschiedener analytischer Studien führten zu dem Schluss, dass bis auf die Änderungen des Molekulargewichts keine wesentliche Änderung der chemischen Struktur und der funktionellen Gruppen des Lignins während des Aktivierungsprozesses mit Laccase erfolgte. Die einzige signifikante Änderung der chemischen Struktur des Lignins war die Dichte der Phenoxyradikale. Die Daten zeigten, dass während der Inkubation mit Laccase unter Belüftung stabile Phenoxyradikale gebildet wurden, welche mit mehr Molekülen reagierten, als das nicht aktivierte Lignin. Wegen der hohen Radikaldichte fungierte das aktivierte Lignin als Vermittler für das zugegebene Lignin, wodurch sich die Polymerisation von unbehandeltem Lignin mit Laccase erhöhte. Die Phenoxyradikale waren so aktiv,

dass sie in der Lage waren, mit Nucleophilen, wie Zellulose oder Stärke, zu reagieren.

Diese Reaktion eröffnet neue Möglichkeiten für den biotechnologischen Einsatz von Lignin. In weiterführenden Versuchen wurde festgestellt, dass das aktivierte Lignin anders reagiert als das nicht aktivierte. Dieser Effekt wurde sowohl bei der Reaktion mit Zellulose als auch bei der Reaktion mit Stärke (Lütkemeyer, 2002) festgestellt.

Es ist ein völlig neuer Stoff entstanden, welcher vielfältige Einsatzmöglichkeiten bieten könnte.

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, aufzuzeigen, mit welchen Systemen dieser Stoff reagieren kann. Dabei wurden die folgenden Themen bearbeitet:

1. Untersuchung der Reaktion zwischen aktiviertem Lignin und Wachsmaisstärke
2. Einfluss von Mediatoren auf die Radikaldichte und Ligninablösung von Holzfasern
3. Herstellung von faserverstärkten Kunststoffen mit Acrylmonomeren und Holzfasern
4. Modellversuche zur Humusdynamik
5. Modellversuche zur Humusbildung

2 Stärke

2.1 Einleitung

Stärke ist aus verschiedenen Gründen der interessanteste Rohstoff, welcher für die Substitution von petrochemischen Kunststoffen in Frage kommt. Sie ist biologisch abbaubar und, im Gegensatz zu fossilen Rohstoffen, erneuerbar, da die Stärkeproduzierenden Pflanzen jährlich neu kultiviert werden können (Abb.2.1).

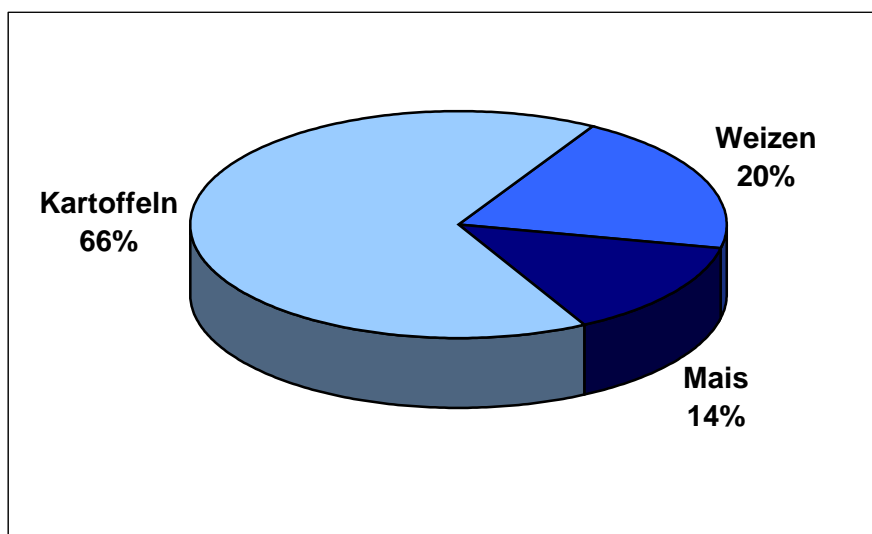


Abb.2.1: Rohstoffaufkommen für die Stärkeproduktion in Deutschland 2001
(4,4 Mio. t laut Fachverband der Stärkeindustrie)

Für die Weiterverarbeitung der Stärke sind ihre Eigenschaften wichtig. Diese hängen im wesentlichen davon ab, in welchem Verhältnis die beiden Komponenten der Stärke, Amylose und Amylopektin, zueinander stehen.

In der Regel besteht Stärke aus durchschnittlich 25% Amylose und 75% Amylopektin, zwei Polysacchariden unterschiedlicher Struktur und molarer Masse. Der Grundbaustein dieser beiden Polysaccharide ist α -D-Glucopyranose.

2.1.1 Aufbau des Stärkemoleküls

Amylose besteht aus einer langen unverzweigten Kette von Glucoseeinheiten, die durch α -1-4 Bindungen spiralförmig miteinander verknüpft sind. Sie befindet sich im Inneren des Gesamtmoleküls (Abb.2.2).

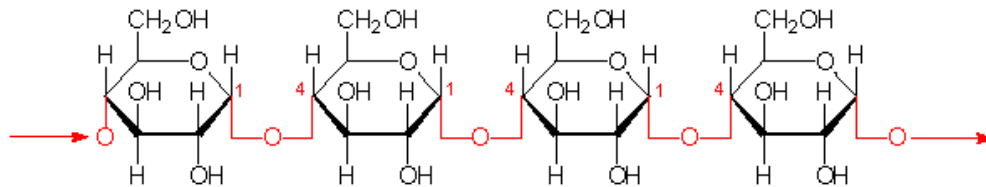


Abb.2.2: Aufbau der Amylose

In der Amylosehelix sind Hohlräume vorhanden, in die Stoffe mit passender Molekülform eingelagert werden können. Eine bekannte Einlagerungsverbindung ist beispielsweise die Jod-Stärke-Reaktion. Hierbei lagern sich Jodmoleküle in die Hohlräume der Helix ein und bilden den sogenannten Jod-Stärke-Komplex. Dabei wird die Elektronenbindung des Jods derart gelockert, dass es zu der typischen Blaufärbung kommt.

Amylopektin besteht aus Amyloseketten, die in verzweigter Form und höhermolekular als die Amylose vorliegen (Abb.2.3).

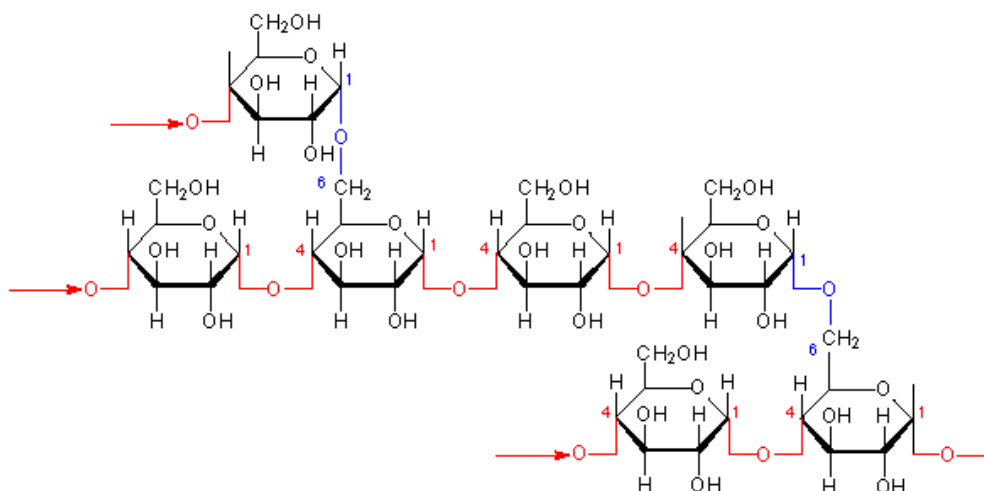


Abb.2.3: Aufbau des Amylopektins

Zusätzlich zu den linear polymerisierten Ketten sind Verzweigungen durch Seitenketten möglich. Amylopektin wird durch α -1-4 und α -1-6 glykosidische Bindungen miteinander verknüpft und bildet so die kristalline Hülle des Stärkemoleküls (Abb.2.4).

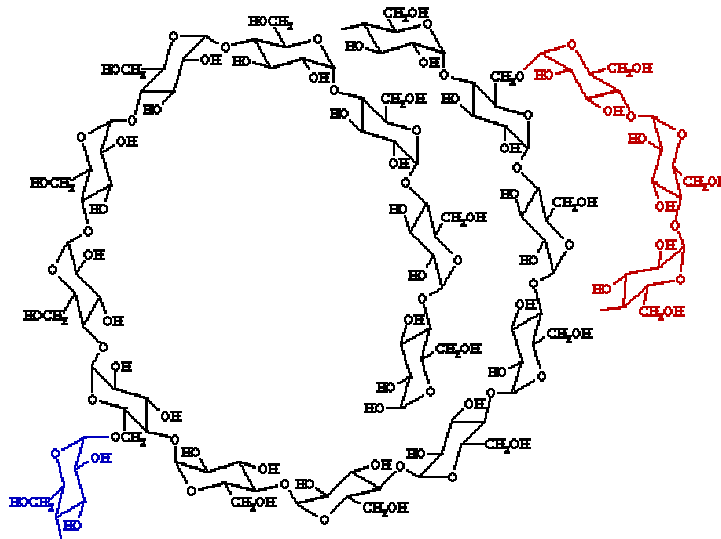


Abb.2.4: Die helikale Struktur des Amylopektins

In Gegenwart von Wasser löst sich Amylose kolloidal auf, Amylopektin quillt lediglich. Stärke ist außerdem ein Thermoplast. Sie wird unter Temperatureinwirkung verformbar, behält jedoch die unter hohen Temperaturen vorgegebene Form auch nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur bei. Somit wäre Stärke die ideale Grundsubstanz für die Herstellung einer Vielzahl von Artikeln mit ähnlichen Eigenschaften wie solchen, die derzeit aus petrochemischen Kunststoffen hergestellt werden. Das Problem der Stärke ist jedoch ihre hohe Hydrophilie aufgrund der vielen OH-Gruppen im Molekül. Aus diesem Grund muss native Stärke so modifiziert werden, dass eine ausreichende Wasserfestigkeit erreicht wird.

2.1.2 Modifikation der Stärke

Über die Modifikation von Stärke liegt bereits umfangreiche Literatur vor (Daniel et al., 1994). Sie kann sowohl physikalisch als auch chemisch modifiziert werden. Im Folgenden sollen einige Methoden exemplarisch vorgestellt werden:

2.1.2.1 Stärke als Kunststoffersatz

Alle „klassischen“ Stärkederivate besitzen eine Gemeinsamkeit: Sie können der Stärke keine Wasserfestigkeit verleihen. Seitdem Stärke als Ersatz für petrochemische Kunststoffe eingesetzt werden soll, wird intensiv nach Möglichkeiten gesucht, die Wasserfestigkeit zu verbessern.

2.1.2.1.1 Einsatz der Stärkegemische mit anderen Komponenten

Derzeit werden die unterschiedlichsten Ansätze verfolgt Stärke mit anderen Komponenten zu kombinieren. Curvelo et al. (2001) plastifizierten Stärke unter Zugabe von Glycerin und verstärkten sie mit Zellulosefasern von *Eucalyptus urograndis*. Dadurch stieg die Zugfestigkeit um 100% und brachte eine gute Bindung zwischen Fasern und Matrix mit sich. In neueren Versuchen wurde daran gearbeitet, Zellulosefasern durch Oxypropylierung im äußeren Faserbereich in Werkstoffe umzuwandeln, bei denen eine thermoplastische Hülle den nicht reagierten Kern der Fasern umschließt und eine gewisse Stabilität verleihen sollte (Gandini et al., 2005). De Carvalho et al. (2001) fügten mit Glycerin plastifizierter Maisstärke hydratisiertes Kaolin als Füllmaterial zu. Bei einem Anteil von 50% stiegen Zugfestigkeit, Elastizität und Wasserfestigkeit an, während die Abreißfestigkeit abnahm.

Bei Temperaturen von 150°C wurden Mischungen aus Maisstärke und natürlichem Gummi (anteilig 2,5% bis 20%) hergestellt. Es zeigte sich eine Abnahme der Zugfestigkeit und damit einher ging eine Erhöhung des Bruchwiderstandes (Carvalho et al., 2003).

Thermoplastische Stärke wurde außerdem mit hydrophoben, abbaubaren Polymeren gemischt. Die hergestellten Filme waren durchsichtig, beschreibbar und ließen sich

anfärben. Sie waren dampfdurchlässig, bildeten jedoch eine gute Barriere gegen Sauerstoff und konnten wie konventionelle Folien genutzt und kompostiert werden (Lörcks, 1997).

2.1.2.1.2 Chemische Modifikation der Stärke mit kovalent gebundenen Substituenten

Die Kombination aus Zelluloseacetat und Stärkeacetat eröffnete einen neuen Einsatzbereich für Stärke zur Herstellung von Fasern, Fäden, Garnen und Kunststoffmaterial. Abhängig vom Substitutionsgrad der freien Hydroxylgruppen wurde Stärkeacetat bei einer Vielzahl kommerzieller Anwendungen eingesetzt, wie beispielsweise in der Lebensmittelindustrie (Maheras et al., 1996).

Bei der Reaktion von Maisstärke mit Acetanhydrid und wässrigem Natriumhydroxid wurden Stärkeacetate hergestellt, wobei dem Wasser eine plastifizierende Wirkung zukam. Bei der Extrusion dieser Acetate mit ca. 15% Feuchtigkeit bei 150°C ergab sich ein wasserfester Schaum, welcher bei der Herstellung von Verpackungsmaterial, Beschichtungen, Einweggeschirr und Einwegbesteck Anwendung fand.

Stärke-Acetate mit Substitutionsgraden von 0,1% bis 1,5% wurden durch Erhitzen von Maisstärke, Essigsäure und Essiganhydrid unter Rühren in einem geschlossenen Teflongefäß in der Mikrowelle hergestellt. Bei einer Temperatur zwischen 150°C und 160°C und einer Reaktionszeit von 4 bis 7 Minuten lag die Reaktions-Effizienz in entsprechenden Versuchen bei über 90% (Shogren und Biswas, 2006).

Neben der Verwendung von Kunststoffen mit polaren Gruppen bietet sich ein Coating der Stärkeoberfläche an. Hierzu eignen sich besonders organofunktionelle Silane, die sich bei anderen Füllstoffen bereits als Haftvermittler bewährt haben. Die Ankopplung erfolgte durch eine Hydrolysereaktion mit den Hydroxylgruppen der zu beschichtenden Oberfläche. Bei der Stärke waren jedoch nicht alle Hydroxylgruppen zu einer solchen Reaktion fähig. Daher wurden hochreaktive Metallsäurechelate als Katalysatoren eingesetzt (Fritz und Widmann, 1993).

2.1.3 Biologische Abbaubarkeit der Kunststoffe auf Stärkebasis

Innovativ und zukunftsorientiert ist biologisch abbaubares und kompostierbares Kunststoffmaterial, speziell solches aus erneuerbaren Ressourcen der Landwirtschaft. Besonders intensiv wurde daher die biologische Abbaubarkeit der verschiedenen modifizierten und substituierten Stärken untersucht.

Es wurden bereits unterschiedliche native oder chemisch modifizierte Stärken zur Produktion von Plastikfilmen eingesetzt. Sie haben den Vorteil, abbaubar zu sein. Der Nachteil ist jedoch die verminderte Wasserresistenz. Sie quollen und lösten sich zunehmend bei Kontakt mit feuchten Lebensmitteln auf.

Chiellini et al. (1991) machten Versuche zum mikrobiellen Abbau einer Reihe von Polyethylenfilmen mit geringer Dichte und unterschiedlichem Stärkegehalt (0% bis 40%). Erwartet wurde, dass eine heterogene Verteilung der Stärke im Inneren der Polymermatrix einen höheren Stärkegehalt in der Endmischung erlaubt, welcher dann den mikrobiellen Abbau begünstigt. Die Proben wurden auf dynamisch-mechanische Eigenschaften, Molekulargewicht und Gewichtsverlust untersucht. Diese Informationen ermöglichten eine semiquantitative Bewertung des mikrobiellen Befalls. Kompost schien hierbei die effektivsten Abbaugegebenheiten aufzuweisen. Bei allen Proben wurde jedoch eine Oberflächenerosion beobachtet. Sie wurde zumeist von einer ausgeprägten Anziehung der Mikroorganismen an die Oberfläche begleitet.

Aus Orangenfasern, Polyvinylalkoholen und Maisstärke wurden ebenfalls Filme hergestellt. Das Ergebnis bestand aus wasserdurchlässigen Filmen, welche innerhalb von 30 Tagen im Kompost abgebaut wurden. Dies geschah deutlich langsamer bei quervernetzten Filmen (Cinelli et al., 2003).

2.1.4 Lignin

Bei Lignin handelt es sich um einen stark hydrophoben Stoff, welcher normalerweise jedoch nicht mit Kohlenhydraten wie Zellulose und Stärke reagiert.

Baumberger et al. (1996) haben begonnen, Ligninsulfonat mit einer Stärkematrix zu mischen, um ein einphasiges Material zu erhalten, das biologisch abbaubar ist. Ligninsulfonate sind wasserlöslich. Daher wurde erwartet, dass sich auch bei

extremer thermischer Behandlung genügend Verbindungen zwischen Stärke und Lignin bilden, um die Mechanik und die Wasserfestigkeit zu verbessern. In weiteren Versuchen wurden Filme aus Weizenstärke mit Ligninsulfonaten unter Zugabe von Glycerin durch thermisches Formen und Gießen hergestellt. Die geformten Filme wurden mit solchen aus plastifizierter Stärke verglichen und auf ihre mechanischen Eigenschaften getestet. Mechanische Zugdehnungstests zeigten, dass bei einer Zugabe von 10% Ligninsulfonaten der Dehnungswiderstand von plastifizierten Stärkefilmen, unabhängig von der Zusammensetzung des Ligninsulfonats, verbessert wurde. Die dynamische, mechanische und thermische Analyse ergab je nach Ligningehalt einen Glasübergangstemperaturbereich von 16°C bis 40°C (Baumberger et al., 1996, 1997).

Ein weiterer Prozess ist die Katalyse von Lignin mit Laccase. Bei einer hohen Enzymkonzentration und einer hohen Belüftungsrate wird das Enzym so aktiv, dass es sowohl an Filterpapier (Zellulose) als auch an Stärke kovalent bindet.

Für eine Anwendung ist dies aber nur sinnvoll, wenn das Lignin in Form von aktiviertem Lignin an die Stärke gebunden ist. Eine Aktivierung erfolgt auf direktem Wege mit Hilfe von Laccase, welche von Weißfäulepilzen stammt und zu einer Polymerisation des Lignins führt.

Bei Untersuchungen an einem Lignin-Stärke-Verbundwerkstoff hat sich gezeigt, dass dieser Lignin-Stärke-Verbund resistenter gegen Quellung ist als unmodifizierte Stärke. Dies zeigt sich deutlich bei der Untersuchung im Brabender Viskoamylographen.

Bereits geringe Mengen Lignin haben einen großen Einfluss auf das Quellverhalten der Stärke. Die Viskosität verringert sich dabei.

Beobachtungen während vorausgegangener Versuche zeigten, dass bei nativer Stärke während der Kochung weniger ausgewaschen wurde als bei kovalent an Lignin gebundener Stärke (Lütkemeyer, 2002).

Diese Ergebnisse stehen in völligem Gegensatz zu den Erwartungen. Eine Erklärung dafür könnte im Aufbau des Stärkemoleküls zu finden sein.

2.1.5 Hypothese

Die zuvor durchgeführten Versuche (Lütkemeyer, 2002) haben zu zwei völlig widersprüchlichen Ergebnissen geführt:

1. Die Reaktion von Stärke und Lignin führt zu einer deutlichen Verringerung der Viskosität, bedingt durch die geringere Quellung der Stärke.
2. Die Reaktion von Stärke mit Lignin führt zu einer erhöhten Auswaschung von Stärke bei der Kochung.

Diese vielfach belegten Ergebnisse stehen in völligem Gegensatz zu denen, die Schröter (Schröter, 1998) für die Laccase-katalysierte Reaktion zwischen Lignin und Zellulose gefunden hat. Eine mögliche Erklärung könnte folgendermaßen lauten: Kartoffelstärke besteht zu 25% aus Amylose und zu 75% aus Amylopektin. Die Amylose befindet sich dabei in den Hohlräumen des kristallinen Amylopektins. Wenn diese Stärke verkleistert und anschließend bei 80°C getrocknet wird, verdampft der Großteil des Wassers und wird durch Wasserstoffbrückenbindungen ersetzt. Bei der 30-minütigen Kochung in Wasser wird erneut Wasser aufgenommen und zwischen den Stärkemolekülen eingelagert, so dass der gesamte Komplex aufquillt (Abb.2.5).

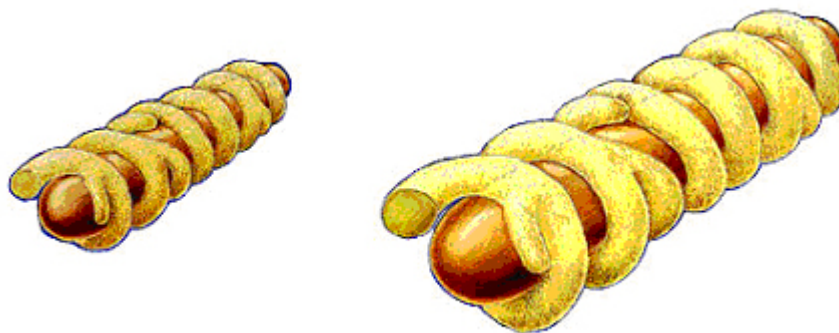


Abb.2.5: Quellverhalten unbeschichteter Stärke (Zeichnung: Tambour)

Wird die Stärke nun mit Lignin beschichtet, so ist zu vermuten, dass sich das Lignin aufgrund seines hohen Molekulargewichts hauptsächlich auf dessen Oberfläche ablagert (Abb.2.6).

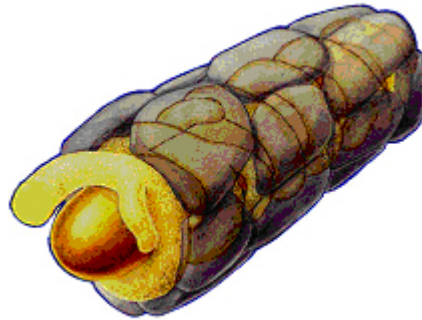


Abb.2.6: Mit Lignin beschichtete Stärke (Zeichnung: Tambour)

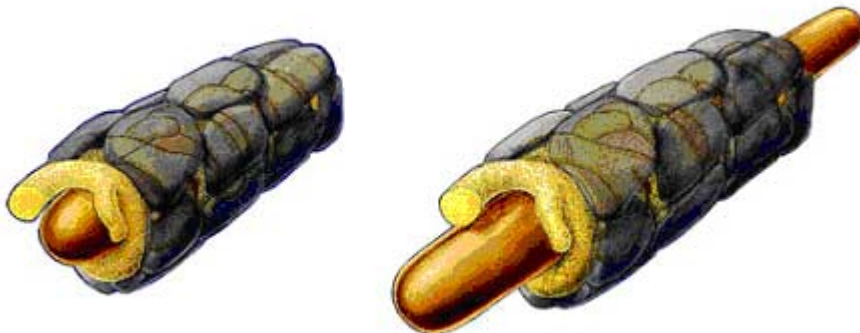


Abb.2.7: Quellungsverhalten der mit Lignin beschichteten Stärke
(Zeichnung: Tambour)

Eine Erklärung wäre, dass die Beschichtung mit Lignin die Quellung des Amylopektins hemmt. Die nicht reagierte Amylose quillt, sobald sie mit Wasser in Berührung kommt, aus dem Verbund heraus, geht in Lösung und wird durch den Stärketest erfasst (Abb.2.7).

2.1.6 Zielsetzung

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Versuche, die bereits zuvor mit Kartoffelstärke gemacht wurden, mit Wachsmaisstärke erneut durchgeführt.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Aktivitätsbestimmung der Laccase nach Gutierrez

2.2.1.1 Material

ABTS

Das für alle Aktivitätsbestimmungen verwendete 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz (ABTS) stammt von der Firma Merck.

Eis, Kunststoffküvetten, Rührstab, Pipetten und -spitzen, Messkolben, Photometer, Szintillationsfläschchen, Bidest, Laccase, Natriumacetatpuffer, ABTS

2.2.1.2 Methode

Die gängigste Methode zur Aktivitätsbestimmung ist die Methode nach Gutierrez, der ABTS-Test. Da es bei allen Ansätzen wichtig war, möglichst enzymsparend zu arbeiten, wurde von der Laccase immer nur so viel aufgetaut, wie für die Versuchsanordnung benötigt wurde, um die Verluste zu minimieren. Die aufgetaute Laccase wurde in Szintillationsfläschchen überführt und der Rest wieder eingefroren. Da sie fortwährend an Aktivität verliert, wurde der Vorgang der Lagerung optimiert und die Laccase bis zu ihrer Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Für die Messungen am Photometer wurden die Proben 1000fach verdünnt: 50µl der Laccase wurden in einen Messkolben pipettiert und auf 50ml mit Bidest aufgefüllt. Die Messung der Aktivität wurde in drei Wiederholungen gegen eine Referenz aus 800µl

Natriumacetatpuffer, 100µl ABTS und 100µl Bidest, um das fehlende Volumen der Laccase auszugleichen, durchgeführt. Bei den Messungen der Proben wurden jeweils 100µl der verdünnten Enzymprobe zu der sich bereits im Gerät befindenden Küvette hinzugefügt. Dies erfolgte direkt vor der Messung, danach wurden die Proben umgehend mit einem Rührstab vermennt und bei 420nm gemessen. Die Messung erfolgte über eine Dauer von 130 Sekunden in Abständen von jeweils 10 Sekunden. Für jede Messung wurde die Aktivität berechnet, um daraus später den Mittelwert bilden zu können.

2.2.2 Grundrezept zur Herstellung der Wachsmaisstärke-Lignin-Verbundwerkstoffe

2.2.2.1 Material

Phenoloxidase (Laccase)

Es wurde das industriell hergestellte Enzym der Firma Genencor verwendet. Dieses hatte in den durchgeführten ABTS-Tests eine Aktivität zwischen 1000 und 2500nKat/ml.

Indulin

Für die Versuche wurde das gereinigte, aus dem Sulfat-Verfahren gewonnene Indulin® AT der Firma Westvaco (South Carolina, USA) eingesetzt.

Zusammensetzung:

- Hemizellulose	0%
- Feuchtigkeit	5%
- Spezifische Dichte	1,3
- unlöslich in 5%iger NaOH	0,05%

Ligninsulfonat

Verwendung fand das Ligninsulfonat Calciumsalz der Firma Roth.

Stärke

Für alle Versuche wurde Wachsmaisstärke der Firma Sigma (S9679 RT) eingesetzt.

Wasserbad, Tischwaage, 50ml Weithals-Erlenmeyerkolben, Pipetten und –spitzen, Reagenzgläser und -ständer, Trockenschrank, Spatel, Petrischalen, 0,1M NaOH, Mc Illvaine Puffer pH 4,5, Exikkator, Laccase, Indulin, Ligninsulfonsäure (LSS), Wachsmaisstärke, Bidest, Szintilationsfläschchen

2.2.2.2 Methode

Grundrezept:

0,8g Ligninsulfonsäure Calciumsalz / 0,8g Indulin

1,6ml Laccase

1,6ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5

Dieses Grundrezept wurde dahingehend verändert, dass es sowohl mit Ligninsulfonsäure als auch mit Indulin verwandt wurde. Eine weitere Variation war die Verdreifachung der Ansätze.

Die tiefgefrorene Laccase wurde aufgetaut, bevor ihre Aktivität mit Hilfe des ABTS-Tests bestimmt wurde.

Anschließend wurde der eingewogenen Ligninsulfonsäure und dem eingewogenen Indulin mit einer Pipette Mc Illvaine Puffer pH 4,5 beigefügt.

Sobald das Wasserbad die entsprechende Versuchstemperatur (45°C) erreicht hatte, wurden die Kolben hineingestellt, die Laccase hinzugefügt und geschüttelt. Nach insgesamt 1,5 Stunden wurden die Kolben aus dem Wasserbad entfernt und die Ansätze mit jeweils 8g Wachsmaisstärke und unterschiedlichen Mengen Bidest (6ml bei einfachem Ansatz, 2ml bei dreifachem Ansatz) mit Hilfe eines Spatels in Petrischalen vermengt. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 80°C im Trockenschrank aufbewahrt. Als Referenz wurde 8g reine Wachsmaisstärke mit 8ml Bidest in einer Petrischale vermengt und ebenfalls bei 80°C getrocknet. Nach dem

Trocknen wurden die Proben zum Abkühlen in einen Exikkator gestellt, um eine Aufnahme von Feuchtigkeit während des Trocknungsprozesses zu verhindern. Die abgekühlten Proben wurden zur weiteren Lagerung in Szintillationsfläschchen überführt.

2.2.3 Stärkeauswaschung (nach DIN) mit Hilfe des Boehringer-Tests

2.2.3.1 Material

Glucose-Assay-Reagenz

Für alle Versuche wurde das Glucose-Assay-Reagenz der Firma Sigma verwendet.

Amyloglucosidase

Es wurde mit der Amyloglucosidase (AGS) der Firma Sigma gearbeitet.

Dimethylsulfoxid

Bei allen im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuchen wurde das Dimethylsulfoxid (DMSO) der Firma Roth verwendet.

Wasserbad, Pipetten und -spitzen, Alufolie, Messzylinder, pH-Meter, Trichter, Filter, Weithals-Erlenmeyerkolben, Messkolben, Bidest, Kunststoffküvetten, Rührstab, Eppendorfcups (E-cups) und -ständer, Analysenwaage, Wachsmaisstärkeproben, Eis, Glucose-Assay-Reagenz, AGS, 8M Salzsäure (HCl), DMSO, 5M NaOH, 1M NaOH, Zentrifuge

2.2.3.2 Methode

Von den Wachsmaisstärkeproben wurden 100mg (+/- 30mg) eingewogen. Da die Probe möglichst aus einem Stück bestehen sollte, um die spätere Messung nicht durch Unterschiede in der Korngröße zu verfälschen, mussten geringe Schwankungen der Einwaage toleriert werden. Mit einer Pipette wurden 10ml Bidest in die Erlenmeyerkolben gegeben und diese mit Alufolie verschlossen. Dann wurden

sie in das 60°C warme Wasserbad gestellt. Nach ungefähr 10 Minuten wurde die Alufolie vorsichtig geöffnet, die Proben hineingegeben und die Kolben sofort wieder verschlossen. Danach inkubierten die Kolben insgesamt 30 Minuten im Wasserbad. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben aus dem Wasserbad entfernt und der Inhalt filtriert. Von dem gewonnenen Filtrat wurden 5ml für den Stärketest verwandt.

Das Filtrat wurde in einen Erlenmeyerkolben zusammen mit 2ml DMSO und 0,5ml 8M HCl pipettiert. Dieser wurde erneut mit Alufolie verschlossen und für 30 weitere Minuten bei 60°C in das Wasserbad gestellt. Anschließend wurden sie aus dem Wasserbad entfernt und mit Hilfe von Eis auf Zimmertemperatur heruntergekühlt. Mit Hilfe von 1M und 5M NaOH wurde der pH Wert auf 4,5 eingestellt und die Probe danach auf 10ml aufgefüllt.

Von dieser Lösung wurden jeweils 200µl in E-cups pipettiert. Von den fünf Proben wurden jeweils drei Wiederholungen angesetzt. Hinzu kamen noch jeweils 160µl Bidest und 40µl 100fach verdünnte AGS. Parallel dazu wurde eine Referenz angesetzt, die aus 360µl Bidest und 40µl AGS bestand. Die E-cups kamen zur Inkubation noch einmal für 40 Minuten in ein 60°C warmes Schüttelwasserbad. Nach Ablauf der Zeit wurden sie wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt, und bei 20°C für ungefähr 2 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden jeweils 50µl entnommen und in Kunststoffküvetten pipettiert. Zu den 50µl aus den Probelösungen und der Referenz kamen jeweils 500µl Glucose-Assay-Reagenz, so dass sich in den Küvetten ein Gesamtvolumen von 550µl befand. Zusätzlich wurde noch eine Referenz-Küvette angesetzt, in der sich ausschließlich 550µl Bidest befand.

Mit Hilfe eines Rührstabs wurden die Lösungen durchmischt, um weitere 15 Minuten bei Zimmertemperatur zu inkubieren. Dann wurde die Referenz gegen eine mit Bidest gefüllte Küvette bei 420nm am Photometer gemessen. Erst danach wurden die Proben, in jeweils drei Wiederholungen, gemessen. Aus den gemessenen Extinktionen wurde ein Mittelwert für die weiteren Berechnungen gebildet.

2.2.4 Stärkeeichreihe

2.2.4.1 Material

Kartoffelstärke, Glucose-Assay-Reagenz, AGS, 8M HCl, DMSO, Bidest, 1M NaOH, 5M NaOH, Eis, Wasserbad, Erlenmeyerkolben, Alufolie, Pipetten und –spitzen, pH-Meter, Kunststoffküvetten, Plastikrührstab, E-cups und –ständler, Analysenwaage, Messkolben, Thermometer, Alufolie, Zentrifuge, Photometer

2.2.4.2 Methode

Mit Hilfe der Analysenwaage wurden 50mg Kartoffelstärke in einen Erlenmeyerkolben eingewogen. Mit einer Pipette wurden insgesamt 10ml DMSO und 5ml 8M HCl hinzupipettiert. Der Erlenmeyerkolben wurde mit Alufolie verschlossen und in ein bereits auf 60°C vorgeheiztes Wasserbad gestellt. Für 30 Minuten wurde der Kolben unter ständigem Schütteln im Wasserbad belassen. Nach dieser Zeit wurde der Kolben aus dem Wasserbad entfernt und auf Eis gestellt, um schneller auf Zimmertemperatur herunterzukühlen. Anschließend wurden der Lösung 20ml Bidest zugegeben und mit Hilfe von NaOH (5mol/L und 1mol/L) am pH-Meter der pH-Wert auf 4-5 eingestellt. Nun wurde die Probe in einen 50ml Messkolben überführt und bis zum Eichstrich mit Bidest aufgefüllt. Die Konzentration dieser Stammlösung beträgt 1g/L.

Mit Hilfe dieser Stammlösung wurde nach dem folgenden Schema eine Verdünnungsreihe angesetzt (Tab.2.1).

Tab.2.1: Verdünnungsreihe

	1g/L	0,8g/L	0,6g/L	0,4g/L	0,2g/L
Stammlösung	10ml	8ml	6ml	4ml	2ml
Bidest		2ml	4ml	6ml	8ml

Jeweils 200µl der Verdünnungsstufen wurden bei dreifacher Wiederholung in E-cups pipettiert. Zu den Probevolumina wurden jeweils 160µl Bidest und jeweils 40µl der auf Eis gelagerten AGS pipettiert. Die Endkonzentration der zuvor 100fach verdünnten AGS lag bei 1,2U/20µl. Parallel zu den Proben wurde eine Reagenzienleerwert-Probe angesetzt, die aus 360µl Bidest und 40µl AGS bestand. Die Proben wurden für weitere 40 Minuten unter ständigem Schütteln ins Wasserbad gestellt. Nach dem Entfernen der Proben aus dem Wasserbad, wurden sie auf Eis gelagert, und bei Erreichen von 20°C für 1-2 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Von den zentrifugierten Proben wurden jeweils 50µl Probevolumen in Kunststoffküvetten pipettiert. Um in jeder Küvette ein Gesamtvolumen von 550µl für die Messung zu erreichen, wurden jeweils 500µl Glucose-Assay hinzugefügt. Die Proben wurden mit einem Rührstab vermischt und bei Raumtemperatur für weitere 15 Minuten stehen gelassen. Während dieser Zeit wurde noch eine weitere Küvette mit insgesamt 550µl Bidest angesetzt. Nach dieser Inkubation wurden die Proben am Photometer gemessen. Die Referenz wurde gegen Bidest gemessen und die Proben wiederum gegen die Referenz.

2.2.5 Berechnung der ausgewaschenen Stärkemenge

Von den am Photometer gemessenen Extinktionen (E) wurde zunächst der Reagenzienleerwert abgezogen:

Extinktion der Probe: 0,57E
Reagenzienleerwert: 0,54E
0,03E

0,2mg = 1,35E (Stärkeeichreihe)
x = 0,03E (Beispielprobe)
x = 0,03 x 0,2 : 1,35
x = 0,0044mg

Es befinden sich 0,0044mg Stärke in 200µl Probe.

$$\begin{aligned}x &= 10000 \times 0,0044 : 200 \\ &= 0,22\text{mg} \times 2 \\ &= 0,22\text{mg}/10\text{ml Filtrat}\end{aligned}$$

Einwaage der Beispielprobe: 124,79mg

$$124,79\text{mg} = 100\%$$

$$0,22\text{mg} = x$$

$$\begin{aligned}x &= 0,22 \times 100\% : 124,79 \\ &= 0,176\%\end{aligned}$$

In diesem Fall wurden 0,176% Stärke aus 124,79mg Probe herausgewaschen.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

Für diese Versuche wurden Verbundwerkstoffe hergestellt, welche aus einfachen und dreifachen Aktivierungsansätzen aus LSS und Indulin bestanden. Um diese Ansätze herzustellen wurde zuerst die Aktivität der Laccase mit Hilfe des ABTS-Tests bestimmt

Anschließend wurden die Ansätze mit jeweils 8g Wachsmaisstärke und unterschiedlichen Mengen Bidest vermengt und im Trockenschrank getrocknet. Die Stärkeauswaschung erfolgte später nach den Vorgaben des Boehringer-Tests und wurde mit Hilfe einer Stärkeeichreihe berechnet.

2.3.1 Aktivitätsbestimmung nach Gutierrez

Mit der Methode nach Gutierrez wurde für die in den Versuchen verwendete Laccase eine Aktivitätsbestimmung durchgeführt. Die Aktivität wurde jeweils in drei Wiederholungen gegen eine Referenz bei 280nm am Photometer gemessen. Die

Aktivität wurde in Nanokatal (nKat) umgerechnet und der Mittelwert gebildet. Dieser lag im Mittel zwischen 1.000 und 2500nKat/ml (Abb.2.8).

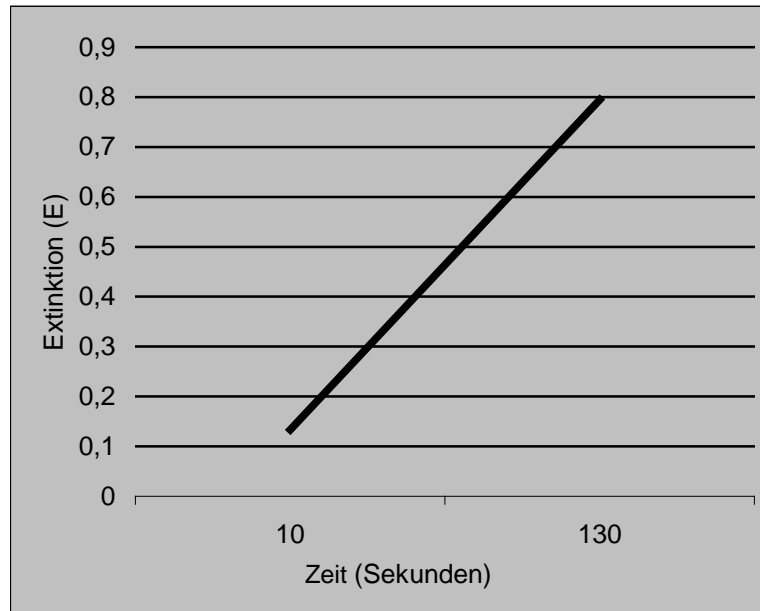


Abb.2.8: Aktivität der Laccase

2.3.2 Ermittlung der Stärkeauswaschung mit Hilfe des Boehringer-Tests

Für den Stärketest wurden einzelne Stücke (100mg) der Stärkeverbundwerkstoffe eingewogen. Diese wurden in Messkolben mit 10ml Bidest für 30 Minuten in ein vorgeheiztes Wasserbad gestellt. Der Kolbeninhalt wurde nach der Entnahme aus dem Wasserbad filtriert. Aus dem Filtrat wurden jeweils 5ml entnommen und mit DMSO und HCl aufgeschlossen. Nachdem der pH-Wert eingestellt worden war, wurde der Kolben aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden jeweils 200 μ l entnommen, in Eppendorfcups mit AGS und Bidest vermengt und zentrifugiert. Aus diesen Ansätzen wurde ein Probavolumen von 50 μ l zusammen mit Glucose-Assay-Reagenz in die vorbereiteten Küvetten pipettiert. Alle Messungen am Photometer erfolgten in drei Wiederholungen, aus deren Ergebnissen der Mittelwert gebildet wurde. Um die Menge der ausgewaschenen Stärke aus den Verbundstoffen zu quantifizieren, wurde eine Stärkeeichreihe erstellt (Abb.2.9).

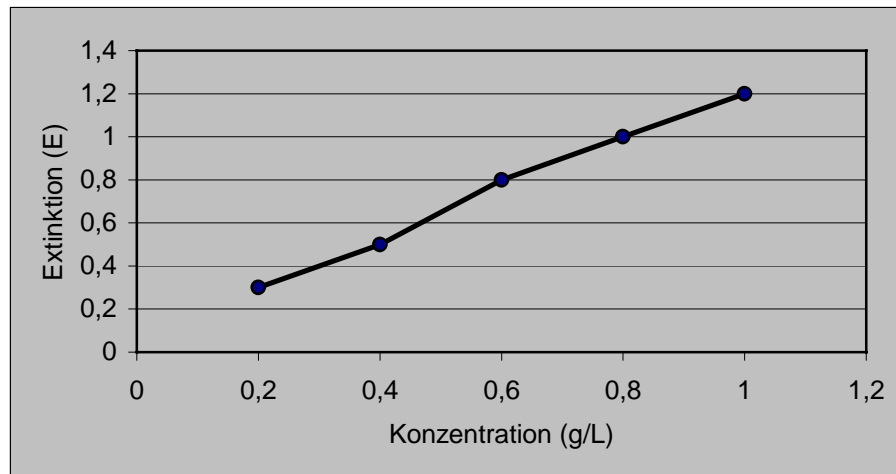


Abb.2.9: Stärkeeichreihe

Aus den gemessenen Extinktionen wurde der Mittelwert gebildet, um mit Hilfe der Stärkeeichreihe die ausgewaschene Stärkemenge zu ermitteln und in Prozentangaben umzurechnen. Die Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet und sind in der folgenden Tabelle (Tab.2.2) aufgeführt.

Tab.2.2: Ergebnisse der Stärkeauswaschung

Ansatz	Reine Wachsmaisstärke	1-fache Menge Ligninsulfonsäure	1-fache Menge Indulin	3-fache Menge Ligninsulfonsäure	3-fache Menge Indulin
Mittelwert (%)	3,6	12,75	0,17	70,81	0,27

Das Resultat dieses Versuchs zeigt, dass die Auswaschung der Ligninsulfonat Proben um ein Vielfaches höher ist als die Auswaschung der Indulinproben. Ligninsulfonat-gebundene Stärke wird zu circa 70% ausgewaschen, was fast gleichbedeutend einer kompletten Löslichmachung ist. Bei den Indulinproben mit wasserunlöslichem Lignin ist folgendes Resultat zu verzeichnen: Es macht keinen Unterschied, ob es sich um eine einfache- oder eine dreifache Menge Indulin handelt. Die Auswaschung erfolgte selbst bei der dreifachen Menge nur zu 0,27%. Damit wurde deutlich weniger ausgewaschen als bei der Kontrolle, welche aus reiner Wachsmaisstärke bestand. Dieses Ergebnis bedeutet, dass die zuvor aufgestellte

Hypothese (siehe Kapitel 2.1.5) nicht falsifiziert werden konnte. Eine Verdreifachung der Indulinmenge macht keinen Unterschied bei der Stärkeauswaschung.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit Daten aus früheren Kartoffelstärkeversuchen (Lütkemeyer, 2002), zeigt sich, dass aus den Indulin-Proben deutlich weniger ausgewaschen wurde. Dieses ist offensichtlich auf den Aufbau der Wachsmaisstärke zurückzuführen, welche fast ausschließlich aus Amylopektin besteht. Das wasserunlösliche Indulin lagert sich auf der Oberfläche des Amylopektins ab und bindet dieses.

Mit diesem Versuch wurde erstmals eine wasserfeste kovalente Bindung von Stärke an Lignin gezeigt. Dies ermöglicht es, wasserfeste biologisch abbaubare Werkstoffe aus Stärke herzustellen. Die Innovation dieses Forschungsansatzes begründet gleichwohl weiteren Forschungsbedarf, um die positiven Möglichkeiten dieser Methode zur industriellen Anwendung weiter zu untersuchen. Vor allem in Zeiten steigender Kritik an herkömmlichen, schlecht umweltverträglichen Verpackungsmaterialien verspricht dieser Ansatz eine ökologisch verträglichere Alternative.

3 Mediatoren

3.1 Einleitung

Die Entfernung des Lignins ist der erste Schritt zur Herstellung von Zellstoff für die Papierindustrie. Ein Großteil des Lignins wird bei der Kochung, der verbleibende Rest mit Hilfe einer Bleiche entfernt. Während bei früheren Bleichmethoden zumeist mit Chlor gearbeitet wurde, werden inzwischen wesentlich umweltfreundlichere Alternativen untersucht. So werden zunehmend biotechnologische Verfahren entwickelt, die auf jeweils vollkommen unterschiedlichen enzymatischen Reaktionen beruhen:

1. Eine Verfahrensweise ist die Behandlung des ungebleichten Zellstoffs mit Hemizellulasen. Dieses Verfahren macht sich die Tatsache zu Nutze, dass im Zellulose-Hemizellulose-Komplex das Lignin an den Hemizelluloseanteil gebunden ist (Viikari et al., 1994). Der unvermeidbare Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, dass sich durch die enzymatische Verdauung die Zellstoffausbeute verringert.
2. Ein anderes Verfahren zur Entfernung des verbleibenden Lignins aus dem Zellstoff ist der Einsatz von oxidativen, ligninabbauenden Enzymen, beispielsweise Ligninperoxidase, Manganperoxidase oder Laccase. Ligninperoxidase und Manganperoxidase können sowohl die phenolischen als auch die nichtphenolischen aromatischen Ringe im Lignin oxidativ abbauen. Sie werden dabei reduziert. Zur Re-Oxidation benötigen sie jedoch Wasserstoffperoxid, eine aggressive und instabile Verbindung. Laccase hingegen kann nur die phenolischen Bestandteile des Lignins abbauen. Das bedeutet, dass Laccase nur etwa 10% der im Lignin enthaltenen Aromaten aufschließen kann. Trotzdem gewinnt sie immer mehr an Bedeutung, da sie lediglich Sauerstoff als Oxidationsmittel benötigt. Um ihre Effizienz zu erhöhen, werden schon seit längerem Versuche mit Mediatoren gemacht, den sogenannten Laccase-Mediator-Systemen.

3.1.1 Wirkungsweise von Laccase-Mediator-Systemen bei der Zellstoffbleiche

Auch aufgrund ökologischer Betrachtungen wird immer stärker nach alternativen Bleichmethoden gesucht, um die traditionelle Chlorbleiche zu ersetzen. Lange war die Rolle des Mediators unklar. Bajpai et al. untersuchten die Oxidation eines Laccase-Mediator-Systems mit Lignin (Bajpai et al., 1999) und unterstellten, dass die in der Abbildung (Abb.3.1) dargestellte katalytische Reaktion den vollständigen oxidativen Weg beschreibt.

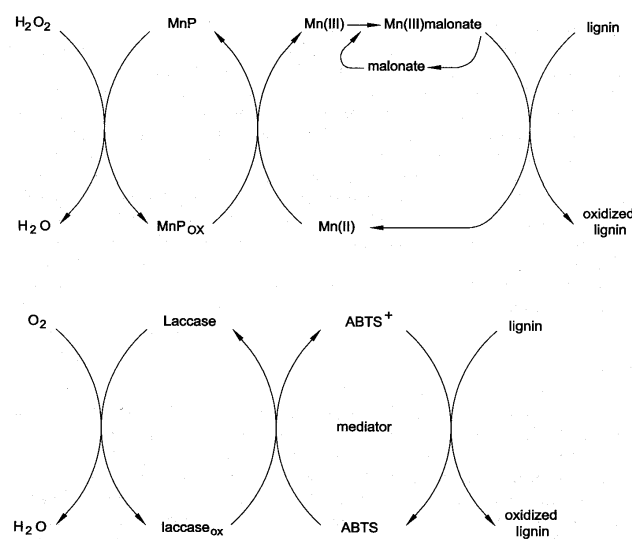


Abb.3.1: Oxidativer Weg der katalytischen Reaktion von Manganperoxidase und Lignin (Bajpai et al., 1999)

Majcherczyk et al. (1999) konnten dies widerlegen. Nach der Theorie des chemischen Gleichgewichts kann es nicht zu dem oben dargestellten Ablauf kommen. Sie konnten zeigen, dass der entscheidende Schritt bei der Mediatorwirkung der Zerfall des ABTS ist (Abb.3.2). Nur durch die Entfernung des Mediators aus der Reaktion kann diese in die gewünschte Richtung gelenkt werden. Mit der Manganperoxidase (Bajpai et al., 1999) gelingt es nur deshalb, da sie ein höheres Redoxpotential als die Laccase hat. Diese Form der Bleiche konnte sich bisher noch nicht durchsetzen, da das größte Problem der Zellstoffindustrie bei der Mediator-unterstützten Bleiche die Zerfallsprodukte der Mediatoren sind, von denen je Tonne Zellstoff mehrere Kilo anfallen.

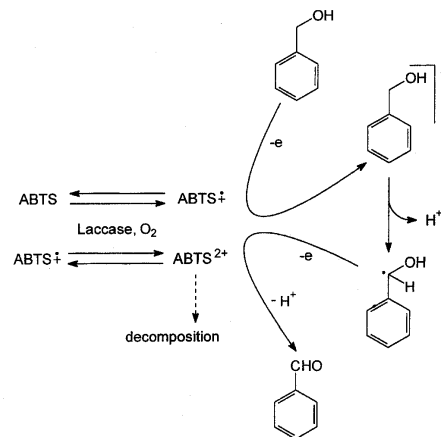


Abb.3.2: Mögliches Reaktionsschema für die Oxidation von aromatischem Alkohol mit $ABTS^{\cdot+}/ABTS^{2+}$ Paar (Majcherczyk et al., 1999)

Inzwischen wurde mehrfach gezeigt, dass der Mediator während dieses Prozesses immer wieder regeneriert werden muss, um eine Effektivität bei der Zellstoff-Delignifizierung zu erreichen (Rocheffort et al., 2002).

Um eine gänzlich chlorfreie Bleiche des Kraftzellstoffs von *Eucalyptus globulus* zu erzielen, wurde die enzymatische Delignifizierung untersucht, welche sich das hohe Redoxpotential thermostabiler Laccase aus dem Pilz *Pycnoporus cinnabarinus* und einen chemischen Mediator (1-Hydroxybenzotriazole) zu Nutze machte. Im Labormaßstab wurden verschiedene Möglichkeiten untersucht, um die Enzymbehandlung in den industriellen Bleichprozess zu integrieren. Die besten Zellstoffeigenschaften wurden durch den Einsatz des Laccase-Mediator-Systems zwischen den Sauerstoffstufen und vor der Chelatbildung im Bleichprozess erreicht, wodurch sich die Delignifizierung verbesserte. Während vor dem Einsatz des Laccase-Mediator-Systems Kappa-Werte um 7 erzielt wurden, lagen die Werte danach bei 5, und die Helligkeit verbesserte sich ebenfalls (Ibarra et al., 2006).

In anderen Studien wurde die Kinetik der Oxidation von 4-Hydroxybiphenyl durch die Laccase des Pilzes *Polyporus pinsitus* in Gegenwart von Methylsyringat untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Oxidationsrate des sonst nur wenig reaktiven Substrats bei der Mediator-Reaktion signifikant anstieg (Bratkovskaya et al., 2006).

Mediatoren aktivierten die Laccase auch gegenüber nichtphenolischen Verbindungen wie beispielsweise Benzyl-Alkohol. Gestützt wurden diese Schlussfolgerungen auf eine Untersuchung der Produktparameter mittels Probennahmen und Messungen der intramolekularen kinetischen Isotopen-Effekte (Barreca et al., 2004).

Laccase-Mediator-Systeme wurden ebenfalls bei der Bleiche von Weizenstrohzellstoff eingesetzt. Diese Behandlung in Kombination mit Xylanasen und anschließender alkalischer Extraktion reduzierte den Ligningehalt auf etwa 60% des Ausgangswertes. Die Enzyme wurden als Vorbehandlung in der normalen Bleichabfolge angewandt. Die Ergebnisse zeigten, dass durch diese Form der Behandlung die Zellstoffe eine bessere Zugfestigkeit und Helligkeit erreichten und der Chlorbedarf gesenkt werden konnte, womit eine Entlastung der Abwässer einherging (Herpoel et al., 2002).

Balakshin et al. (2001) haben mit Hilfe eines Laccase-Mediator-Systems vergleichende Studien über die Kinetik und die Mechanismen der sogenannten „Biobleiche“ gemacht. Bei der Untersuchung von zwei unterschiedlichen Mediatoren fanden sie heraus, dass die optimale Laccasemenge und die optimale Menge N-Hydroxyacetanilide bei 10Units pro Gramm Zellstoff und 0,1mM lagen. Die optimale Reaktionstemperatur lag bei konstant 40°C und einer Laufzeit von 8 Stunden. Zunächst untersuchten sie, inwieweit die Laccase direkten Kontakt mit dem Substrat haben muss, um zu reagieren. Hochmolekulare Modellgemische von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen wurden durch Ankopplung von Pyren an Polyethylenglykol 5000 (PEG) synthetisiert. Um den direkten Kontakt zwischen Substrat und Enzym zu vermeiden, wurde das an das PEG gekoppelte Pyren durch eine Membran von dem Laccase-Mediator-System getrennt. Die niedermolekularen Mediatoren ABTS und 1-Hydroxybenzotriazol, die durch Laccase zu entsprechenden Radikalen oder Kationen oxidiert wurden, durchdrangen die Membran und reagierten mit den Pyren-PEG-Modell-Verbindungen. Die Oxidation dieser Verbindungen resultierte in einer α -Oxidation der Alkyl-Ketten. Identische Reaktionsprodukte erhielt man im gleichen System auch ohne eine trennende Membran (Majcherczyk und Johannes, 2000).

Die Oxidation von polyzyklischen aromatischen Verbindungen wurde in Systemen, welche aus Laccase des Pilzes *Trametes versicolor* und sogenannten Mediator-Verbindungen bestanden, untersucht. Die enzymatische Oxidation von Acenaphthene, Acenaphthylene, Anthracene und Fluorene wurde durch verschiedene Laccase-Substrate (Phenole und aromatische Amine) oder Verbindungen, welche von Weißfäulepilzen produziert wurden, vermittelt. Die besten natürlichen Mediatoren wie Phenol, Anilin, 4-Hydroxybenzoesäure oder 4-Hydroxybenzylalkohol waren so effizient wie die vorher beschriebenen synthetischen

Verbindungen ABTS und 1-Hydroxybenzotriazol. Die Oxidationseffizienz der phenolischen Mediatoren stieg bis zu einem Maximum von 0,9V proportional zu ihrem Redoxpotential an (Johannes und Majcherczyk, 2000).

Die Oxidation von aromatischen und nichtphenolischen Lignin-Modell-Verbindungen durch oxidierte ABTS-Arten wurden weiter untersucht. Das Kation-Radikal und das Dikation, welches aus dem ABTS gebildet wurde, waren beide in der Lage aromatische Alkohole zu Aldehyd zu oxidieren (Abb.3.2). Diese Reaktion endete auf der Aldehyd Ebene. Sowohl das Kation-Radikal als auch das Dikation wirkten in einem Kreislauf als Elektronen-Transfer-Verbindung zwischen der Laccase und dem Alkohol.

Zusätzlich zur Oxidation der primären Benzyl-Hydroxyl-Gruppe war eine Oxidation der sekundären Alpha-Hydroxyl-Gruppe zum Keton durch das Dikation möglich. Alle charakteristischen Eigenschaften dieser Reaktionen deckten sich mit den Ergebnissen der Oxidation, welche durch Laccase des Pilzes *Trametes versicolor* im Beisein von ABTS durchgeführt wurde. Die Abbauprodukte des Dikations allein und ABTS mit Laccase bekräftigten die Annahme, dass das Dikation in das Laccase-Mediator-System involviert ist. Ein Reaktionsmechanismus, basierend auf der Deprotonierung des Alkohol-Kation-Radikals, wurde ebenso beschrieben wie die Tatsache, dass es eine Schlüsselrolle in der irreversiblen Nachfolgereaktion spielte und die treibende Kraft des Prozesses war (Majcherczyk et al., 1999).

3.1.2 Enzymatische Aktivierung der Holzfasern zur Herstellung bindemittelfreier Faserplatten

Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass es allein durch enzymatische Aktivierung von Holzfasern mit Laccase möglich ist, Faserplatten herzustellen, die den geforderten DIN-Normen entsprechen (Kharazipour 1995, Kharazipour et al., 1997).

3.1.3 Zielsetzung

Da dieses Verfahren jedoch sehr lange Inkubationszeiten erfordert, ist zu klären, inwieweit es mit einfachen Methoden wie beispielsweise mit dem Einsatz von Mediatoren, möglich ist, die Wirkung der Laccase zu beschleunigen.

Hierzu wurden im Rahmen dieser Dissertation die folgenden Versuche durchgeführt:

- Untersuchung des Einflusses von Mediatoren auf die Polymerisation des von der Faser abgelösten Lignins.
- Ausarbeitung eines kostengünstigen und schnell durchzuführenden Bonitierungssystems zur Beurteilung der Reaktivität der Fasern und des Reaktionsfortschrittes bei der Inkubation.
- Untersuchung des Einflusses von Mediatoren auf die Spindichte bei einer Inkubation von Holzfasern mit Laccase.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Aktivierung des fasereigenen Lignins durch Zugabe von Mediatoren

3.2.1.1 Material

Mediatoren

Es wurde mit den Mediatoren ABTS, 1-Hydroxybenzotriazol (1-HBT) und 4-Hydroxybenzoesäure (4-HBS) der Firma Fluka gearbeitet.

Holzfasern, Bidest, Schüttelwasserbad, Photometer, Kunststoffküvetten, Trockenschrank, Mikropipetten und -spitzen, Weithals-Erlenmeyerkolben, Pyrexgläser und -ständer, Tischwaage, Analysenwaage, E-cups, Zentrifuge, Spatel, Alufolie, Ultraschallbad, 4-Hydroxybenzoesäure, Mc Ilvaine Puffer, Laccase, 0,1M NaOH, Pyrexgläser und -ständer, Chemikalien/Materialien für den ABTS-Test

3.2.1.2 Methode

Probenansatz:

300mg Holzfasern

3ml Laccase 1492U/ml

3ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5

+ 4-Hydroxybenzoesäure in 3 verschiedenen Konzentrationen:

0,083mg (0,1mM)

0,83mg (1mM)

8,3mg (10mM)

Kontrollansatz ohne Laccase:

300mg Holzfasern

6ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5

+ 4-Hydroxybenzoesäure in 3 verschiedenen Konzentrationen:

0,083mg (0,1mM)

0,83mg (1mM)

8,3mg (10mM)

Kontrollansatz ohne Mediator:

300mg Holzfasern

3ml Laccase 1492U/ml

3ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5

Rechnung:

Flüssigkeitsvolumen in der Probe: 6ml

138g = 1M/1000ml

xg = 0,1M/1000ml

⇒ 13,8g = 0,1M/1000ml

⇒ xg = 6ml

⇒ x = 13,8 x 6 : 1000 = 0,083g/0,1M

⇒ 0,083mg/0,1mM

⇒ 0,83mg/1mM

⇒ 8,3mg/10mM

Die Laccase wurde für die Versuche aufgetaut, um danach mit Hilfe des ABTS-Tests eine Aktivitätsbestimmung durchzuführen. Fasern, Mc Ilvaine Puffer pH 4,5, die vorbereiteten Verdünnungsstufen (0,1mM, 1mM, 10mM) der 4-HBS sowie die entsprechenden Kontrollansätze wurden in die Weithals-Erlenmeyerkolben gegeben. Die Kolben wurden in das bereits vorgeheizte Schüttelwasserbad gestellt und die Laccase hinzupipettiert. Von jeder Verdünnungsstufe des Mediators sowie jeder Kontrollvariante wurden 5 Kolben vorbereitet, um sie nach 0h, 6h, 12h, 24h und 48h zur Probennahme aus dem Wasserbad zu entfernen.

Bei der Probennahme wurde jeweils ein Kolben jeder Konzentration und Kontrollvariation entnommen. Aus den Überständen wurden 200µl abpipettiert und mit jeweils 2ml 0,1M NaOH in ein Pyrexglas überführt, um sie für die HPLC aufbereiten zu können.

Die Fasern wurden anschließend im Trockenschrank bei 45°C getrocknet, auf Zimmertemperatur heruntergekühlt und zur Präparation für die Rasterelektronenmikroskopie verwendet.

3.2.2 Aufarbeitung der Proben für die HPLC

3.2.2.1 Material

Pipetten und -spitzen, Reagenzgläser, Pyrexgläser und -ständer, Horizontalschüttler, Zentrifuge, Vials und -ständer, Deckel, Vakuumtrockenschrank, Abzug, 0,1M NaOH, 50mM TDMA (N-methyl Trioctylammoniumchlorid) in Ethylacetat, 1%ige Natriumchlorid Lösung (NaCl)

3.2.2.2 Methode

Aus den Überständen der inkubierten Fasern wurden 200µl des Probevolumens in Pyrexgläser mit jeweils 2ml 0,1M NaOH pipettiert. Hinzu kamen jeweils 2ml Ethylacetat. Dieses erfolgte für jede Probe in drei Wiederholungen.

Die Pyrexgläser wurden verschlossen für 30 Minuten mit dem Horizontalschüttler vermengt, um anschließend 10 Minuten zentrifugiert zu werden.

In jedem Pyrexglas bildeten sich dabei zwei Phasen. Von dem Überstand des Ethylacetats wurde 1ml abgenommen und zusammen mit 1ml NaCl in ein neues Pyrexglas überführt. Dem NaCl kam dabei eine Auswaschfunktion, mit dem Ziel zu, die restliche noch vorhandene NaOH an sich zu binden.

Die Proben wurden abermals für 15 Minuten geschüttelt und anschließend für 10 Minuten zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation hatten sich in den Gläsern erneut zwei Phasen gebildet. Mit einer Pipette wurde der untere Teil abgesaugt und der verbleibende Teil ein letztes Mal mit 1ml NaCl versetzt. Daraufhin wurden die Proben nochmals geschüttelt und zentrifugiert.

Von der oberen Phase wurden anschließend 200µl pipettiert und in Vials überführt.

Die noch geöffneten Vials wurden über Nacht im Vakuumtrockenschrank zur Trocknung eingedampft und umgehend verschlossen, damit die Proben keine Feuchtigkeit mehr ziehen konnten. Damit waren die Proben bereit für eine Messung in der HPLC.

3.2.2.3 Aufbau und Methodik der HPLC

HPLC ist die Abkürzung für Hochleistungs-Säulen-Flüssig-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography).

Flüssigchromatographie bedeutet die Verwendung eines Lösemittels oder Lösemittelgemisches zum Lösen der Probe. Diese wird mit Hilfe einer mobilen Phase durch das chromatographische System transportiert und trennt sich an einem Trägermaterial in die einzelnen Komponenten auf.

Die HPLC besteht aus einem chromatographischen System, das aus Versorgungseinheit, Laufmittelreservoir und Pumpe, Dosiervorrichtung (Injektionsventil), Vor- und Trennsäule, Detektor und Auswertsystem sowie einer Fraktioniereinrichtung besteht.

Kernstück dieser Apparatur ist die chromatographische Säule, in welcher die Proben in ihre Komponenten aufgetrennt werden. Sie besteht aus einem Rohr, welches an beiden Enden mit porösen Fritten oder Sieben durch entsprechende Anschlüsse verschlossen ist. Die Säule enthält das Säulenbett, das aus einem dichten Verband poröser Teilchen (Gelkügelchen) besteht, um ein hohes Verhältnis von Oberfläche

zum Volumen zu erhalten. Alle anderen Vorrichtungen dienen der Kontrolle der chromatographischen Bedingungen und zur Erfassung und Auswertung der Daten.

Die Probe wurde mittels einer Dosiervorrichtung portionsweise aufgegeben und mit Hilfe des Laufmittels in einer konstanten Geschwindigkeit durch die Säule transportiert. Bei ihrem Transport strömte sie durch das Volumen zwischen den Gelkügelchen. Die Auftrennung des Gemisches in seine einzelnen Komponenten erfolgte indem große Moleküle ungehindert durch das Laufmittel wanderten, während die kleineren Moleküle eine längere Zeit benötigten.

Bei der sogenannten Ausschlusschromatographie erfolgte die Elution von gelösten Substanzen nach abnehmendem Molekulargewicht, basierend auf sterischen Ausschlussmechanismen. Entscheidend für die Trennung ist dabei das Trägermaterial in der Säule, das eine geeignete Porengröße aufweisen muss. Das Laufmittel, das in diesem Fall die Aufgabe eines Lösemittels hatte, sollte so gewählt werden, dass keine Adsorption der Probensubstanz an der Oberfläche des Trägers erfolgt.

Bei der für unsere Versuche verwandten HPLC-Methode handelt es sich um die Gel-Permeationschromatographie (GPC). Diese ist eine spezielle Art der Säulenchromatographie, die für die Analyse von nicht derivatisierten Ligninproben benötigt wird. Die Komponenten des Gemisches werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße getrennt. Die stationäre Phase besteht aus Perlen des Stoffes Styrenedivinylbenzol, das im gequollenen Zustand ein Kanalnetz mit unterschiedlich großen Durchmessern bildet. Als Laufmittel wird Tetrahydrofuran (THF) eingesetzt. Wenn das Substanzgemisch am Säuleneingang aufgegeben und mit Hilfe des Laufmittels durch die stationäre Phase gespült wird, dringen kleine Moleküle aufgrund der Brownschen Molekularbewegung durch die Poren in die Kanäle des Gels ein und werden so länger in der stationären Phase gehalten als die großen Moleküle, die aufgrund ihrer Größe nur an der Oberfläche der Gelperlen vorbeiwandern können. Die Polydispersität gibt dabei an, wie unterschiedlich die Gewichte verteilt sind.

THF ist ein gering viskoses Lösungsmittel, das bei einem geringen Druck eine hohe Stabilität in der stationären Phase aufweist und gute chromatographische Ergebnisse erzielt. Es hat eine Siedetemperatur von 66°C und die Eigenschaft Peroxide zu bilden. Vor Gebrauch muss es jedoch peroxidfrei sein, da Peroxide explosiv sind und zudem die Säulen der HPLC oxidativ zerstören können. Zusätzlich können sie durch

Oxidation das Molekulargewicht der Proben verändern und damit die Ergebnisse verfälschen. Um dies zu verhindern ist THF mit einem Stabilisator versetzt. Damit dieser nicht die zu messende Substanz in ihren Messbereichen überdeckt, wird vor der Messung das THF destilliert, um bei der HPLC Messung mit reinem THF arbeiten zu können.

Die Probe wurde auf diese Weise in Abhängigkeit der unterschiedlichen Molekülgrößen in ihre Komponenten aufgetrennt. Speziell bei Lignin trat jedoch das Problem auf, dass es sich chromatographisch sehr unterschiedlich verhält. Dies wurde bereits anhand der herkömmlichen Methoden festgestellt und deshalb mit der Veränderung einiger Parameter experimentiert. Es stellte sich heraus, dass einige der Methoden zwar spezifische Verhaltensweisen minimieren konnten, jedoch immer wieder andere Nachteile mit sich brachten. Keine dieser Methoden war somit universell einsetzbar. Erst Majcherczyk und Hüttermann (1997) haben eine neue Methode entwickelt, die sich den Ionen-Paareffekt von Lignin und quaternären Aminen (QAM) zu Nutze machten. So konnten schließlich viele der auftretenden Probleme überwunden und die Aufarbeitung der Proben vereinfacht werden.

Um die Proben korrekt auswerten zu können, mussten die bekannten Standards vorab gemessen werden. An ihnen war abzulesen, ob die Trenngenaugigkeit der Säule ausreichte. Ferner konnte allein anhand der Peaks der Stoff nicht identifiziert werden. Im Vergleich mit den Standards konnte die verwendete Software jedoch berechnen, welche Molekülgröße zu welcher Zeit eluiert wurde. Die Molekülgröße war somit eine Funktion der Zeit. Darüber hinaus konnte anhand der Peakhöhe, durch Integration der optischen Dichte über die jeweilige Zeit, der relative Anteil am Molekulargewicht errechnet werden:

$$PD = M_w/M_n \quad (\text{Polydispersität})$$

$$M_n = \sum x_i/n \quad (\text{Zahlenmittel})$$

$$M_w = \sum x_i^2/\sum x_i \quad (\text{mittlere Molekulargewichtsverteilung})$$

3.2.3 Untersuchung der Proben mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahmen erfolgten mit dem SEM 515 von Philipps. Die Präparate wurden auf einen Objektträger geklebt und mit Gold bedampft. Der Objektträger mit dem Präparat wurde in die Aufnahme am Objektträgertisch gestellt, welcher sich von außen über Stellschrauben drehen und neigen ließ. Nachdem die Kammer verriegelt worden war, wurde ein Vakuum erzeugt und gleichzeitig die Kühlung aktiviert. Nun konnte die Kathodenspannung langsam auf 19,9kV erhöht werden. Die Kühlung des Gerätes erfolgte während des Betriebes mit flüssigem Stickstoff. Mit einer an das Rasterelektronenmikroskop montierten Spiegelreflexkamera wurden die erzeugten Bilder abfotografiert. Dazu wurde ein 36er Kodak Farbdiafilm mit 200ASA (Elite Chrom 200) benutzt.

Die Faserproben, welche im Trockenschrank getrocknet und im Exikkator abgekühlt worden waren, wurden von Herrn Konrad Wehr, Institut für Forstbotanik der Georg-August-Universität Göttingen, präpariert. Dazu wurden sie mit elektrisch leitendem Klebstoff auf spezielle Trägerplatten aufgebracht. Die Präparate wurden mit Gold bedampft und am Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Aufnahmen der Faserproben wurden mit einer 655fachen Vergrößerung gemacht.

3.2.4 Optische Bonitierung der Ablösung des fasereigenen Lignins

3.2.4.1 Material

Schere, Zirkel, Fotopapier, Klebstoff, vorhandene REM-Aufnahmen verschiedener Holzfaserproben

3.2.4.2 Methode

Mit einem Zirkel wurden auf den REM-Aufnahmen der Holzfasern verschiedene Hoftüpfel erfasst und mit Hilfe einer Schere ausgeschnitten. Diese Hoftüpfel sind in den Tracheiden der Koniferen zu finden und dienen dem horizontalen

Wassertransport. Durch die Zerkleinerung liegen sie frei und wurden mit Hilfe der REM-Aufnahmen erfasst. Die abgebildeten Hoftüpfel wurden bestimmten Kategorien zugeordnet und entsprechend in eine vorbereitete Tabelle geklebt. Für alle weiteren Versuche sollte die Tabelle als Vorlage dienen, um die Mediator-Wirkungs-Effizienz optisch erfassen zu können.

3.2.5 Elektronenspinresonanz-Bestimmung der Faserproben

3.2.5.1 Material

Holzfasern, Wasserbad, Mikropipetten und -spitzen, Weithals-Erlenmeyerkolben, Waage, Spatel, Laccase, Mc Illvaine Puffer pH 4,5, HBT, HBS, ABTS, Materialien/Chemikalien für den ABTS-Test, Glasküvetten, Gefrierschrank

3.2.5.2 Methode

Probenansatz:

300mg Holzfasern

3ml Laccase

3ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5

+ je 8,3mg der verschiedenen Mediatoren

Kontrollansatz:

300mg Holzfasern

3ml Laccase

3ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5

Rechnung:

Flüssigkeitsvolumen in der Probe: 6ml

$$138g = 1M / 1000ml$$

$$xg = 0,1M / 1000ml$$

$$\Rightarrow 13,8g = 0,1M / 1000ml$$

$$\Rightarrow xg = 6ml$$

$$\Rightarrow x = 13,8 \times 6 : 1000 = 0,083g / 0,1M$$

$$\Rightarrow 8,3mg / 10mM$$

Die Laccase wurde zunächst für die Versuche aufgetaut, um mit Hilfe eines ABTS-Tests eine Aktivitätsbestimmung durchführen zu können. Danach wurden Fasern, Mc Illvaine Puffer pH 4,5 und die vorbereiteten Einwaagen der drei Mediatoren, ABTS, 1-HBT und 4-HBS in Weithals-Erlenmeyerkolben gegeben. Parallel dazu wurde eine Kontrolle ohne Mediatoren angesetzt. Die Kolben wurden in das bereits vorgeheizte Schüttelwasserbad gestellt und die Laccase hinzupipettiert. Die Kolben wurden zur Probennahme nach 6 Stunden aus dem Wasserbad entfernt.

Die Fasern wurden mit Hilfe eines Spatels ausgedrückt und der Überstand verworfen. Ein Teil der Fasern wurde vorsichtig in Glasküvetten überführt, welche zur Gewichtsbestimmung gewogen und dann tiefgefroren wurden. Für die Elektronenspinresonanz (ESR)-Bestimmung wurden diese Proben an die Universität des Saarlandes, Homburg, in die Abteilung für Biophysik zu Händen Herrn Prof. Dr. Jürgen Hüttermann und Herrn Dr. Kappl geschickt, und dort mit einem Bruker ESP 300E gemessen.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

Für die Versuche wurden mehrere Aktivierungsansätze untersucht. Die Variation war die Zugabe des Mediators 4-HBS in Konzentrationen von 0,1mM, 1mM und 10mM. Das Fasermaterial wurde in Weithals-Erlenmeyerkolben eingewogen und zusammen mit den Aktivierungsansätzen für mehrere Stunden zur Inkubation im Wasserbad belassen. In regelmäßigen Abständen wurden Proben für die HPLC entnommen.

Einige Einzelproben wurden am REM untersucht. Um die Wirkungsweise der Mediatoren optisch und quantitativ zu erfassen, wurde eine Bestimmungstabelle

erstellt, die zur Auswertung der REM-Aufnahmen herangezogen wurde. Für die ESR-Messungen wurde Fasermaterial mit unterschiedlichen Mediatoren umgesetzt.

3.3.1 Molekulargewichtstandards

Die Kolben wurden stündlich aus dem Wasserbad entnommen und die Überstände der Faserproben für die HPLC-Messung aufgearbeitet. Abb.3.3 und 3.4 zeigen die typische Trennung von Molekulargewichtsstandards aus Polystyrol.

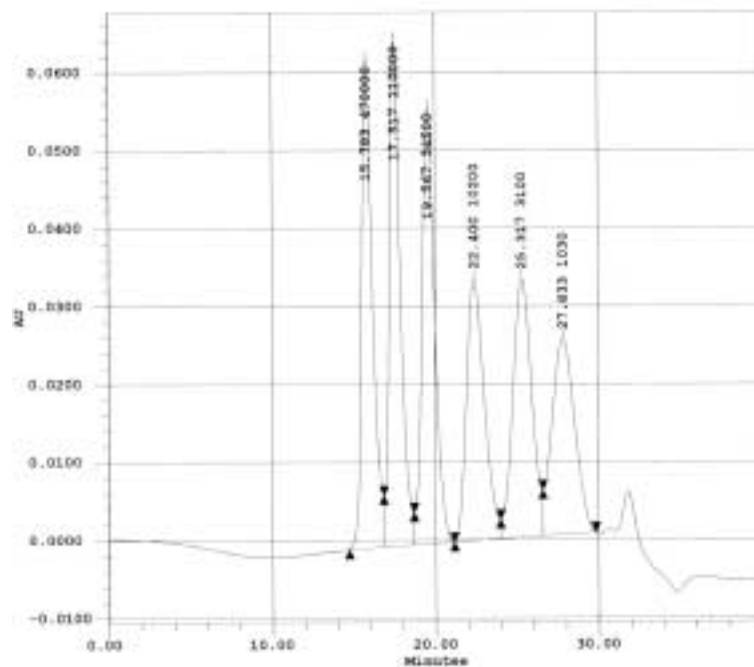


Abb.3.3: Standard 1

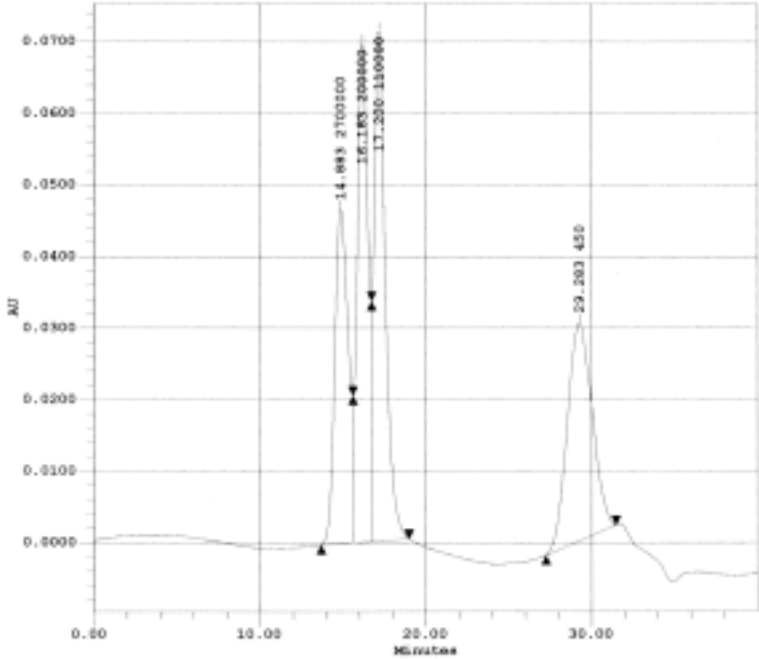


Abb.3.4: Standard 2

3.3.2 Chromatogramme der Proben

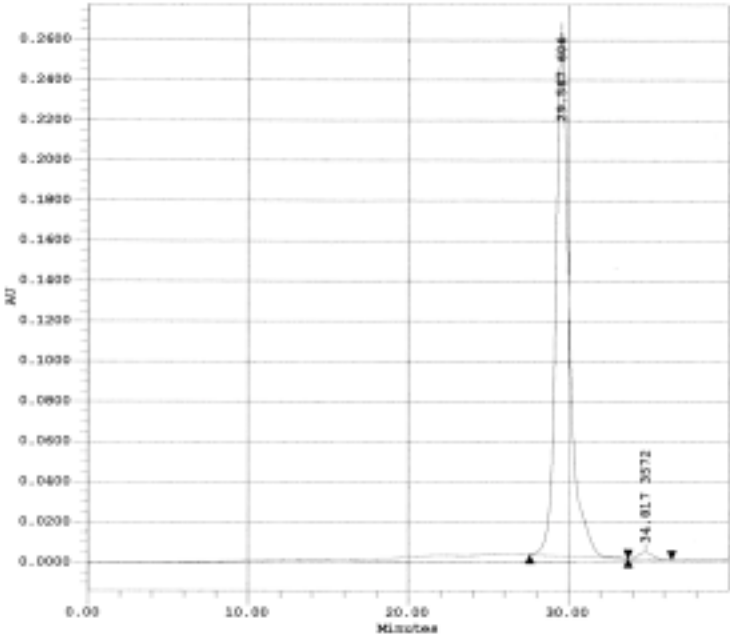


Abb.3.5: Chromatogramm einer Faserprobe, Kontrolle ohne Laccase, 6h, 1mM 4-HBS

Bei den Proben, in Anwesenheit von Laccase während der Inkubation, wurde kein Lignin abgelöst, sondern mit Hilfe der HPLC nur niedermolekulare Substanz nachgewiesen.

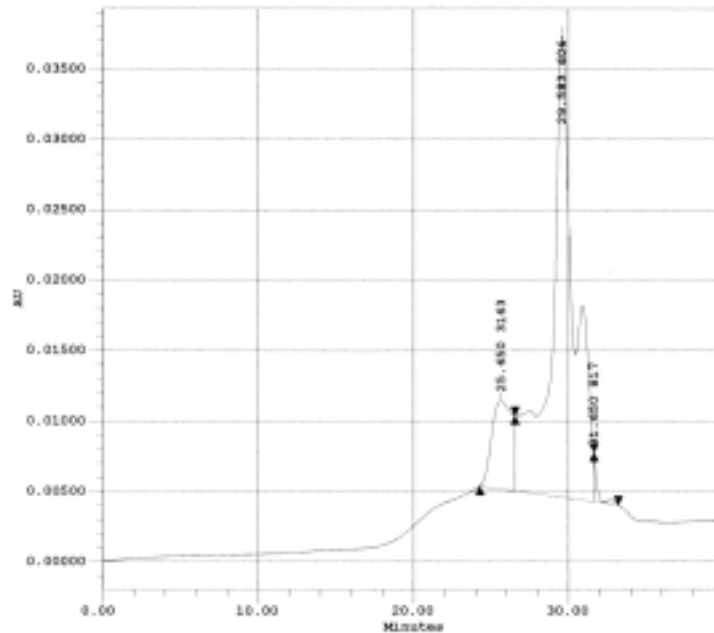


Abb.3.6: Chromatogramm einer Faserprobe,
Kontrolle mit Laccase, ohne 4-HBS, 6h

Bei der Inkubation der Fasern mit Laccase wurde Lignin in deutlichen Mengen abgelöst. Dieses Ergebnis wurde bereits von Kharazipour (1995) gezeigt. Bei einer Verlängerung der Inkubationszeit wäre mehr und höhermolekulares Lignin von der Faser abgelöst worden.

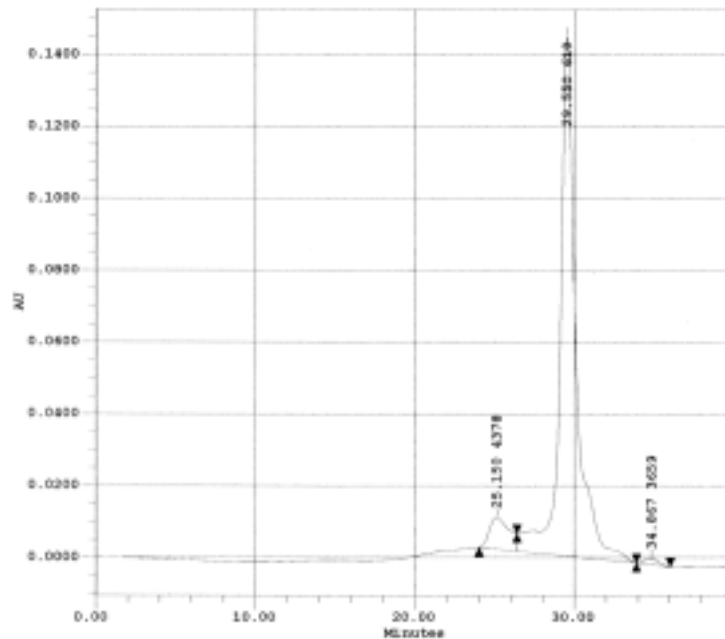


Abb.3.7: Chromatogramm einer Faserprobe
mit Laccase, 6h, 1mM 4-HBS

Bei der gemeinsamen Inkubation von Laccase und Mediator stellte sich das unerwartete Ergebnis ein, dass weniger Lignin von der Faseroberfläche abgelöst wurde. Hier hat sich gezeigt, dass der Mediator die Ligninablösung an der Oberfläche und die Polymerisation bremst. Es kann daher angenommen werden, dass der Zusatz von Mediatoren eher die Aktivierung der Ligninmoleküle auf der Faseroberfläche bewirkte als deren Ablösung.

3.3.3 Tabelle zur Bonitierung der Mediatorwirkung

Um die für die Herstellung von Faserplatten durch enzymatische Aktivierung der Faseroberfläche relevanten Prozessparameter zu optimieren, erschien es wünschenswert, eine Methode zur Verfügung zu haben, mittels derer ohne großen technischen Aufwand eine einfache Beurteilung der Enzymwirkung auf die Fasern möglich ist.

In Versuchsreihen mit relativ geringer Probenzahl, die im Rahmen der Ausbildung durch Prof. Hüttermann durchgeführt wurden, hatten Dr. Sharma und Dr. Rathore festgestellt, dass es durch okulare Beurteilung der Faseroberfläche im

Rasterelektronenmikroskop möglich sein sollte, diese Effekte mit geringem Aufwand semiquantitativ zu erfassen (Sharma und Rathore, 2001). Dabei erschien die Morphologie der Hoftüpfel als ein Indikator der Enzymwirkung besonders geeignet zu sein.

Es wurde daher eine Tabelle erstellt (Abb.3.8), mit deren Hilfe die Wirkung der Mediatoren rein optisch erfasst werden sollte. Untersucht wurden mit einem Laccase-Mediator-System behandelte Holzfasern. Der Grad der Freilegung der sich auf den Holzfasern befindlichen Tüpfel wurde in Kategorien eingeteilt. Anhand der Kategorien sollte bei weiteren Versuchen eine Aussage über die Wirkungsweise der Mediatoren gemacht werden.


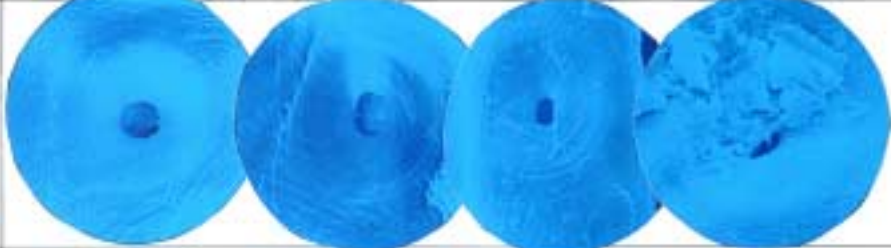




Typ	Merkmale	Beispiele
1	Tüpfel lassen sich erkennen, Ligninschicht vollständig geschlossen, kein Hof erkennbar	
1	Tüpfel erkennbar, Poren kaum noch bedeckt, Höfe noch nicht erkennbar	
1	Tüpfel klar erkennbar, Pore teilweise freigelegt, zum Teil noch ligninverkrustet, Höfe sind als leichte Vertiefungen erkennbar	
4	Tüpfel klar erkennbar, Pore freigelegt, Höfe sind als leichte Vertiefungen erkennbar	
3	Tüpfel klar erkennbar, Pore teilweise freigelegt, zum Teil noch ligninverkrustet, Höfe sind als Vertiefungen erkennbar	
6	Tüpfel klar erkennbar, Pore vollständig freigelegt, Höfe sind als Vertiefungen erkennbar	

Abb.3.8: Tabelle zur Bonitierung der Hoftüpfel

3.3.4 REM-Aufnahmen der Faserproben

Nach Erstellung der Fasertabelle wurden zahlreiche Inkubationen sowohl mit und ohne Enzym als auch mit und ohne Zusatz von Mediatoren gemacht.

Dabei zeigte es sich, dass die Morphologie der Faseroberfläche zu unterschiedlich war, als dass man sie als geeigneten Indikator für eine erfolgreiche Prozessoptimierung verwenden konnte. Dies wird bei einem Vergleich der Abb.3.9 und Abb.3.10 exemplarisch deutlich.

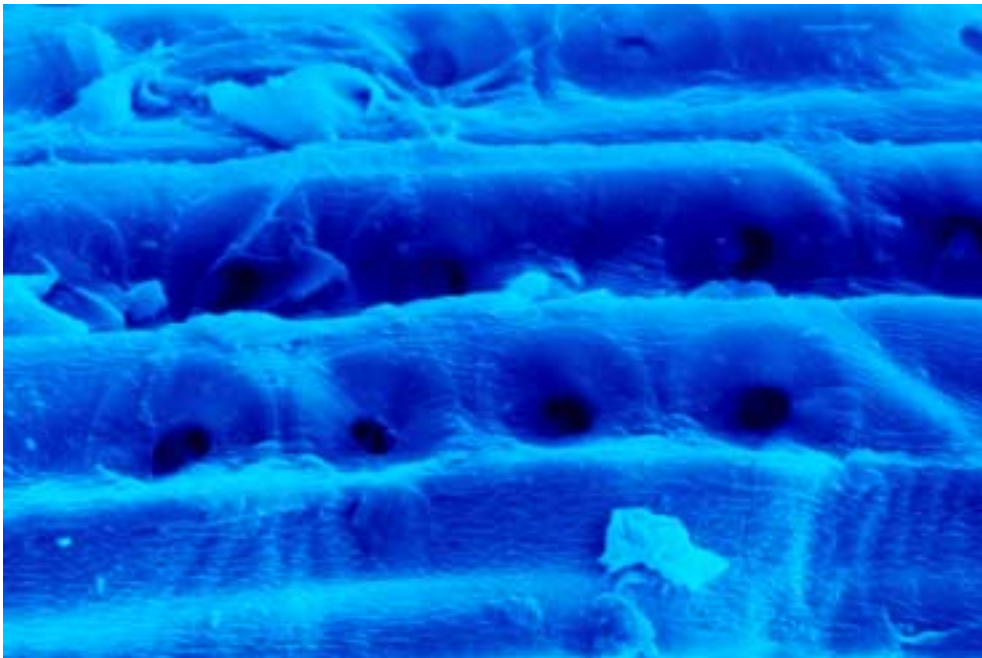


Abb.3.9: Mikroaufnahme nach 0h, 10mM 4-HBS

In Abb.3.9, einer Nullprobe, sind im oberen Bildabschnitt Hoftüpfel zu sehen, die – erwartungsgemäß - völlig mit Lignin beschichtet sind, während in unmittelbarer Nachbarschaft Hoftüpfel zu sehen sind, die „bereits“ vollständig freigelegt sind.

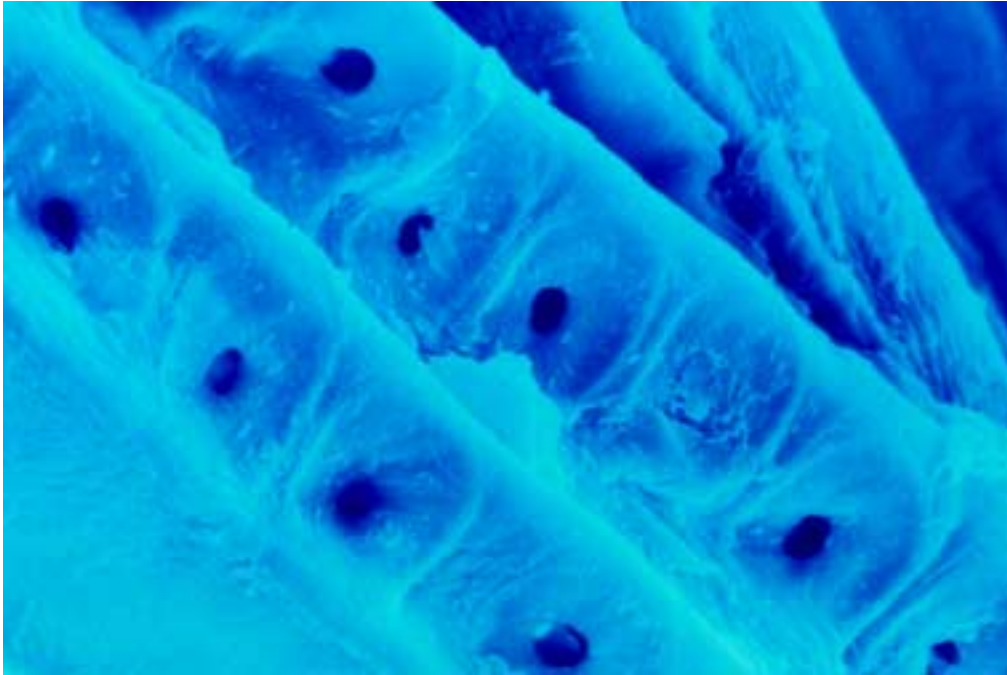


Abb.3.10: Mikroaufnahme der Fasern nach 48h, 10mM 4-HBS

Nach 48h Inkubation stellte sich das Ergebnis bei einer hohen Mediatorkonzentration ähnlich dar. Die mit Lignin verklebten Hoftüpfel waren in unmittelbarer Nachbarschaft von bereits freiliegenden Tüpfeln lokalisiert.

So war es nicht möglich, die Reaktion von Enzym und Faseroberfläche mit dieser relativ einfachen Methode zu verfolgen.

3.3.5 Elektronenspindichte der Proben

Um die Wirkung der Inkubation mit Mediatoren auf die Chemie des Lignins der Faseroberfläche zu verfolgen, wurden Messungen der Elektronenspindichte durchgeführt (Abb.3.11).

Die Fasern wurden insgesamt 6 Stunden mit der gleichen Menge Laccase, jedoch unterschiedlichen Mediatoren inkubiert, danach in Glasküvetten überführt und gemessen.

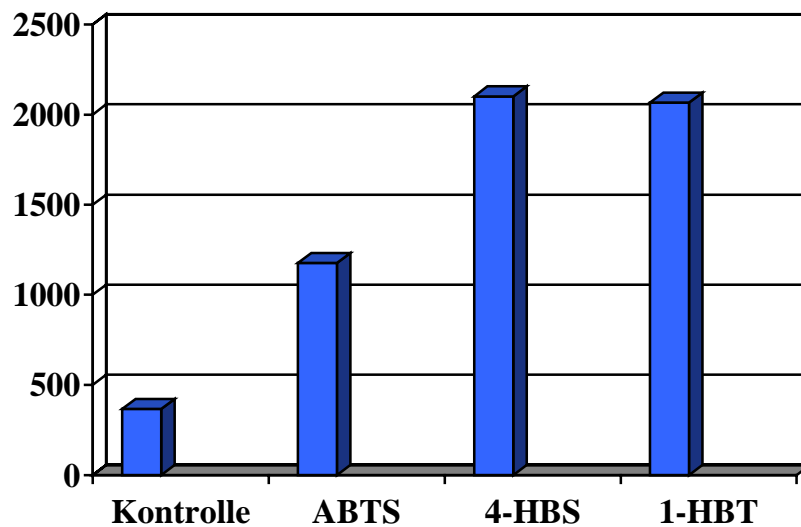


Abb.3.11: Elektronenspindichte der Phenoxyradikale von mit Laccase und Mediatoren inkubierten Holzfasern

Die Fasern, welche 6 Stunden mit den Mediatoren ABTS, 1-HBT und 4-HBS in der Konzentration 10mM inkubierten, zeigten gegenüber der Kontrolle eine massive Erhöhung der Spindichte der Phenoxyradikale. Die Spindichte von ABTS war doppelt so hoch wie die von Fasern, die nur mit Laccase inkubierten. Die Mediatoren 4-HBS und 1-HBT erhöhten die Spindichte auf fast den doppelten Wert im Vergleich zu ABTS.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die für die Verklebung relevante Wirkung von Laccase auf das Lignin der Faseroberfläche wohl nicht hauptsächlich darauf beruht, dass das dort durch die Zerfaserung freigesetzte Mittellamellenlignin in Lösung geht. Die gesteigerte Reaktivität der Faseroberfläche durch die erhöhte Dichte der Phenoxyradikale ist vielmehr der wichtigere Effekt.

Inzwischen läuft, auf der Basis der hier gezeigten Vorversuche, im Forstbotanischen Institut der Universität Göttingen hierzu ein eigenes Forschungsprogramm.

4 Fasern

4.1 Einleitung

Die Herstellung von faserverstärkten Verbundstoffen weist gegenüber der von reinen Werkstoffen deutliche Vorteile auf. Faserverstärkte Verbundwerkstoffe erhalten ihre Druckfestigkeit durch Kunststoff und ihre Zugfestigkeit durch die verwendeten Fasern. Vorbild der faserverstärkten Kunststoffe ist die pflanzliche Zellwand. Inzwischen werden unterschiedliche Ansätze verfolgt und verschiedene Fasern eingesetzt. Die derzeit am häufigsten eingesetzte Faser ist E-Glas. Auf diese Fasermatrix wird der Kunststoffanteil entweder in situ einpolymerisiert oder als flüssiger Kunststoff aufgebracht, der nach der Abkühlung eine mehr oder weniger gute Verbindung mit der Fasermatrix eingeht.

Nachteil der glasfaserverstärkten Kunststoffe ist jedoch, dass diese nicht biologisch abbaubar sind und nur als Sondermüll entsorgt werden können. Daher werden inzwischen Versuche mit Naturfasern wie Hanf, Sisal, Flachs und Ramie gemacht, welche ähnliche Dehnungseigenschaften, Reißlängen und vergleichbare technische Eigenschaften besitzen (Abb.4.1).

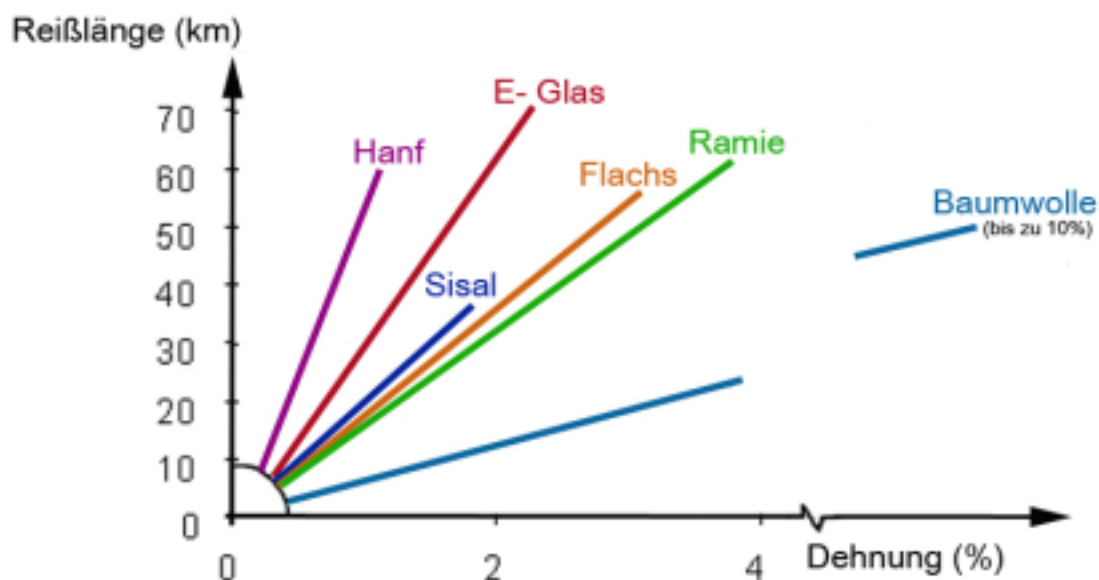


Abb.4.1: Dehnungseigenschaften verschiedener Fasern

Wichtig für die Herstellung dieser Verbundstoffe ist der Vergleich zwischen technisch hergestellten und natürlichen Fasern. Sogenannte lignozelluläre Fasern werden

inzwischen verstärkt für die thermoplastische Herstellung von Verbundstoffen eingesetzt.

Für den industriellen Einsatz wurden diese Fasern bislang in situ aufpolymerisiert, um eine vergrößerte Reaktionsoberfläche zu schaffen. Aufgrund der großen Reaktionsoberfläche ergaben sich gute technische Eigenschaften, insbesondere bessere Verstärkungs- und Versteifungseffekte sowie eine verbesserte Querkzugfestigkeit. Wichtig bei der Herstellung war ebenfalls eine gute Durchdringung der Fasern mit dem flüssigen Kunststoff, damit bei der Aushärtung eine hohe Druckfestigkeit erreicht werden kann. In einer Vielzahl von Versuchen wurde untersucht, welche Fasern mit welchem Polymer in Kombination mit aktiviertem Lignin optimal genutzt werden können.

Bei den Versuchen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Zellulosefasern gearbeitet, die aufgrund ihres Oberflächenlignins optimal für die Versuche geeignet waren. Für die Herstellung der faserverstärkten Verbundwerkstoffe werden unterschiedliche Verfahren angewendet. Diese unterschiedlichen Methoden sollen im folgenden vorgestellt werden. Ein Verfahren ist das Spritzgussverfahren, bei dem Fasern mit anderen Komponenten plastifiziert werden. Beim thermoplastischen Verfahren werden die Fasern mit flüssigem Kunststoff durchtränkt und erstarren. Ein weiteres Verfahren ist die Herstellung von glasfaserverstärkten Kunststoffen, welche in situ aufpolymerisiert werden. Die Monomere werden dazu auf einen Kern aus Glasfasern aufgebracht und polymerisieren aus. Da Glas inert ist, entsteht bei diesem Verfahren keine kovalente Verbindung zwischen Kunststoff und Glasfaser.

4.1.1 Herstellung faserverstärkter Verbundstoffe mit Hilfe des Spritzgussverfahrens

Versponnene Zellulosefasern aus Viskose, Lyocell und Carbamat werden benutzt, um thermoplastische Grunderzeugnisse wie Polypropylen (PP), Polyethylen (PE) und hoch beanspruchbares Polystyrol (HIPS), Polymilchsäure (PLA) oder ein thermoplastisches Elastomer zu verstärken. Bei allen Erzeugnissen wird ein gewisser Versteifungseffekt beobachtet. Im Fall von Polypropylen versprechen Lyocellfasern erhöhte Steifheit und eine erhöhte Verformungstemperatur. Eine Kombination der Faserarten führt zu einem ausgewogenen Profil des Verbundmaterials. Die Variante

mit Polyethylen war derjenigen mit Polypropylen sehr ähnlich. Bei dem hoch beanspruchbaren Polystyrol stiegen hauptsächlich die Festigkeit und die Steifheit an, während sich bei dem thermoplastischen Elastomer das Eigenschaftsprofil vollständig veränderte. Mit der Polymilchsäure präsentierte sich ein biogener und biologisch abbaubarer Verbund mit exzellenten mechanischen Eigenschaften (Ganster und Fink, 2006).

Mit Hilfe des Spritzgussverfahrens wird außerdem ein Verbundmaterial aus Polystyrol, lignozellulären Hanfspänen und einem 15%igen Anteil aus Schilfstroh hergestellt. Die mechanischen Eigenschaften dieses Verbundmaterials zeigen ein akzeptables Materialverhalten gegenüber den Glasfaserverbundstoffen. Die Materialeigenschaften beider Verbundstoffe sind einander ähnlich und weisen Unterschiede von weniger als 10% auf. Dieselbe Tendenz erhält man bei den spezifischen mechanischen Eigenschaften. Des Weiteren werden die Hanfspäne zuerst einem Refining-Prozess unterworfen (physikalische Modifikation) und später mit einem Alkylketenedimer (AKD) chemisch behandelt, um die mechanische Bindung und die Bindungsfähigkeit mit der Matrix zu verbessern. Beide Behandlungen erhöhen die mechanischen Eigenschaften der Hanf-Span-Verbundstoffe (Vilaseca et al., 2004).

4.1.2 Thermoplastische Herstellung faserverstärkter Verbundstoffe

Krump et al. (2006) untersuchten den Effekt von Plasmabehandlungen auf die Bindung von Polyethyleneterephthalate (PET) und einer Gummi-Matrix. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie und der Rasterkraftmikroskopie wurden morphologische Veränderungen aufgrund der Plasmabehandlung untersucht. Benetzbarkeitsanalysen bedienten sich eines Oberflächenspannungsevaluationssystems (SEE-System). Dieses zeigte eine verbesserte Benetzbarkeit mit einer polaren Flüssigkeit gegenüber den plasmabehandelten Fasern. Die behandelten Fasern zeigten eine neue lamellare Kristallinität, die durch einen neuen Schmelzpunkt bei der Untersuchung mit dem Differenzial-Scanning-Kalorimeter nachgewiesen wurde. Weitere Arbeiten untersuchten die Perspektiven der Nutzung lignozellulärer faseriger Pflanzenreste als Füllmaterial thermoplastischer Polymere. In anderen Untersuchungen wurden unbehandelte Eucalyptusholzreste, gemahlene

Maiskolben und Getreide als Rohmaterialien eingesetzt. Um Proben mit unterschiedlichem Gehalt (10-50phr) an zellulärem Füllmaterial herzustellen, wurde eine Polymer-Matrix aus Polyethylen mit geringer Dichte (LDPE) und PVC-Plastisol eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zugabe von Fasern zum LDPE einerseits zu einer Abnahme der Dehnbarkeit des Polymers führte. Auf der anderen Seite stieg das Young-Modul infolge der höheren Steifheit der Fasern. Die Eigenschaften bestimmter Mischungen waren akzeptabel, es sind jedoch Prozessänderungen notwendig, um die Faser-Polymer-Bindung weiter zu verbessern (Georgopoulos et al., 2005).

Des Weiteren wurden Kokosfasern eingesetzt, um LDPE zu verstärken. Der Effekt einer natürlichen Wachs-Oberflächen-Beschichtung auf die Fasern der Faser-Matrix-Bindungen und die Verbundeigenschaften wurden mit Hilfe von Einzelfaser-Tests und einer Evaluation der Dehnbarkeitseigenschaften des Faserverbunds untersucht. Die Wachsschicht wirkte sich dabei positiv auf die Faser-Matrix-Bindung aus. Eine Abnahme der Beschichtung führte zu einer deutlichen Abnahme der Faserbelastung, einem Anstieg der kritischen Faserlänge und entsprechend einer Abnahme der Zugfestigkeit der Verbundstoffe (Brahmakumar et al., 2005).

Mit Hilfe eines Kapillarrheometers wurden die schmelz-rheologischen Eigenschaften von Polypropylen-Verbundstoffen untersucht, die durch kurze Sisalfasern verstärkt wurden. Interessant war die Abhängigkeit von der Mischung, dem Verhältnis der verstärkenden Komponente, und das Maß ihrer chemischen Modifikation auf die rheologische Verhaltensweise. Die Beimischung resultierte in steigender Faserladung einem Anstieg der Schmelzviskosität und einer Abnahme der Schmelzelastizität. Verformung und Strangaufweitung waren jedoch die bedeutenderen Verbesserungen (Joseph et al., 2002).

Das thermische Verhalten von mit kurzen Sisalfasern verstärkten Polystyrol-Verbundstoffen wurde mittels thermogravimetrischer und dynamisch-mechanisch-thermischer Analysen untersucht. Die thermische Stabilität der Verbundstoffe war danach höher als bei denen, die eine Matrix aus ungekürzten Sisalfasern und Polystyrol besaßen. Untersucht wurde die Auswirkung von Faserladung, Faserlänge, Faserorientierung und Fasermodifikationen auf die dynamisch-mechanischen Eigenschaften der Verbundstoffe (Nair et al., 2001).

Ölpalmenfasern wurden zur Verstärkung von Phenol-Formaldehyd-Harzen verwendet. Um die Bindungseigenschaften zu verbessern, wurden die Fasern

verschiedenen chemischen Modifikationen unterworfen, wie der Merzerisierung, der Acrylnitril-Pfropfung, der Acrylierung, der Latexbeschichtung, der Permanganat-Behandlung, der Acetylierung und der Peroxidbehandlung. Die Beimischung der modifizierten Fasern zu den Verbundstoffen führte zu einer exzellenten Schlagfestigkeit. Durch die Faserbenetzung wurde die Schlagfestigkeit der unbehandelten Verbundstoffe dabei um den Faktor 4 erhöht (Sreekala et al., 2000).

Das Schmelzverhalten der mit unbehandelten und behandelten kurzen Sisalfasern verstärkten Styrol-Butadiene-Gummi (SBR)-Verbundstoffe wurde mit Hilfe eines Instron-Kapillar-Rheometers untersucht. Es wurden Auswirkungen wie Faserbruch, Faserlänge, Faserkonzentration, Schergeschwindigkeit, Scherspannung und Scherbeanspruchung auf die Schmelzviskosität untersucht. Der Faserbruch wurde vor und nach der Extrusion analysiert und der Polydispersitätsindex (PDI) geschätzt. Diese Verbundstoffe verhielten sich wie pseudoplastische Materialien. Bei einer geringen Schergeschwindigkeit erhöhten die kurzen Fasern die Viskosität mehr als bei einer hohen Schergeschwindigkeit. Durch die chemische Behandlung infolge der hohen Faser-Matrix-Bindung war ein Anstieg der Viskosität zu verzeichnen (Kumar et al., 2000).

Der Effekt chemischer Behandlungen auf die Dehnungseigenschaften von mit kurzen Sisalfasern verstärkten LDPE-Verbundstoffen wurde untersucht. Bei den Behandlungen kamen Chemikalien wie Natronlauge, Isocyanat, Permanganat und Peroxid zum Einsatz, um die Bindungseigenschaften an der Faser-Polymer-Oberfläche zu verbessern. Die Dehnungseigenschaften der Verbundstoffe wurden dadurch sehr unterschiedlich, im Ergebnis jedoch erheblich verbessert. Die beobachtete Erhöhung der Dehnungseigenschaften wurde der Zugabe geringer Mengen Peroxid zugeordnet. Die mechanischen Eigenschaften verbesserten sich durch Zugabe geringer Mengen Permanganat in das Sisal-LDPE-System während der Vermischung. Die Peroxidbehandlung verlieh den Fasern maximale Wechselbeziehungen (Joseph et al., 1996).

4.1.3 Herstellung glasfaserverstärkter Verbundstoffe

Die Produktion eines Materials mit verbesserten Eigenschaften soll durch die Kombination von zwei oder mehr Materialien mit unterschiedlichen

Materialeigenschaften erreicht werden. Die beste Kombination aus Festigkeit und Formbarkeit wird bisher erreicht, indem aus Fasern bestehende Feststoffe in eine Matrix eingebettet werden. Polyester ist dazu eine passende Komponente, da es schnell an Fasern oder Fasern der anderen Komponente anhaftet. Die bekannteste Form von in Harz integrierten Glasfasern ist glasfaserverstärktes Polyester (GRP). Die Fasern können verwebt oder zu einem Vlies verpresst genutzt werden. Die strukturellen Eigenschaften einer glasfaserverstärkten Polyester-Matrix wurden bei einem Glasfasergehalt von 9%-33%wt. in den Verbundstoffen untersucht. Andere Materialien wie Polystyrol, Zink, Stearate usw. wurden lediglich einbezogen, um den prozentualen Anteil der Polyester-Matrix zu vervollständigen. Die Ergebnisse waren abhängig von der Glasfasermenge (Findik et al., 2002).

Die physikalischen Eigenschaften natürlicher Fasern werden hauptsächlich durch ihre physikalische und chemische Beschaffenheit, die Faserstruktur, den Zellulosegehalt, den Winkel der Fibrillen, den Querschnitt und ihren Polymerisationsgrad bestimmt. Die physikalische Struktur konnte durch den Einsatz von Alkali-Behandlungen und Acetylierungsprozessen modifiziert werden. Die Verwendung von natürlichen Fasern als Verstärkung in Verbundmaterialien erforderte, ebenso wie bei den glasfaserverstärkten Verbundstoffen, eine starke Anziehung zwischen den Fasern und der Matrix. Ungeachtet einer traditionellen Polymermatrix wurde eine biologisch abbaubare Polymermatrix oder ein Zement benutzt. Verschiedene chemische und physikalische Behandlungsmethoden verbesserten die Faser-Matrix-Bindung, und änderten unter anderem den hydrophilen Charakter der natürlichen Fasern so, dass Feuchtigkeitseffekte reduziert wurden. Um hydrophobe Eigenschaften zu bewirken, wurde die Acetylierung genutzt. Die mechanischen und physikalischen Eigenschaften der Verbundstoffe waren abhängig vom Fasergehalt, welcher wiederum den Gehalt an Kopplungsmittel bedingte. Der Einfluss dieser Behandlungsmethoden wurde unter Beachtung des Fasergehaltes detailliert untersucht. Für spezielle Anforderungen konnten die gewünschten Eigenschaften mit Hilfe von sogenannten Hybrid-Stoffen aus konventionellen und natürlichen Fasern hergestellt werden. Für den industriellen Einsatz dieser Materialien spielten Prozessbedingungen und mechanische Eigenschaften eine wichtige Rolle. Die Ergebnisse zeigen, dass natürliche Fasern mit den bereits angewendeten Methoden weiterverarbeitet werden können.

Natürliche Fasern haben Umwelteinflüssen gegenüber nur eine geringe Resistenz. Dieses kann vorteilhaft genutzt werden für die Herstellung biologisch abbaubarer Verbundstoffe mit guten physikalischen Eigenschaften (Bledzki und Gassan, 1999).

4.1.4 Wirkung von Laccase auf die Copolymerisation von Acrylat

Die chemoenzymatische Produktion von Lignin-Acrylamid-Pfropf-Copolymeren konnte durch den Einsatz einer Phenoloxidase (Laccase) erreicht werden, welche Ligninradikale bildet. Laccase erhöhte die Pfropf-Effizienz der Copolymerisation verglichen mit Tertiärbuthydroperoxid (t-BHP)-Reaktionen oder einem Fenton-ähnlichen Mechanismus. Die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen Ligninsulfonat und der Acryl-Seitenkette erfolgte durch eine Reaktion der wachsenden Acryl-Kette mit einem ungepaarten Elektron des Phenoxyradikals. Die Radikale spielten eine Rolle bei der Bildung von Alcoxy- oder Peroxyradikalen. Die Phenoxyradikale geben ein Elektron an die Peroxide ab, welche zu Alkoxyradikalen reduziert werden, während die Phenoxyradikale zu Chinon oxidiert werden. Alternativ konnten Peroxyradikale möglicherweise durch die Oxidation von Peroxiden generiert werden, welche durch Phenoxyradikale vermittelt, und dann zu Phenolen reduziert werden (Mai et al., 2002).

Laccase des Weißfäulepilzes *Trametes versicolor* und organische Peroxide wie Dioxanperoxid, Tetrahydrofuranperoxid und t-BHP lösten eine Copolymerisation der freien Radikale von Lignin und Acrylamid aus. Die Peroxidarten und die katalytische Effizienz des Enzyms waren wichtig, um einen signifikanten Ertrag der Copolymerisation und eine gute Acrylamidaufnahme in der Ligninstruktur zu garantieren. Bei Zunahme der organischen Peroxide nahm der Anteil des Lignins ab. Von den getesteten organischen Peroxiden schien Dioxanperoxid besser geeignet zu sein als die anderen organischen Peroxide (Mai et al., 1999).

Laccase, aus einer Kultur des Weißfäulepilzes *Trametes versicolor* isoliert, wandelte verschiedene Ligninarten, vorzugsweise Organosolv-, Kraft- und sulfoniertes Lignin um. Es schien, dass eine Änderung des Reaktionsmediums oder des Ligninmoleküls, angeregt durch Laccase, zu einer Polymerisation führen konnte. In der Reaktionsmischung wurde während der Lignininkubation mit Laccase ein Supermolekül gefunden. Verbindungen mit geringem Molekulargewicht

unterschiedlichen Ursprungs, vorzugsweise Aromaten, Zucker und aliphatische Monomere, die eine Vinyl-Gruppe enthielten, konnten mit Lignin copolymerisiert werden. Die Pfropfung von Lignin zu synthetischen Polymeren eröffnete die Möglichkeit, eine neue Klasse technischer Kunststoffe herzustellen (Milstein et al., 1996).

Die Copolymerisation einer ligninähnlichen, phenolischen und acrylischen Verbindung durch Laccase und das Peroxid t-BHP wurde mit einem Fenton-ähnlichen System verglichen. Zuerst wurde die relative Aktivität von Laccase gegenüber den verschiedenen phenolischen Verbindungen sowie der optimale pH-Wert ermittelt. Der Polymerertrag und das mittlere Molekulargewicht der chemoenzymatisch produzierten Polymere waren abhängig von der Art des getesteten Phenols und vom Phenol/Monomer-Anteil. Ebenso wichtig für den Erfolg der Copolymerisation waren das Redoxpotential und die Art des angewandten Acrylmonomers. Das Ausmaß der Phenolaufnahme in die Polymerkette wurde durch die Anwesenheit von Laccase erhöht und war deutlich höher als bei der Polymerisation, initiiert durch das Fenton-ähnliche System.

Polyacrylsäure und Polyacrylamid sind weitestgehend resistent gegenüber dem Bioumsatz. Die Pfropfung einiger Komponenten in das Polymer konnte jedoch die Abbaubarkeit durch ausgewählte, komplett abbaubare Verbindungen in die Polymerstruktur verbessern (Mai et al., 2001).

4.1.5 Zielsetzung

Bei Versuchen mit der Ligninoberfläche von Holzfasern haben Mai et al. (2001) gezeigt, dass Lignin mit einem radikalisch polymerisierten Monomer polymerisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wird untersucht, unter welchen Bedingungen die Holzfaseroberfläche mit Acrylat reagiert und ob es auf diese Weise grundsätzlich möglich ist, faserverstärkte Verbundwerkstoffe auf der Basis von Holzfasern und Acrylaten herzustellen.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Herstellung eines kaltgepressten Holzfaservlieses

4.2.1.1 Material

Zellulosefasern, Sieb, Blattbildner, Presse, Waage, Presspapier

4.2.1.2 Methode

Mit Hilfe einer Waage wurden 57g Zellulosefasern eingewogen. Die Fasern wurden in einen Blattbildner gesiebt, der zuvor auf ein Blatt Presspapier gestellt wurde. Der Blattbildner wurde entfernt, das Faservlies mit einem weiteren Presspapier bedeckt und vorsichtig in die Presse geschoben. Bei 220bar und Zimmertemperatur wurde das Faservlies für 4 Minuten kalt gepresst.

4.2.2 Beschichtung kaltgepresster Holzfaserprüflinge mit 10%iger Ligninsulfonsäure

4.2.2.1 Material

20 kaltgepresste Holzfaserprüflinge, Eis, Feinwaage, Bechergläser, Spatel, Mikropipetten und Spitzen, LSS, Mc Illvaine Puffer pH 4,5, Laccase, Materialien/Chemikalien für den ABTS-Test, Photometer, Quarzküvette, Bidest, Pinzette, Reagenzgläser und -ständer, Trichter, Faltenfilter, Exikkator

4.2.2.2 Methode

Aus dem kaltgepressten Holzfaserwolle wurden 20 Holzfaserprüflinge mit den Maßen 1cm x 2cm geschnitten. Im Anschluss daran wurde die Ligninsulfonsäurelösung für die Beschichtung der Prüflinge hergestellt. Zuerst wurde ein ABTS-Test durchgeführt, um die Aktivität der Laccase zu bestimmen (1688nKat/ml). Danach wurden zwei verschiedene Lösungen angesetzt, eine Probelösung mit Laccase und eine Kontrolllösung mit Mc Ilvaine Puffer.

Probenansatz:

0,2g Ligninsulfonsäure

0,9ml Mc Ilvaine Puffer pH 4,5

0,9ml Laccase

Kontrollansatz:

0,2g Ligninsulfonsäure

1,8ml Mc Ilvaine Puffer pH 4,5

Für die Beschichtung wurden jeweils 20µl der Ligninsulfonsäurelösung und 80µl Laccase auf die Prüflinge gegeben. Bei der Beschichtung der Kontrollen wurde die Laccase durch Mc Ilvaine Puffer pH 4,5 ersetzt. Es wurden 10 Proben und 10 Kontrollen beschichtet. Jeweils 5 Proben jeder Variante wurden nach der Beschichtung im Exikkator getrocknet, die restlichen an der Luft.

Nachdem die Proben getrocknet waren, wurden sie in Reagenzgläsern mit 5ml Bidest für 30 Minuten ausgewaschen.

Die Auswaschlösung wurde anschließend bei 280nm in Quarzküvetten am Photometer gemessen.

4.2.3 Auftrag einer Acrylamidlösung auf LSS-beschichtete und mit Bidest ausgewaschene Holzfaserprüflinge

4.2.3.1 Material

Acrylamid

Für alle Versuche wurde das Acrylamid der Firma Sigma verwendet. Da es sich um eine giftige Substanz handelt, wurde mit den nötigen Sicherheitsvorkehrungen gearbeitet.

Tertiärbutylhydroperoxid

Da es sich bei Tertiärbutylhydroperoxid (t-BHP) ebenfalls um eine giftige Substanz handelt, wurden ebenfalls die nötigen Sicherheitsvorkehrungen getroffen. Das verwendete t-BHP stammt von der Firma Merck.

Photometer, Mc Ilvaine Puffer pH 4,5, Chemikalien/Materialien für den ABTS-Test, kleine Bechergläser, Acrylamid, Pipetten und -spitzen, Bidest, t-BHP, Feinwaage, pH-Meter, E-cup, Citronensäure, Holzfaserprüflinge, Exikkator, Reagenzgläser und -ständer, kleine Trichter, Faltenfilter, Quarzküvetten, Handschuhe, Kittel und Atemmaske, Abzug

4.2.3.2 Methode

4.2.3.2.1 Berechnung Tertiärbutylhydroperoxid

Da es sich bei Tertiärbutylhydroperoxid um eine Flüssigkeit handelt, wurde die Massenangabe in Volumen umgerechnet.

Dichte der Flüssigkeit: 1L = 0,94kg

$$1000\text{ml} = 940\text{g}$$

$$x = 0,0014\text{g}$$

$$x = 0,00149\text{ml/ml} = \underline{1,49\mu\text{l/ml}}$$

Bei der Lösung handelt es sich nur um eine 70%ige Lösung, somit muss das Volumen auf eine 100%ige Lösung hochgerechnet werden.

$$1,49\mu\text{l} = 70\%$$

$$x = 100\%$$

$$x = \underline{2\mu\text{l/ml}}$$

Unter dem Abzug wurden 2 μl Tertiärbutylhydroperoxid + 998 μl Bidest in ein E-cup pipettiert.

4.2.3.2.2 Ansatz der Acrylamidlösungen

Probenansatz:

1ml Laccase

0,5ml Mc Ilvaine Puffer pH 4,5

500mg Acrylamid

Kontrollansatz:

1,5ml Mc Ilvaine Puffer pH 4,5

500mg Acrylamid

Zu den Stammlösungen wurden jeweils 10 μl der Tertiärbutylhydroperoxidlösung hinzupipettiert. Aus diesen Lösungen wurden wiederum jeweils 100 μl auf die Prüflinge pipettiert.

Nach der Beschichtung mit der Acrylamidlösung wurden alle Prüflinge für 24h im Exikkator getrocknet. Die getrockneten Prüflingen wurden 30 Minuten in jeweils 5ml Bidest ausgewaschen. Um die Fasern aus der Auswaschlösung zu entfernen, wurden die Proben filtriert und danach in Quarzküvetten bei 280nm am Photometer

gemessen. Als Referenzwert und zum Verdünnen wurde Bidest verwendet. Die Messung erfolgte in jeweils drei Wiederholungen, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde.

4.2.3.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Fasern

Einige der mit Acrylamid beschichteten Faserproben wurden für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Zur Methodik wird auf Kapitel 3.2.3 verwiesen.

4.2.4 Beschichtung kaltgepresster Holzfaserprüflinge mit einer Acrylamid- und Bisacrylamidlösung mit und ohne vorherige LSS-Beschichtung

4.2.4.1 Acrylamid- und Bisacrylamidbeschichtung

4.2.4.1.1 Material

Bisacrylamid

Bei dem verwendeten Bisacrylamid handelt es sich um eine giftige Substanz, bei der Sicherheitsvorkehrungen nötig sind. Das verwendete Bisacrylamid stammt von der Firma Sigma.

Photometer, Mc Ilvaine Puffer pH 4,5, Chemikalien/Materialien für den ABTS-Test, kleine Bechergläser, Acrylamid, Bisacrylamid, Tertiärbutylhydroperoxid, Bidest, Feinwaage, pH-Meter, E-cup, Citronensäure, Holzfaserprüflinge, Exikkator, Reagenzgläser und -ständer, Trichter, Faltenfilter, Quarzküvetten, Pipetten und -spitzen, Laccase (771nKat/ml), Schutzkleidung, Abzug

4.2.4.1.2 Methode

Für die Beschichtung der kaltgepressten Holzfaserprüflinge wurden zwei Stammlösungen nach dem folgenden Rezept hergestellt:

Probenansatz:

1ml Laccase (1020nKat/ml)
0,5ml Mc Ilvaine Puffer pH 4,5
487mg Acrylamid
13mg Bisacrylamid

Kontrollansatz:

1,5ml Mc Ilvaine Puffer pH 4,5
487mg Acrylamid
13mg Bisacrylamid

Nach der Aktivitätsbestimmung der Laccase wurde diese bis zu ihrem weiteren Gebrauch auf Eis gelagert. Parallel dazu wurden 2µl Tertiärbutylhydroperoxid und 998µl Bidest unter dem Abzug in ein E-cup pipettiert. Anschließend wurden jeweils 10µl dieser Tertiärbutylhydroperoxidlösung zu den beiden Stammlösungen hinzugefügt.

Bei den 20 Prüflingen handelt es sich um 10 unbehandelte Prüflinge und 10 Prüflinge, welche bereits in Vorversuchen mit 10%iger Ligninsulfonsäurelösung beschichtet, ausgewaschen und anschließend getrocknet worden waren. Es wurden von jeder Variante 5 Prüflinge mit der Probelösung, die restlichen fünf mit der Kontrolllösung beschichtet.

Von den beiden entstandenen Stammlösungen wurden jeweils 100µl auf die Prüflinge aufgetragen. Nach der Beschichtung wurden die Prüflinge in einem Exikkator aufbewahrt.

Am nächsten Tag erfolgte eine Auswaschung der Prüflinge in Reagenzgläsern mit 5ml Bidest für insgesamt 30 Minuten. Die Auswaschlösung wurde durch einen Filter gegeben, um etwaige Faserreste aus der Lösung zu entfernen.

Anschließend wurden die Auswaschlösungen in Quarzküvetten am Photometer gemessen. Als Referenzwert und zum Verdünnen wurde Bidest verwendet. Die Messung der Proben erfolgte in jeweils drei Wiederholungen, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde.

4.2.5 Beschichtung kaltgepresster Holzfaserprüflinge mit einer Brenzkatechinlösung

4.2.5.1 Material

Brenzkatechin

Für alle Versuchsreihen wurde das Brenzkatechin der Firma Merck verwendet.

Holzfaserprüflinge, Eis, Feinwaage, Bechergläser, Spatel, Pipetten und -spitzen, Brenzkatechin, Mc Illvaine Puffer pH 4,5, Laccase, Chemikalien/Materialien für den ABTS-Test, Photometer, Quarzküvetten, 0,1M NaOH, Bidest, Reagenzgläser und -ständer, Trichter, Faltenfilter, Exikkator

4.2.5.2 Methode

Aus dem HolzfaserVLies wurden 20 Prüflinge mit den Maßen 1cm x 2cm herausgeschnitten. Im Anschluss daran wurde die Aktivität der Laccase mit Hilfe eines ABTS-Tests bestimmt (1688nKat/ml). Es folgte eine Beschichtung der Faserprüflinge mit einer Brenzkatechinlösung, die wie folgt angesetzt wurde:

Probenansatz:

0,1g Brenzkatechin

0,95ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5

0,95ml Laccase

Kontrollansatz:

0,1g Brenzkatechin

1,9ml Mc Ilvaine Puffer pH 4,5

Für die Beschichtung wurden jeweils 20µl der Brenzkatechinlösung auf die Prüflinge pipettiert. Für die Proben wurden 80µl Laccase hinzupipettiert und für die Kontrollen wurde die Laccase durch 80µl Mc Ilvaine Puffer pH 4,5 ersetzt.

Beschichtet wurden insgesamt 10 Proben und 10 Kontrollen. Jeweils fünf dieser Variationen wurden im Exikkator getrocknet, die restlichen fünf an der Luft.

Die Auswaschung der Proben erfolgte in Reagenzgläsern für 30 Minuten in 5ml Bidest. Bevor die Auswaschlösung bei 280nm am Photometer gemessen werden konnte, wurden die Ansätze filtriert. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten gegen eine Referenz aus 0,1M NaOH.

4.2.5.3 Erstellen einer Brenzkatechin-Eichreihe

4.2.5.3.1 Material

Brenzkatechin, Bidest, 0,1M NaOH, Photometer, Küvetten, Pipette und -spitzen, Bechergläser, Messzylinder, Feinwaage

4.2.5.3.2 Methode

In Bechergläsern wurden 8 verschiedene Brenzkatechinstammlösungen angesetzt. Alle Lösungen besaßen die Ausgangskonzentration von 0,1g Brenzkatechin in 50ml Bidest. Die Lösungen wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen am Photometer gemessen. Bei den Verdünnungsstufen handelt es sich um die Verdünnungen: 1:100, 1:200, 1:500 und 1:1000. Die Verdünnung der Stammlösungen erfolgte mit 0,1M NaOH, daher wurden die Proben am Photometer gegen eine Referenz, bestehend aus 1ml 0,1M NaOH, gemessen. Die Extinktion wurde drei Wiederholungen gemessen, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde (Tab.4.1), welcher als Grundlage für weitere Berechnungen herangezogen wurde.

Tab.4.1: Mittelwerte der Eichreihe

Verdünnung	Mittelwert
1:100	0,79
1:200	0,61
1:500	0,25
1:1000	0,13

Zuerst wurde die Masse an Brenzkatechin in den Lösungen berechnet. Danach erfolgt eine Zuordnung der Extinktion zur Masse:

Stammlösung = 0,1g / 50ml
= 2mg / 1ml (Küvette)
= 20µl / 1ml (Küvette 1:100 verdünnt)

Das bedeutete, dass bei einer Extinktion von 0,79 insgesamt 20µg Brenzkatechin in der Probe enthalten war.

4.2.5.3.3 Berechnung der ausgewaschenen Brenzkatechinmenge

Die Berechnung der Brenzkatechinauswaschung erfolgte mit einem Referenzwert, welcher mit Hilfe einer Eichreihe ermittelt wurde.

0,79E = 20µg Brenzkatechin

Dieser Bezugswert wurde mit der Verdünnung und dem Auswaschvolumen multipliziert und zu der maximalen Auswaschung von 4mg, für den Fall einer vollständigen Ablösung des Brenzkatechins, ins Verhältnis gesetzt.

4.3 Ergebnis und Diskussion

Grundlage der Faserversuche war ein kaltgepresstes Holzfaservlies. Aus diesem Faservlies wurden Prüflinge in der Größe 1cm x 2cm herausgeschnitten und für die weiteren Versuche genutzt. Einigen Versuchen ging eine Ligninsulfonsäurebeschichtung oder eine Laccasebeschichtung der Holzfaserprüflinge voraus. Auf diese bereits mit Ligninsulfonsäure beschichteten und mit Bidest ausgewaschenen Holzfaserprüflinge wurden in weiteren Versuchen folgende Chemikalien aufgebracht. Es erfolgte eine Beschichtung mit einer Acrylamid- und einer Acrylamid-/Bisacrylamidlösung. Des Weiteren wurde auf die zuvor mit Laccase beschichteten Prüflinge eine Brenzkatechinelösung aufgebracht. Eine andere Variation bestand in der unterschiedlichen Art der Faser Trocknung, im Exikkator oder an der Luft. Um die Menge der verbleibenden Beschichtung auf der Faseroberfläche zu quantifizieren, wurden die Proben ausgewaschen und die Auswaschlösungen am Photometer gemessen. Die ermittelten Werte wurden dann mit einer Eichreihe umgerechnet.

4.3.1 Ligninauswaschung der Faserprüflinge

Die Holzfaserprüflinge wurden mit jeweils 20µl Ligninsulfonsäurelösung und 80µl Laccase beschichtet. Bei den Kontrollen wurde die Laccase durch 80µl Mc Illvaine Puffer pH 4,5 ersetzt. Jeweils 5 Proben und 5 Kontrollen trockneten über Nacht an der Luft, die restlichen im Exikkator. Am nächsten Morgen wurden die Proben in jeweils 5ml Bidest für 30 Minuten ausgewaschen und die Überstände am Photometer gemessen. Um die Proben vergleichen zu können, wurden Extinktionswerte, die bei unterschiedlicher Verdünnung ermittelt wurden, normiert. Diese Werte dienen als Rechengrundlage (Tab.4.2).

Tab.4.2: Auswaschergebnisse der Faserprüflinge

Variante	Extinktion (E) gemessen bei 280nm	Verdünnung	Mittelwert ±SD
Probe an der Luft getrocknet	0,3 0,24 0,22 0,23 0,24	1:10	0,25 ±0,03
Kontrolle an der Luft getrocknet	0,6 0,66 0,55 0,59 0,47	1:10	0,57 ±0,07
Probe im Exikkator getrocknet	0,15 0,12 0,16 0,16 0,12	1:10	0,14 ±0,02
Kontrolle im Exikkator getrocknet	0,47 0,47 0,51 0,42 0,53	1:10	0,48 ±0,04

Die Extinktionen, der an der Luft getrockneten Holzfaserprüflinge sind deutlich niedriger als die der entsprechenden Kontrollen. Das bedeutet, dass weniger Ligninsulfonsäurelösung von den Fasern abgelöst wurde als bei der Kontrolle. Das auf der Faser vorhandene Lignin und die zugegebene Ligninsulfonsäure-Laccase-Lösung reagierten bei Sauerstoffzufuhr und es wurde mehr Lignin an den Faserprüfling gebunden. Dieses Ergebnis bestätigten auch die Prüflinge, welche über Nacht im Exikkator belassen wurden. Die Proben zeigten gegenüber den Kontrollen ebenfalls eine deutlich geringere Auswaschung.

4.3.2 Ergebnis der Acrylamid-Auswaschung

Bereits zuvor mit einer Ligninsulfonsäurelösung beschichtete und mit Bidest ausgewaschene Holzfaserprüflinge wurden mit jeweils 100µl Acrylamidlösung beschichtet. Bei diesem Versuch gab es insgesamt 10 Proben und 10 Kontrollen. Alle Prüflinge wurden 24 Stunden in einem Exikkator getrocknet und anschließend in 5ml Bidest ausgewaschen. Die Messung der Überstände erfolgte in drei Wiederholungen am Photometer. Aus den ermittelten Werten wurde ein Mittelwert gebildet. Um die Proben vergleichen zu können wurden Extinktionswerte, die bei unterschiedlicher Verdünnung ermittelt wurden, normiert. Diese Werte dienen als Rechengrundlage (Tab.4.3).

Tab.4.3: Werte der AcrylamidAuswaschung

Variante	Extinktion (E)	Verdünnung	Mittelwert \pm SD
Proben	0,10	1:1000	0,17 \pm 0,15
	0,08		
	0,12		
	0,13		
	0,14		
	0,12		
	0,12		
	0,59		
	0,12		
	0,15		

Kontrollen	0,26 0,37 0,27 0,42 0,31 0,45 0,38 0,33 0,37 0,33	1:1000	0,35 ±0,06
------------	--	--------	------------

Die Extinktionen der Kontrollen waren doppelt so hoch wie die der Proben. Das bedeutet, dass aus den Proben wesentlich weniger Acrylamid ausgewaschen wurde und wesentlich mehr mit der Faseroberfläche reagiert hat.

4.3.3 REM-Aufnahmen der Fasern

Das Fasermaterial des vorangegangenen Versuchs wurde für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert, um den mit Hilfe der Photometrie verzeichneten Effekt weiter zu untersuchen.

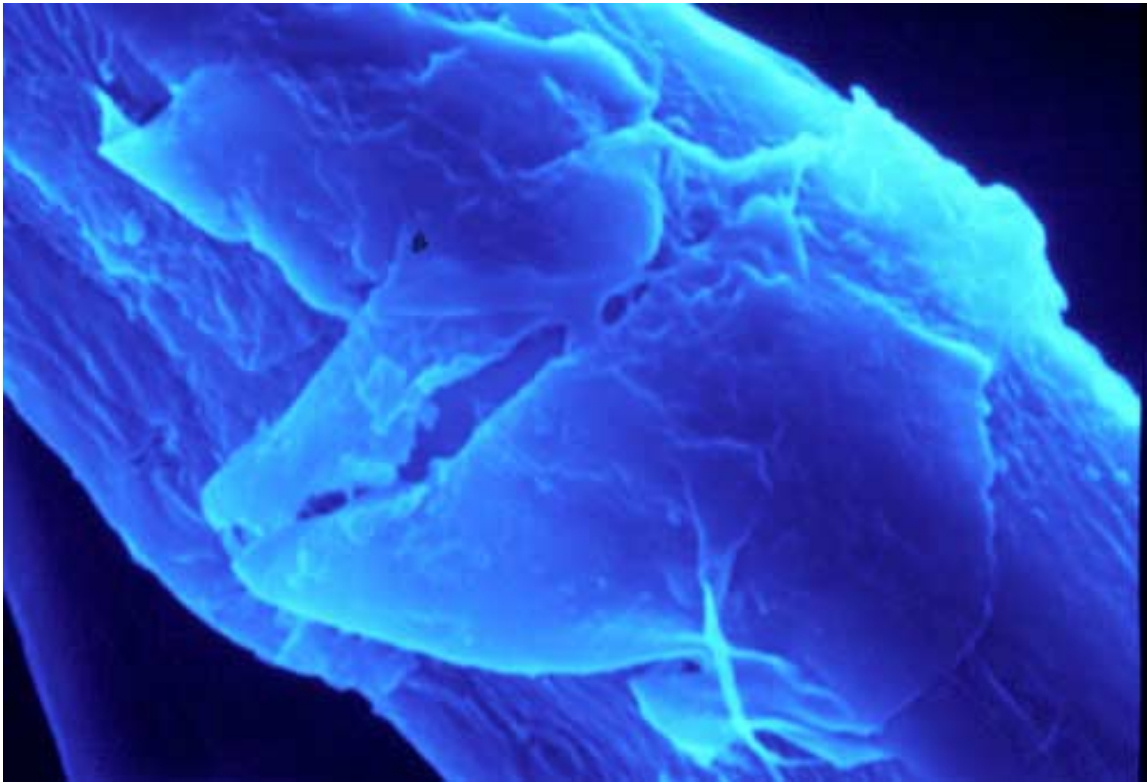


Abb.4.2: Oberfläche einer in der Faserplattenproduktion eingesetzten Faser

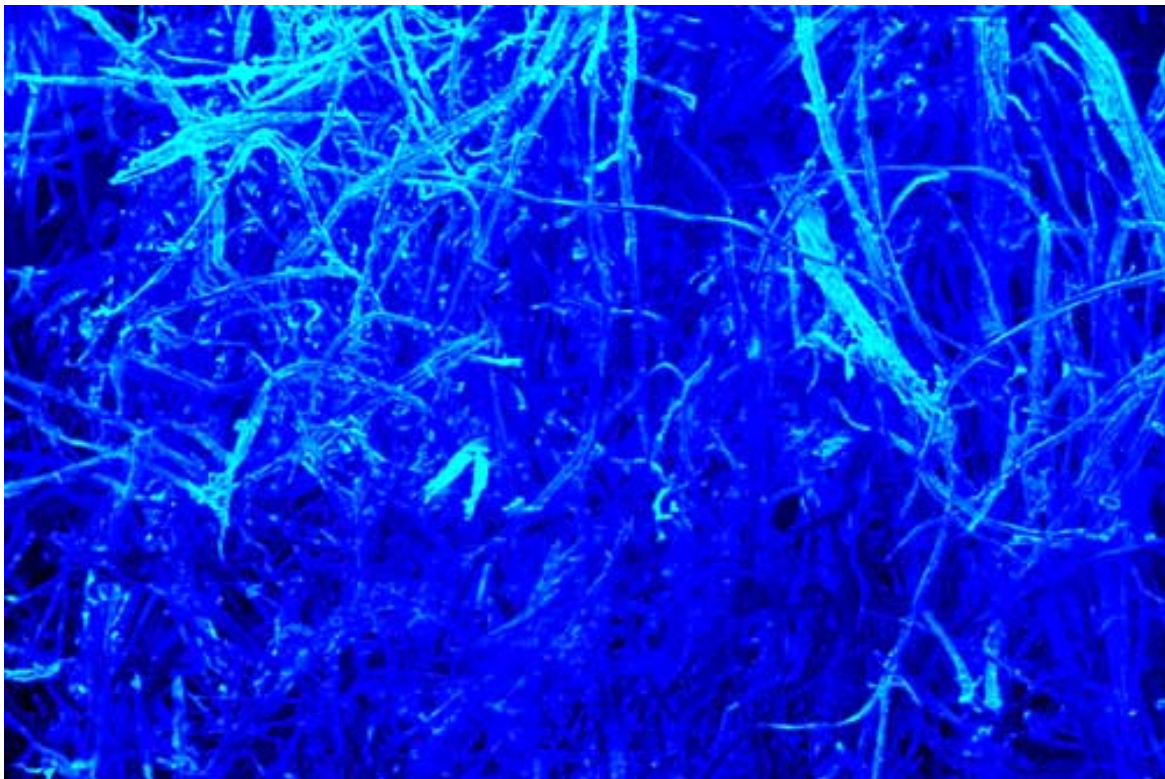


Abb.4.3: Zellulosefasern mit Acrylamid, Kontrolle, 24fach vergrößert

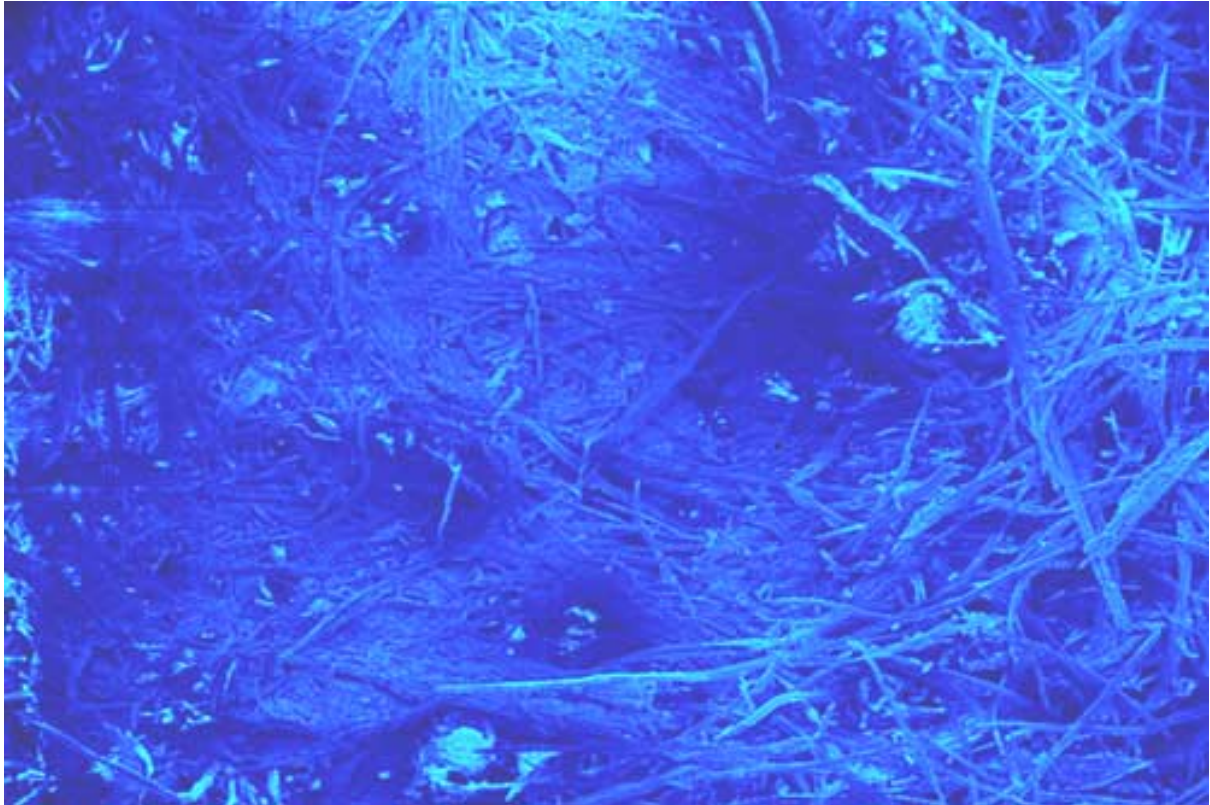


Abb.4.4: Zellulosefasern mit Acrylamid und Laccase, 24fach vergrößert

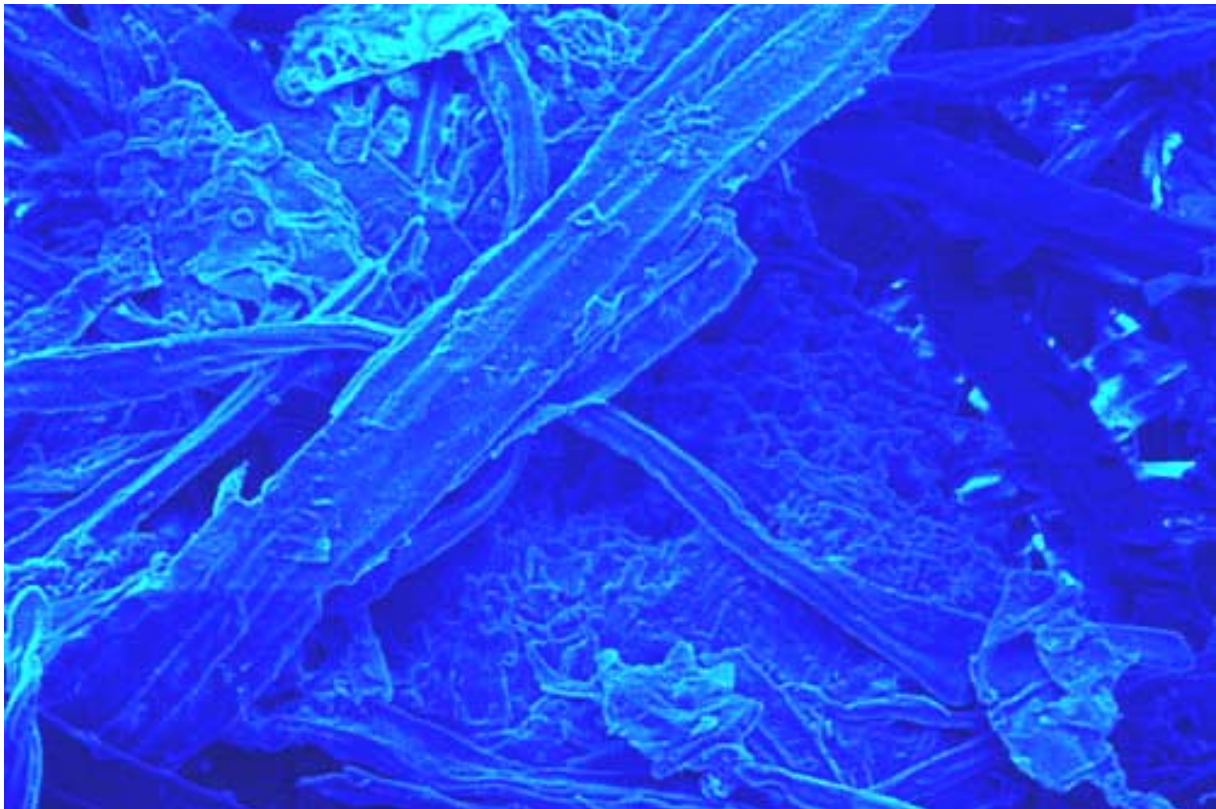


Abb.4.5: Zellulosefasern mit Acrylamid und Laccase, 200fach vergrößert

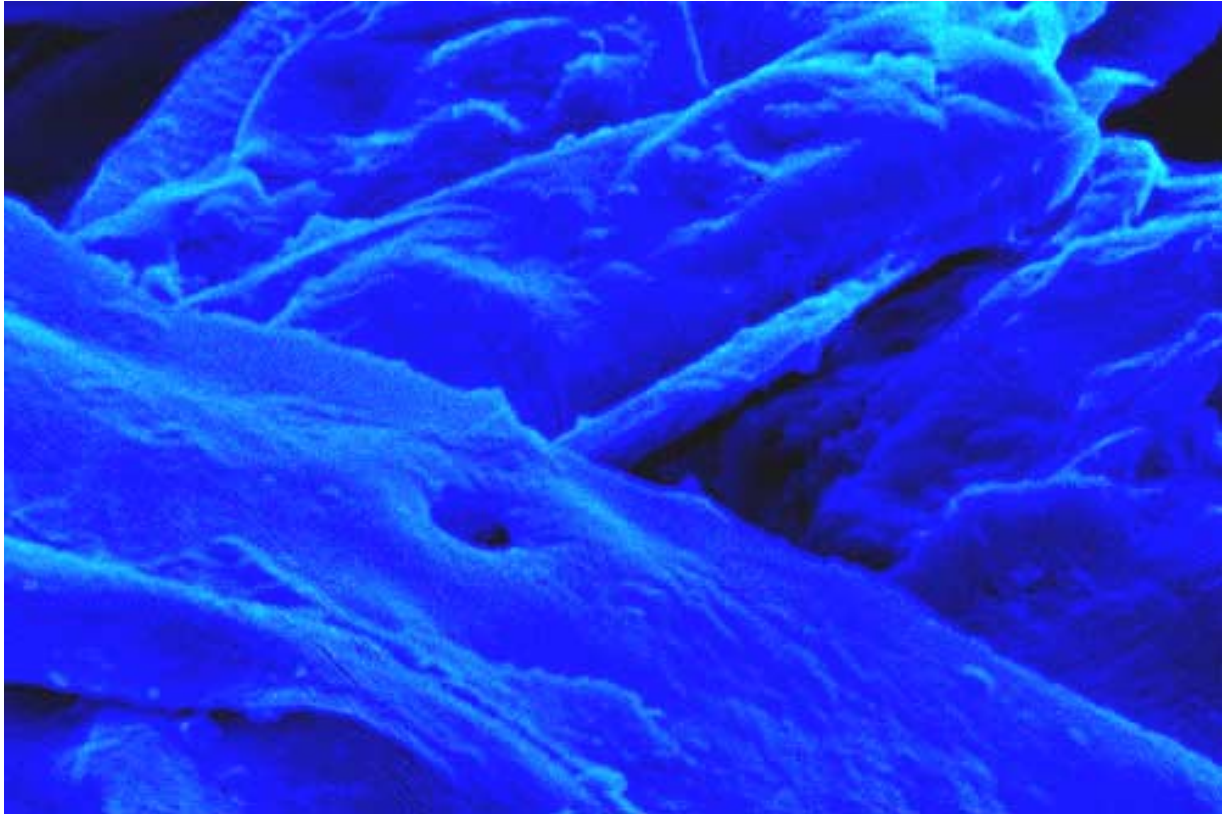


Abb.4.6: Zellulosefasern mit Acrylamid und Laccase, 1600fach vergrößert

Bei den REM-Aufnahmen sieht man in Abbildung 4.2 zuerst eine unbehandelte Holzfaser, welche für die Faserplattenproduktion eingesetzt wird. Auf den folgenden Abbildungen sieht man in geringerer Vergrößerung mit Acrylamid behandelte Fasern (Abb.4.3), und im direkten Vergleich die mit Acrylamid und Laccase behandelten Fasern (Abb.4.4). Bei den Aufnahmen lässt sich deutlich ein Unterschied zwischen Kontrolle (Abb.4.3) und Probe (Abb.4.4) erkennen, wo die Acrylamid-Beschichtung auf den Holzfasern deutlich zu erkennen ist. Die Faseroberfläche ist zu großen Teilen mit der reagierten Acrylamid-Laccase-Lösung bedeckt (Abb.4.6) und der Faserverbund wirkt augenscheinlich wesentlich kompakter (Abb.4.5). Insbesondere in der 1600fachen Vergrößerung ist die Beschichtung der Holzfasern und deren Verbindung durch das aufgebrauchte Acrylamid deutlich zu erkennen (Abb.4.6).

4.3.4 Bindung von Acrylamid/Bisacrylamid an beschichtete und unbeschichtete Faserprüflinge

In diesem Versuch sollte getestet werden, ob die Zugabe von Bisacrylamid als Quervernetzer, die Bindung des Polyacrylamids an die Faseroberfläche weiter verbessert. Dafür wurden 10 beschichtete und 10 unbeschichtete Holzfaserprüflinge mit 100µl einer Acrylamid/Bisacrylamidlösung beschichtet, wobei es sich bei 5 Prüflingen um Proben und bei den anderen 5 um Kontrollen handelte. Über Nacht kamen die Proben zum Trocknen in den Exikkator und wurden anschließend in jeweils 5ml Bidest für 30 Minuten ausgewaschen. Die Proben wurden in jeweils drei Wiederholungen am Photometer gemessen. Die errechneten Mittelwerte finden sich in der folgenden Tabelle. Um die Proben vergleichen zu können, wurden Extinktionswerte, die bei unterschiedlicher Verdünnung ermittelt wurden, normiert. Diese Werte dienen als Rechengrundlage (Tab.4.4).

Tab.4.4: Ergebnisse der Acrylamid-/BisacrylamidAuswaschung

Variante	Extinktion (E)	Verdünnung	Mittelwert \pm SD
Probe auf LSS- beschichteten Holzfasern	0,63	1:1000	0,51 \pm 0,08
	0,46		
	0,54		
	0,47		
	0,44		
Kontrolle auf LSS-beschichteten Holzfasern	0,49	1:1000	0,52 \pm 0,09
	0,41		
	0,47		
	0,62		
	0,62		
Probe auf unbeschichteten Holzfasern	0,58	1:1000	0,67 \pm 0,10
	0,63		
	0,67		
	0,64		
	0,83		

Kontrolle	0,74	1:1000	0,67 ±0,09
auf unbeschichteten	0,59		
Holzfasern	0,7		
	0,57		
	0,76		

Die Auswaschergebnisse zeigen, dass die Quervernetzungsreaktion zwischen Acrylamid und Bisacrylamid wohl so schnell verläuft, dass es zu keiner nennenswerten Bindung an der Oberfläche der Holzfasern kommt.

4.3.5 Bindung von Brenzkatechin an die Faser Oberfläche

4.3.5.1 Brenzkatechin-Eichreihe

Um für die Versuche eine Berechnungsgrundlage zu schaffen, wurde aus definierten Verdünnungsstufen eine Eichreihe angesetzt, mit deren Hilfe die Auswaschmengen berechnet werden konnten (Tab.4.5).

Tab.4.5: Werte der Brenzkatechin-Eichreihe

Verdünnung	Extinktion (E)	Mittelwert (MW)
10 g/L	0,78	0,79
	0,81	
	0,77	
5 g/L	0,49	0,61
	0,71	
	0,62	
2 g/L	0,24	0,25
	0,22	
	0,3	
1g/L	0,16	0,13
	0,11	
	0,12	

4.3.5.2 Ermittlung der Brenzkatechinbindung an die Faseroberfläche

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob auch monomere Phenole an die Faseroberfläche gebunden werden können.

Auf zuvor unbeschichtete Holzfaserprüflinge wurden jeweils 20µl einer Brenzkatechinlösung pipettiert. Insgesamt wurden 10 Proben und 10 Kontrollen beschichtet. Auf die Proben wurden zusätzlich jeweils 80µl Laccase und auf die Kontrollen entsprechend Mc Illvaine Puffer pH 4,5 aufgetragen. Jeweils 5 der Variationen wurden im Exikkator getrocknet, die restlichen 5 an der Luft.

Die Auswaschung der Proben erfolgte 30 Minuten in jeweils 5ml Bidest. Danach wurden alle Proben 1:10 verdünnt am Photometer gemessen. Um die tatsächlich ausgewaschene Menge zu bestimmen, wurden die Werte mit Hilfe der Brenzkatechin-Eichreihe berechnet (Tab.4.6). Der Bezugswert für die Berechnungen war in diesem Fall: $0,79E = 20\mu\text{g}$

Tab.4.6: Ergebnisse der Brenzkatechinauswaschung

Variante	Extinktion (E)	Mittelwert (E) ±SD	Auswaschung (µg)	Mittelwert (µg) ±SD	Auswaschung (%)	Mittelwert (%)
Probe an der Luft getrocknet	0,32	0,24 ±0,07	398,7	307,32 ±80,05	10	7,68
	0,31		388,6		9,7	
	0,21		263,3		6,6	
	0,20		258,2		6,5	
	0,18		227,8		5,7	
Kontrolle an der Luft getrocknet	0,74	0,78 ±0,06	927,8	988,36 ±82,97	23,2	24,71
	0,77		972,2		24,3	
	0,73		921,5		23	
	0,89		1126,6		28,2	
	0,79		993,7		24,8	

Probe	0,18	0,18 ±0,02	227,8	222,62	5,7	5,57
im	0,15		187,3	±24,58	4,7	
Exikkator	0,17		209,9		5,2	
getrocknet	0,20		249,6		6,2	
	0,19		238,5		6,0	
Kontrolle	0,35	0,39 ±0,03	440,5	490,12	11	12,25
im	0,38		481,0	±33,41	12	
Exikkator	0,42		531,6		13,3	
getrocknet	0,39		493,7		12,3	
	0,4		503,8		12,6	

Bei diesem Versuch wurde festgestellt, dass es auch ohne Laccase zu einer sehr hohen Bindung von Brenzkatechin an das Lignin der Faseroberfläche kommt. Offensichtlich ist Brenzkatechin unter diesen Bedingungen bereits ohne Laccase so reaktiv, dass es mit der Faseroberfläche eine Bindung eingehen konnte. Durch Laccase wurde eine zusätzliche Bindung erreicht, aus den Proben wurde deutlich weniger ausgewaschen als aus den Kontrollen. Das galt sowohl für die Proben, welche an der Luft getrocknet wurden, als auch für die Proben aus dem Exikkator. Bei den luftgetrockneten Proben ist eine Auswaschung im Mittel von 7,68% zu verzeichnen, was nur ungefähr einem Drittel der Auswaschung aus den Kontrollen entsprach. Bei den im Exikkator getrockneten Proben war die Auswaschung insgesamt geringer. Einer mittleren Auswaschung der Probe von 5,57% stand eine Auswaschung der Kontrolle von 12,25% gegenüber.

Mit diesen Versuchen ist nachgewiesen worden, dass es möglich ist, durch den Einsatz von Laccase und gegebenenfalls einer Vorbeschichtung mit aktivierter Ligninsulfonsäure aus Holzfasern und entsprechenden Monomeren, faserverstärkte Verbundwerkstoffe herzustellen.

5 Modellversuche zur Humusdynamik

5.1 Einleitung

5.1.1 Mechanismen des Humusabbaus

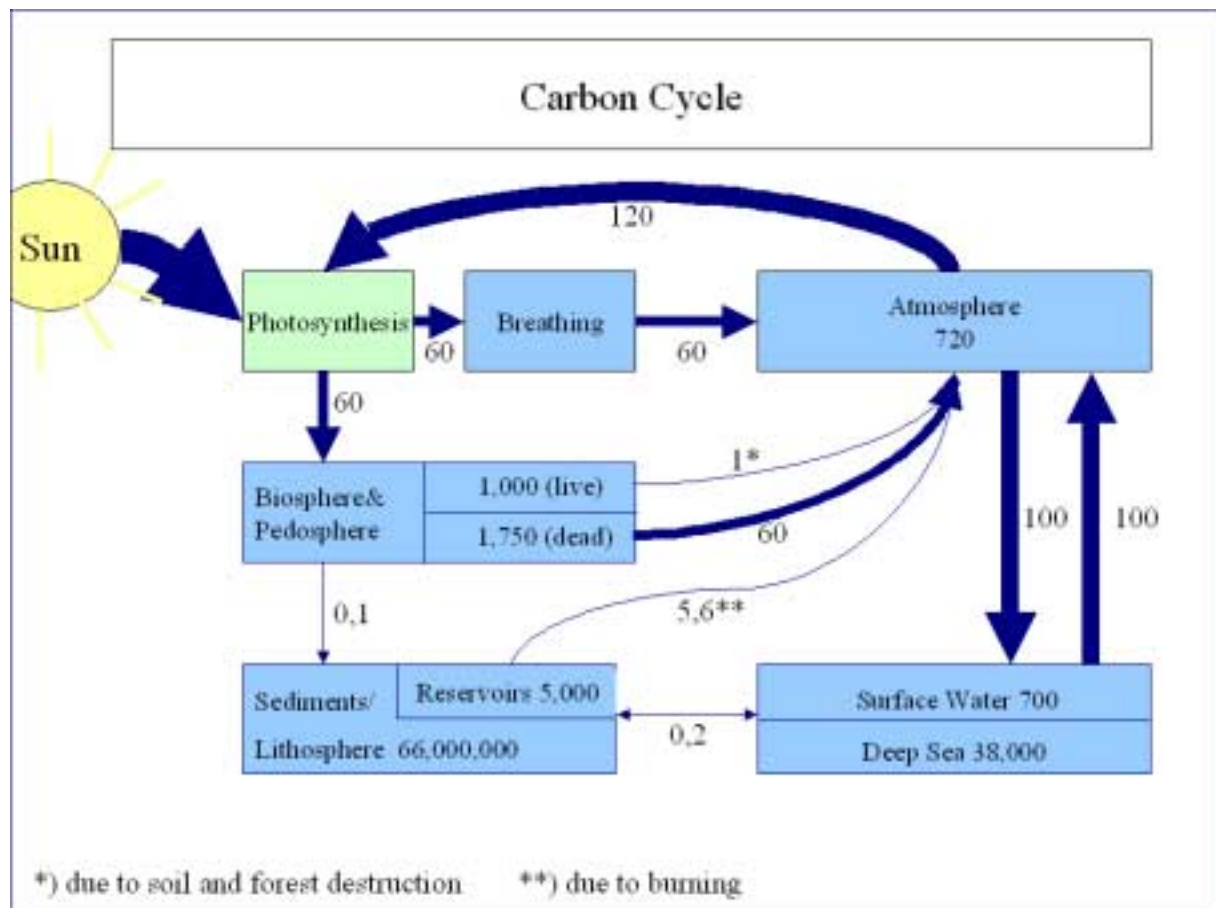


Abb.5.1: Kohlenstoffkreislauf (nach Deutscher Bundestag, 1988)

Die Abbildung zeigt den Stofffluss in Form von Pfeilen und die Kompartimente als Rechtecke an. Die Angaben erfolgen jeweils in Gt Kohlenstoff/a bei den Stoffflüssen, oder in Gt Kohlenstoff, die in den jeweiligen Kompartimenten gebunden sind.

Der terrestrische Kohlenstoffzyklus (Abb.5.1) zeigt an, dass zwei Wege existieren, welche das Kohlendioxid der Atmosphäre recyceln:

1. Der schnelle Umsatz der Photosyntheseprodukte durch die Atmung der Lebewesen. Dabei wird pro Jahr die Hälfte der gebildeten Biomasse der Pflanzen sofort wieder in Kohlendioxid umgewandelt.
2. Die andere Hälfte geht in die Bio- und Pedosphäre, wo der Kohlenstoff in Form pflanzlicher Biomasse (zumeist Holz) oder organischer Substanz im Boden vorübergehend gebunden wird. In diesen beiden Kompartimenten ist ein Fließgleichgewicht vorhanden, in dem jährlich jeweils 2,2% des gebundenen Kohlenstoffs abgebaut und die gleiche Menge wieder zugefügt wird.

Während der schnelle Umsatz der Photosyntheseprodukte in der Atmung inzwischen vollständig erforscht ist und auch weitgehend Klarheit über den Holzabbau durch Pilze besteht, ist die Umsetzung des Kohlenstoffs im Boden bislang noch nicht umfassend erforscht. Insbesondere ist immer noch nicht vollständig geklärt, welche Enzyme und Organismen für diesen Prozess verantwortlich sind.

5.1.2 Mechanismen der Humusdynamik

Wie in Abbildung 5.1 gezeigt wird, müssen alle organischen Substanzen, die im Boden vorkommen und einem konstanten Durchsatz unterliegen, irgendwann einmal abgebaut werden (Ertel, 1988; Schachtschabel et al., 1989). Während dieses Prozesses werden die leichter abbaubaren aliphatischen Teile (z.B. Kohlenhydrate) der Streu bevorzugt degradiert und die aromatischen Bestandteile des Pflanzenmaterials in Folge dessen angereichert. Dies ist durch die Analyse von intaktem Boden oder Kompost mit Hilfe der CP-MAS-NMR-Spektrometrie sehr gut dargestellt worden (Fründ und Lüdemann, 1989; Almendros et al., 1991). Anschließend findet der Abbau der aromatischen Bestandteile, wie beispielsweise des Lignins, statt. Die Oxidation der Abbauprodukte aromatischer Pflanzenbestandteile, der Polyphenole zu den entsprechenden Chinonen, scheint ein wichtiger Schritt bei der Bildung der Humuslage im Boden zu sein (Flaig et al., 1975). Diese Reaktion kann sowohl eine spontane chemische Autoxidation oder eine Oxidation, katalysiert durch mikrobielle Enzyme wie Laccase, Polyphenoloxidasen oder Peroxidasen sein. Die aromatischen Ringe als Bausteine des Huminsäurekerns,

stammen entweder vom Ligninabbau (Christman und Oglesby, 1971) oder aus dem Stoffwechsel der Bodenmikroorganismen (Haider et al., 1975; Atlas und Bartha, 1987; Flaig, 1988; Hedges, 1988; Pfaender, 1988; Ziechmann, 1988; Paul und Clark, 1989).

Es gibt zwei Wege, durch die phenolische Substanzen in Huminsäure umgewandelt werden:

- Die abiotische Oxidation, katalysiert durch Mineralien und Metallsalze.
- Die enzymatische Oxidation, durch Laccase und andere oxidative Enzyme.

Die abiotische Polymerisation von phenolischen Gemischen wurde (Wang et al., 1978; Wang und Huang, 1987, 1989) vielfach untersucht und dabei der katalytische Effekt unterschiedlicher Oxide wie Mangan, Eisen, Aluminium und Silizium bei einer Polymerisation aufgezeigt (Shindo und Huang, 1984).

Aufgrund der Arbeit von Haider und Martin liegen hinreichende Beweise für die Annahme vor, dass Phenoloxidasen (wie Peroxidasen oder Polyphenoloxidasen) eine wichtige Funktion im strukturellen Aufbau des Huminsäurekomplexes haben (Haider und Martin, 1967, 1970; Martin et al., 1967, 1972; Martin und Haider, 1969). In früheren Arbeiten wurde die Theorie entwickelt, dass die aromatischen Strukturen des Huminsäurekomplexes aus Substanzen abgeleitet werden, welche teilweise durch Bodenorganismen und spezielle Bodenpilze polymerisiert wurden. In späteren Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass phenolische Verbindungen nicht-pilzlicher Herkunft ebenfalls als Vorstufe der Huminsäuren dienen können. Martin et al. (1979) beschrieben den Abbau von ^{14}C -markiertem Brenzkatechin, und seine Aufnahme in die stabile Fraktion des Bodens und bezogen dieses Phänomen auf die Phenoloxidierenden Enzyme. Seitdem die Bedeutung der Quervernetzung von phenolischen Verbindungen bei der Humusbildung bekannt ist, wurde unter Einsatz verschiedener Peroxidasen (Berry und Boyd, 1984, 1985; Schnitzer et al., 1984; Simmons et al., 1988) und laccaseähnlichen Phenoloxidasen (Martin und Haider, 1980; Bollag et al., 1980, 1982; Filip und Preusse, 1985) intensiv geforscht. Suflita und Bollag (1981) zeigten, dass die Umwandlung von Phenolen zu Huminsäureähnlichen Substanzen ebenso in vitro durch Enzyme, welche aus dem Boden extrahiert wurden, erreicht werden konnte. Leonowicz und Bollag (1987) extrahierten und charakterisierten biochemisch die Laccaseaktivität von Böden.

Die chemische Reaktivität der hier beteiligten Prozesse konnte am Besten durch die Tatsache demonstriert werden, dass gerade Aminosäuren und Zucker wie Glycin, Lysin, Cystein und Glucosamin in Huminsäuresubstanzen eingebunden und nach dem Einbau widerstandsfähiger gegen den mikrobiellen Angriff im Boden waren (Martin und Haider, 1980). Anhand der gesammelten Informationen war anzunehmen, dass die unspezifische Polymerisation von Phenolen und Lignin der grundlegende Mechanismus ist, durch den der Kern der Huminsäure-ähnlichen Bodensubstanzen gebildet wird. Diese Reaktionen wurden entweder durch Radikal-spendende Enzyme wie Peroxidase und Laccase, Ionen oder Oxide, wie Mangan und Eisen oder Aluminium- und Silizium-Oxide sowie im Boden vorkommende Mineralien, katalysiert. Die Quelle der Aromaten könnten die aromatischen Reste der Streu, die Abbauprodukte der streuzersetzenden Mikroorganismen, oder die Wurzelsubstanzen der Bäume sein.

5.1.3 Gelöster organischer Kohlenstoff in der Bodenlösung

Lösliche niedermolekulare Substanzen in der Bodenlösung sind wichtige Faktoren für den Abbau der organischen Substanz und der anschließenden Humusbildung. Beurteilt man die Lignin-Polymerisation nach früheren Erfahrungen (Milstein et al., 1989; Kharazipour et al., 1991), wird angenommen, dass einige der Reaktionen, die zur Polymerisation des Humus führen können, an der Oberfläche der Bodenmatrix auftreten und so wasserlösliche Partner entstehen. Der gelöste organische Kohlenstoff (DOC) in der Bodenlösung ist ein wichtiger Faktor während der Bodenbildung (Scheffer und Ulrich, 1960; Schachtschabel et al., 1989). Unter dem Begriff DOC wird ein breites Spektrum organischer Substanzen zusammengefasst. Durch den Einsatz der Pyrolyse-Feld-Ionisations-Massenspektrometrie wurden die folgenden Substanzklassen in der DOC Fraktion von Ausschwemmungs- oder Moder-Profilen unter Kiefern-Eichen Mischwäldern gefunden und in der Reihenfolge ihrer quantitativen Wichtigkeit aufgezählt (Hempfling und Schulten, 1990):

- monomere und dimere Untereinheiten von Lignin
- Benzol-Derivate wie Phenole und ihre Methoxyl-, Carboxyl- und Alkyl-Derivate
- Aminosäuren, Peptide, Proteine, N-acetylierte Aminosäuren und andere stickstoffhaltige Verbindungen
- Kohlenhydrate

Diese Verbindungen wurden gemeinsam mit Sterol, Steranen, Tocopherolen, Fettsäuren, Alkanen und Alkenen gefunden. Der gesamte Metabolismus der Bodenflora und Fauna spiegelt sich in der Zusammensetzung der DOC und der Mehrheit der Chemikalien wider, die nachweislich aromatischer Natur sind.

Göttlein (1988) folgte in seiner Arbeit einem anderen Denkansatz. Er unterteilte die organische Fraktion in zwei Gruppen, die polaren und weniger polaren. Ein weiteres Klassifizierungsprinzip war das Molekulargewicht, welches mit Hilfe der HPLC bestimmt wurde. Mit Hilfe dieses experimentellen Ansatzes war Göttlein in der Lage, eine semiquantitative Klassifikation der DOC-Verbindungen aufzuzeigen, ohne jedoch ihre Struktur kenntlich machen zu können. Die Polarität und der Säuregehalt der DOC Moleküle wurde durch den Gehalt an Phenol- und Carboxylgruppen bestimmt. Nach Cronan (1985) war die Fraktion von polaren Verbindungen in sauren Böden höher.

Solche Analysen sind aufgrund unterschiedlicher Verbindungen in verschiedenen Extrakten sehr unterschiedlich. Viele Wissenschaftler arbeiten seitdem am Aufbau der DOC in Waldböden und stimmen darin überein, dass Zucker und Phenole ihre Hauptkomponenten sind. In sauren Böden änderte sich der Zuckergehalt der Bodenlösung in Abhängigkeit von der Jahreszeit. So konnte der Zuckergehalt im Herbst 2/3 der kompletten DOC ausmachen (Göttlein et al., 1991, Göttlein und Pruschka, 1991). Diese gemessenen Werte waren wesentlich höher als die Werte, die von Greenland und Oades (1975) für verschiedene Waldökosysteme ermittelt wurden. Die Änderung im Abbau der DOC, die Göttlein et al. (1991) und Göttlein und Pruschka (1991) gemessen haben, weist auf eine Dynamik der Balance zwischen Humusbildung und -zersetzung hin.

5.1.4 Modell der Bildung und des Zusammenbruchs Huminsäure-ähnlicher Substanzen

Unter Berücksichtigung der vorliegenden Fakten und relevanten Theorien über die Humusbildung und Humusdisintegration wurde von Ulrich (1981) das folgende Modell aufgestellt, welches sich an den biochemischen Grundlagen des Ligninabbaus durch Weißfäulepilze orientiert. Basierend auf diesen Betrachtungen und den Daten der Lignindynamik, stellte Ulrich (1981) eine Hypothese auf, welche die Stickstoffauswaschung, die in deutschen Wäldern aufgrund der Änderung des chemischen Klimas durch den Säureaustrag beobachtet wird, erklären könnte. Sein Modell basiert auf folgenden Annahmen:

- Der Abbau und die Repolymerisierung der organischen Verbindungen im Boden, die Humusdynamik, basiert auf zwei verschiedenen enzymatischen Reaktionen:
 1. einer Polymerisation durch laccaseähnliche Enzyme
 2. einem enzymatischen Abbau durch Enzyme ähnlich den bekannten lignolytischen Systemen der Weißfäulepilze
- Die polymerisierenden Enzyme haben Eigenschaften ähnlich denen der Pilzlaccase. Sie haben ein pH-Optimum bei pH 5 und benötigen eine freie phenolische OH-Gruppe. Sie sind empfindlich gegenüber einem geringen pH und/oder OH-komplexierten Ionen wie Aluminium und Eisen (III).
- Die humusabbauenden Enzymsysteme haben Eigenschaften ähnlich denen der lignolytischen Systeme der Weißfäulepilze (pH-Optimum 3). Aufgrund der pKa Werte der fraglichen Phenole könnten die Enzyme gegenüber den Phenol-komplexierten Ionen weniger empfindlich sein.

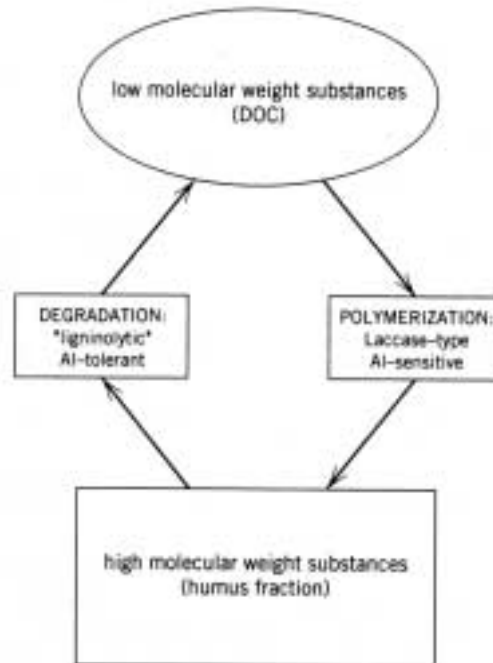


Abb.5.2: Modell der Humusdynamik
(Zeichnung aus Eichhorn und Hüttermann, 1994)

Das Modell (Abb.5.2) enthält die folgenden Kernaussagen:

1. Humusvorstufen werden durch Laccase polymerisiert.
2. Bei einer Komplexierung der organischen Substanzen mit Aluminium-Ionen wird die Humusdynamik gestört, die Repolymerisation der löslichen Stoffe in der Bodenlösung gehemmt und der Vorgang des Humusabbaus dadurch gefördert.
3. Auf diese Weise gelangen in sauren Böden erhebliche Mengen an Stickstoff in die Bodenlösung. Dieser wird bei einer Übersättigung des Waldökosystems mit der Bodenlösung ins Grundwasser verlagert und so aus dem Waldboden ausgetragen.

Diese Vorstellungen wurden theoretisch auf der Grundlage der damaligen Kenntnisse über den Ligninabbau und das Verhalten der dabei beteiligten Organismen und Enzyme entwickelt. Es wurde davon ausgegangen, dass sich der Humus biochemisch ähnlich dem Lignin verhält und im Boden ebenfalls ligninabbauende Organismen vorhanden sind.

Diese Sicht wurde - zumindest den Ligninabbau betreffend - in den darauf folgenden Jahren durch Arbeiten aus der Arbeitsgruppe Hüttermann, grundsätzlich bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene im Waldboden vorkommende Mykorrhizapilze in der Lage sind, Lignin abzubauen (Trojanowski et al., 1984; Hüttermann et al., 1986; Braun-Lüllemann et al., 1999). Zudem wurde nachgewiesen, dass die Reaktion von Laccase gegenüber Phenolen durch Aluminium-Ionen gehemmt wird (Jentschke, 1984).

Eichhorn (1995) zeigte an umfangreichen Messreihen der Fallstudie *Zierenberg* auf, dass in solchen Waldökosystemen in der Tat die Gefahr besteht, dass es aufgrund von chemischen Veränderungen der Bodenlösung zu Störungen der Humusdynamik und Ausschüttung von Stickstoffüberschüssen ins Grundwasser kommt.

5.1.5 Zielsetzung

Bislang ist dieses Modell noch nicht entsprechend seiner Wichtigkeit für das Verständnis der Dynamik der organischen Substanz im Waldboden überprüft worden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher entsprechende Untersuchungen durchgeführt.

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Grundrezept der Humus-Aktivierung

5.2.1.1 Material

Wasserbad, Tischwaage, Weithals-Erlenmeyerkolben, Pipetten und -spitzen, Reagenzgläser und -ständer, Spatel, Glasküvetten, 0,1M NaOH, Mc Illvaine pH 4,5, Laccase, Humus, Materialien/Chemikalien für den ABTS-Test, Waage

5.2.1.2 Methode

Grundrezept:

0,8g Humus

1,6ml Laccase

1,6ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5

Bei diesem Ansatz handelt es sich um das Grundrezept der Ligninaktivierung. Es wurde dahingehend verändert, dass anstelle von Lignin, Humus für die Versuche verwendet wurde. Die Laccase wurde aufgetaut, um ihre Aktivität mit Hilfe eines ABTS-Tests bestimmen zu können.

Anschließend wurde mit einer Pipette Mc Illvaine Puffer pH 4,5 zu dem bereits eingewogenen Humus gegeben.

Nachdem das Wasserbad die Versuchstemperatur von 45°C erreicht hatte, wurden die Kolben hineingestellt, die Laccase hinzugefügt und geschüttelt. In regelmäßigen Abständen wurden Proben für eine spätere HPLC-Aufarbeitung entnommen.

Der Humus wurde mit Hilfe eines Spatels vorsichtig ausgedrückt. Ein Teil des Humus wurde in Glasküvetten überführt, die zur Gewichtsbestimmung gewogen, tiefgefroren und für die ESR Messung verschickt wurden.

5.2.2 Aufarbeitung der Humus-Proben für die HPLC

Die Humusproben wurde für die HPLC-Messungen vorbereitet und in jeweils drei Wiederholungen gemessen. Die Aufarbeitung der Proben und die Methodik der HPLC sind in Kapitel 3.2.2 nachzulesen.

5.2.3 Aufbereitung der Humus-Proben für die ESR

Das Humusmaterial wurde ausgedrückt, in Glasküvetten überführt, tiefgefroren und für die Elektronenspinresonanz (ESR)-Bestimmung weitergeleitet.

Für die ESR-Bestimmung wurden die Proben an die Universität des Saarlandes, Homburg, in die Abteilung für Biophysik zu Händen Herrn Prof. Dr. Jürgen

Hüttermann und Herrn Dr. Kappl geschickt. Sie wurden dort mit einem Bruker ESP 300E gemessen.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

Für diese Versuchsreihe wurden verschiedene Aktivierungsansätze hergestellt. Anstatt der in früheren Versuchen verwendeten Ligninsulfonsäure wurde Humus zusammen mit Laccase und Mc Illvaine Puffer pH 4,5 eingewogen und inkubiert im Wasserbad. In regelmäßigen Abständen wurden Proben für die HPLC entnommen und später gemessen. Das Humusmaterial wurde für eine ESR-Bestimmung verwendet.

5.3.1 Anwendung der Ionpair-Size-Exclusion-Chromatographie auf Humusproben

Bislang gab es noch keine präzise Methode zur Bestimmung des Molekulargewichts von Huminstoffen. Daher galt es zu untersuchen, ob die für Lignin ausgearbeitete Methode der Ionpair-Size-Exclusion-Chromatographie (Majcherczyk und Hüttermann, 1997) auch auf Huminstoffe anwendbar ist.

5.3.1.1 Überprüfung der Trennleistung der HPLC-Säule

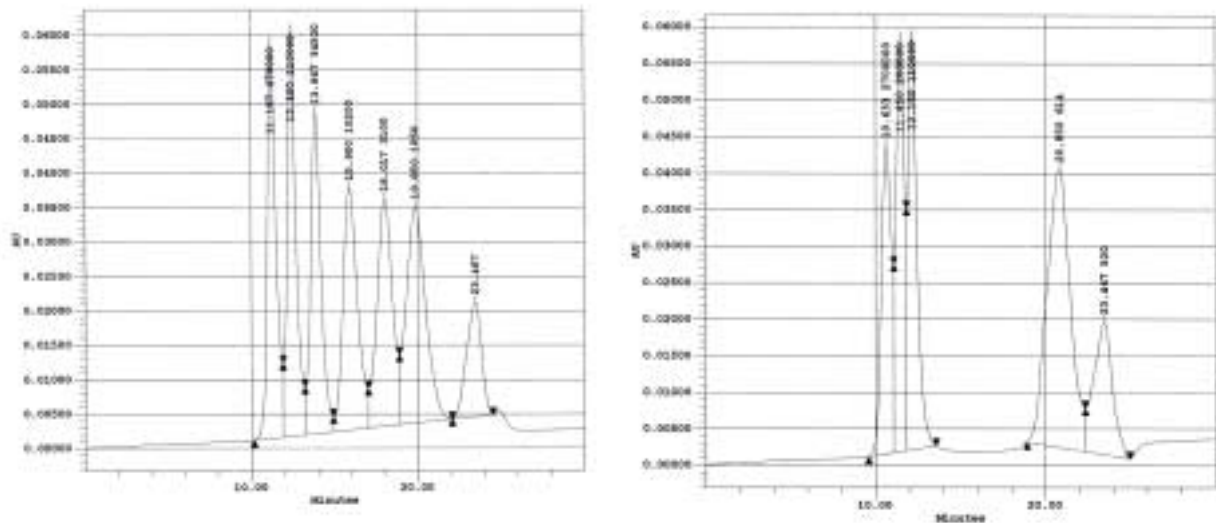


Abb.5.3: Molekulargewichtsstandards aus Polystyrol
als Beispiel für die Trennleistung der verwendeten Säule

Die Abbildung 5.3 zeigt, dass das gewählte Säulensystem die verwendeten Molekulargewichtsstandards aus Polystyrol im Molekulargewichtsbereich von ca. 150MW bis 150.000MW hervorragend auftrennt.

5.3.1.2 Überprüfung des Molekulargewichtsbereichs

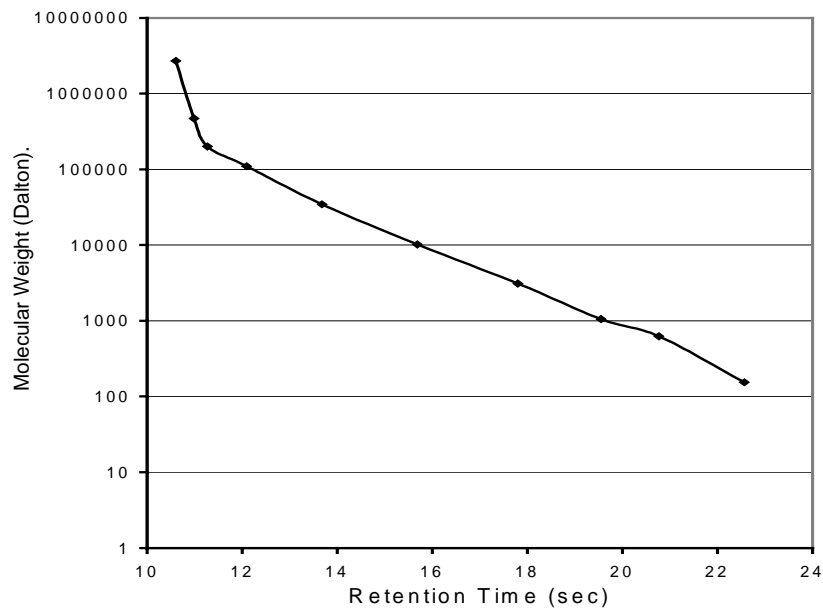


Abb.5.4: Abhängigkeit der Retentionszeit vom Molekulargewicht der eingesetzten Polystyrolstandards

Das System trennt über einen Bereich von drei Zehnerpotenzen mit einer linearen Proportionalität zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der Retentionszeit (Abb.5.4). Damit sollte die Methode geeignet sein, um in dem für Huminstoffe relevanten Molekulargewichtsbereich eingesetzt zu werden.

5.3.1.3 Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode

Die Humusproben wurden in jeweils drei Wiederholungen gemessen. Aus den Wiederholungen wurde der Mittelwert gebildet. Dabei war die spezifische Abweichung so gering, dass diese Methode als reproduzierbar anzusehen ist.

Tab.5.1: Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Probe	Molekulargewicht (Mw)	Mittelwert (Mw)
1 a	9.637	
1 b	9.749	9.619 ± 1,5 %
1 c	9.470	
2 a	2.634	2.589 ± 1,5 %
2 b	2.562	
2 c	2.571	
3 a	9.126	
3 b	9.092	9.146 ± 0,7 %
3 c	9.219	

5.3.1.4 Überprüfung der Chromatogrammmuster

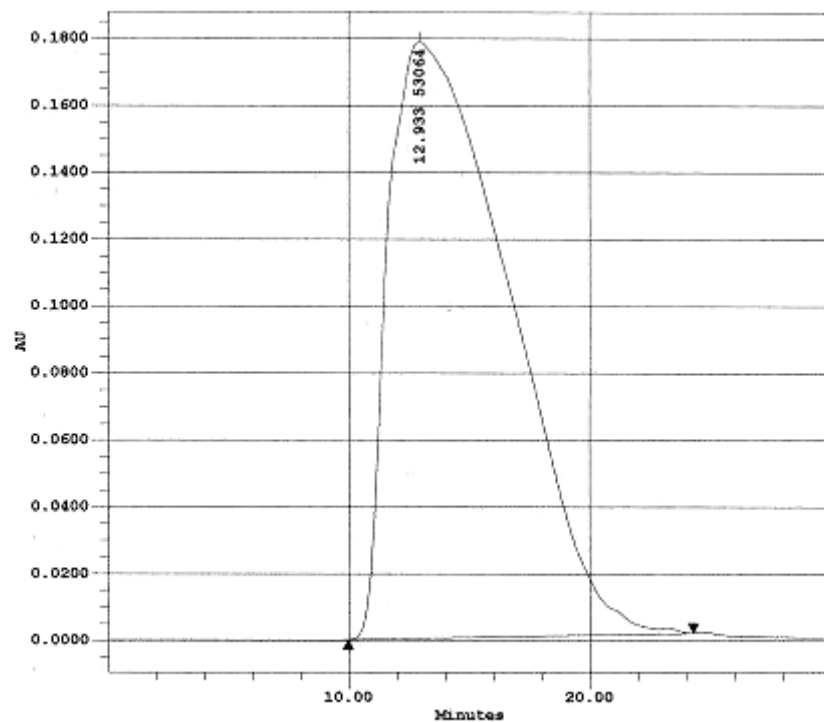


Abb.5.5: Chromatogrammmuster einer typischen Humusprobe

Das Chromatogrammmuster einer natürlichen Humusprobe (Abb.5.5) entsprach dem einer typischen Ligninprobe.

5.3.1.5 Überprüfung der Molekulargewichte von humusähnlichen Substanzen

Um zu untersuchen, ob die unsubstituierten Polystyrole als Molekulargewichtsstandards verwendet werden können, wurden die Molekulargewichte von zwei humusähnlichen Stoffen mit bekannten Molekulargewichten verglichen (Tab.5.2).

Das Ergebnis zeigt, dass selbst im Falle von Actinomycin-D (Abb.5.6, links), das zur Hälfte aus den Aminosäuren der beiden Peptidketten im Molekül besteht, die als Molekulargewicht angegebene Größenordnung akzeptabel ist. Dieses trifft auch für den Vergleich mit Brilliant Blue G zu (Abb.5.6, rechts), welches ein sehr polarer Aromat ist.

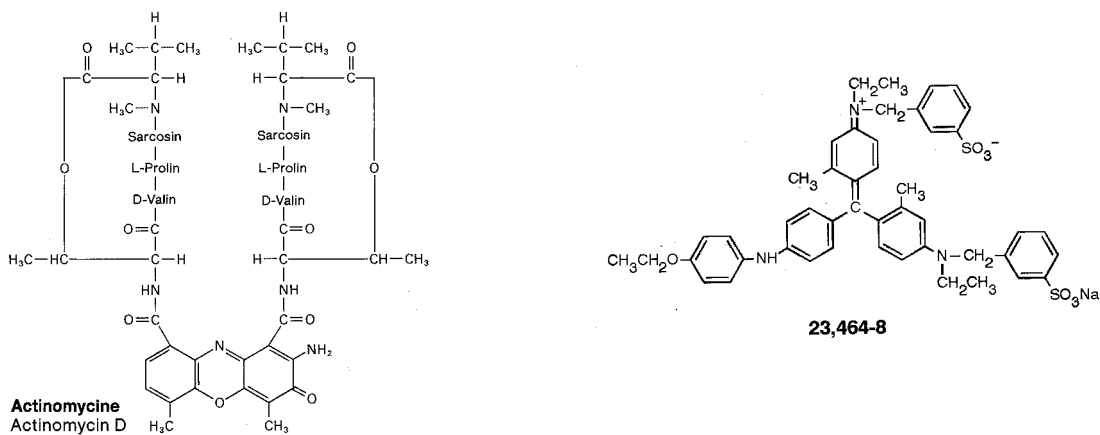


Abb.5.6: Formeln von Actinomycin (links) und Brilliant Blue G (rechts)

Tab.5.2: Vergleich der Molekulargewichte von bekannten humusähnlichen Substanzen

Substanz	Molekulargewichte	
	Formel	HPLC
Brillant Blue G	854,04	1.134
Actinomycin D	1255,50	2.305

5.3.1.6 Überprüfung der Molekulargewichte einer typischen Humusextraktion

Tab.5.3: Molekulargewichte einer typischen Humusextraktion

Fraktion	Mittleres Molekulargewicht
NaOH-Extraktion von Kompost:	57.900
Fällung der Lösung mit H ₂ SO ₄ :	
Überstand = Fulvosäuren	4.200
Sediment, in NaOH gelöst = Huminsäuren	54.600

Die Molekulargewichte einer typischen Humus-Aufarbeitung sind in Tab.5.3 aufgezeigt. Wie zu erwarten war, weisen der Alkali-Extrakt und die Huminsäuren-Fraktion praktisch identische Molekulargewichte auf, während die Molmasse der Fulvosäuren-Fraktion eine Größenordnung niedriger ist.

5.3.1.7 Einfluss der Gaszusammensetzung auf die Extraktion

Bei 120°C fand unter Druck und bei unterschiedlichen Gaszusammensetzungen eine Alkali-Extraktion statt. Die Ergebnisse zeigten, dass das Material aufgrund seiner Molekulargewichte keine erheblichen Unterschiede aufwies (Tab.5.4).

Tab.5.4: Einfluss der Gaszusammensetzung bei der Alkali-Extraktion von Huminsäure bei 120 °C unter Druck

Gaszusammensetzung	Mittleres Molekulargewicht
Luftgesättigte Lösung	39.500
Stickstoffatmosphäre	33.200

Bei der chromatographischen Untersuchung des Materials zeigten sich jedoch große Unterschiede. Auf der linken Seite (Abb.5.7) sieht man ein Chromatogramm, von Material, welches in luftgesättigter NaOH extrahierte. Auf der rechten Seite ist ein Chromatogramm (Abb.5.7) von Material zu sehen, dass in stickstoffgesättigtem Natriumhydroxid extrahierte.

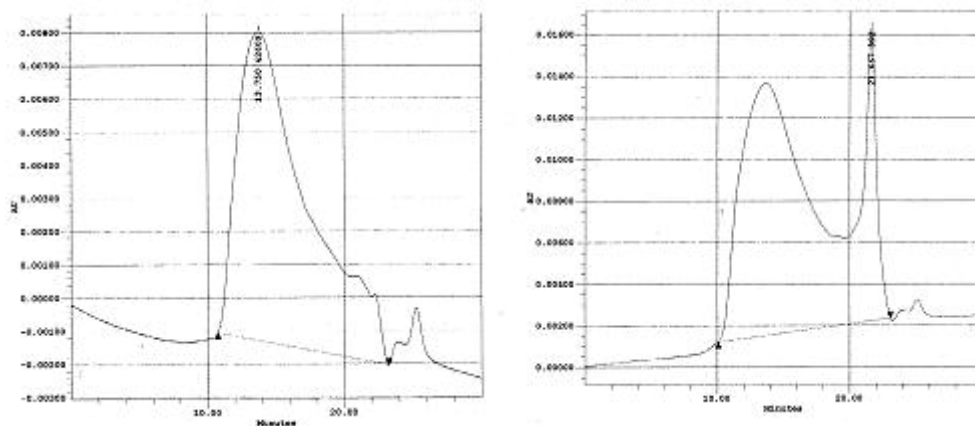


Abb.5.7: HPLC-Chromatogramme von Huminsäuren, die durch Alkaliextraktion bei 120°C unter Druck gewonnen wurden

Bei dem Aufschluss in der luftgesättigten NaOH kam es ganz offensichtlich zu Polymerisationen von niedermolekularen Huminstoffen, die bei der Extraktion in der Stickstoffatmosphäre erhalten blieben.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass mit der Ionpair-Size-Exclusion-Chromatographie eine brauchbare Methode zur Verfügung steht, mit der die relativen Molekulargewichte von Huminstoffen schnell und reproduzierbar bestimmt werden können.

5.3.1.8 Polymerisation von Huminsäure durch Laccase

Um zu überprüfen, ob Laccase wirklich in der Lage ist, Humus zu polymerisieren, wurde durch Alkaliextraktion aus Kompost gewonnene Huminsäure bei 30°C mit Laccase umgesetzt. Obwohl es sich um einen wasserunlöslichen Stoff handelt, der als Suspension umgesetzt wurde, war die Reaktion mit Laccase eindeutig:

Tab.5.5: Polymerisation von Huminsäure mit Laccase

Probe	Mittleres Molekulargewicht (Mw)
Kontrolle	54.000
Laccase	390.000

Mit diesem Verfahren wurde zum ersten Mal gezeigt, dass auch Huminsäure durch Laccase polymerisiert werden kann.

Dieses wurde mit Hilfe von Sickerwasserproben der Versuchsfläche Zierenberg weiter untersucht. Die Polymerisation der organischen Substanz (DOC) aus Sickerwasser gelang jedoch nur bei einer einzigen Probe.

Tab.5.6: Polymerisation der organischen Substanz (DOC) in Sickerwasser

Probe	Mittleres Molekulargewicht (Mw)
Kontrolle	4.900
nach Inkubation mit Laccase	6.900

Dieser Versuch, konnte trotz mehrfacher Wiederholungen und intensiver Anstrengungen leider nicht bei anderen Proben wiederholt werden. Alle übrigen DOC-Proben aus Zierenberg waren derart mit Aluminium komplexiert, dass es sich auch nicht durch wiederholte Reinigung mit Hilfe eines speziellen Ionenaustauscher (Chelex) entfernen ließ.

5.3.2 Nachweis und Erhöhung von Phenoxy-Radikalen durch Inkubation mit Laccase

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche legten die Vermutung nahe, dass, vergleichbar mit Lignin, durch die Reaktion mit Laccase im Huminsäure-Molekül Radikale gebildet werden, welche dann zur Reaktion der Huminsäuremoleküle untereinander führen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden entsprechende Untersuchungen am Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes, Prof. Dr. Jürgen Hüttermann und Dr. Kappl, durchgeführt. Bei den durchgeführten Messungen an einem ESR-Spektrometer wurden ausschließlich Phenoxyradikale gefunden (Abb.5.8).

Diese Radikale wurden überraschenderweise auch in völlig unbehandelten, durch Alkali-Extraktion im Autoklaven isolierten Huminsäuren, gefunden. Selbst kommerziell erhältliche Huminsäure wies Phenoxyradikale auf.

Durch Inkubation mit Laccase wurde zunächst die Elektronenspindichte erheblich erhöht, nach einer gewissen Zeit jedoch wieder auf etwa die ursprüngliche Aktivität reduziert (Abb. 5.9). Damit verhält sich Huminsäure bei Inkubation mit Laccase analog zum Reaktionsmuster von Lignin mit dem gleichen Enzym (Hüttermann et al., 2000).

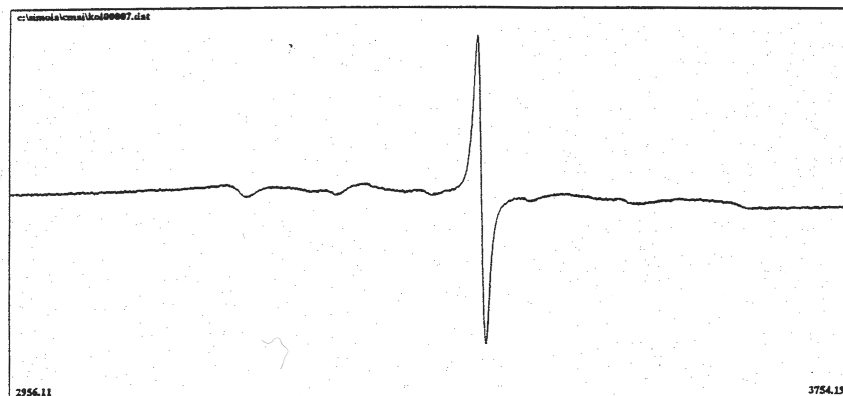


Abb.5.8: Elektronenspinresonanz-Signal von Phenoxyradikalen

Messbedingungen: 77°K, 9,5GHz, 20dB ESR-Dämpfung, Modulare Frequenz 100MHz, Modulare Amplitude 4Gauss

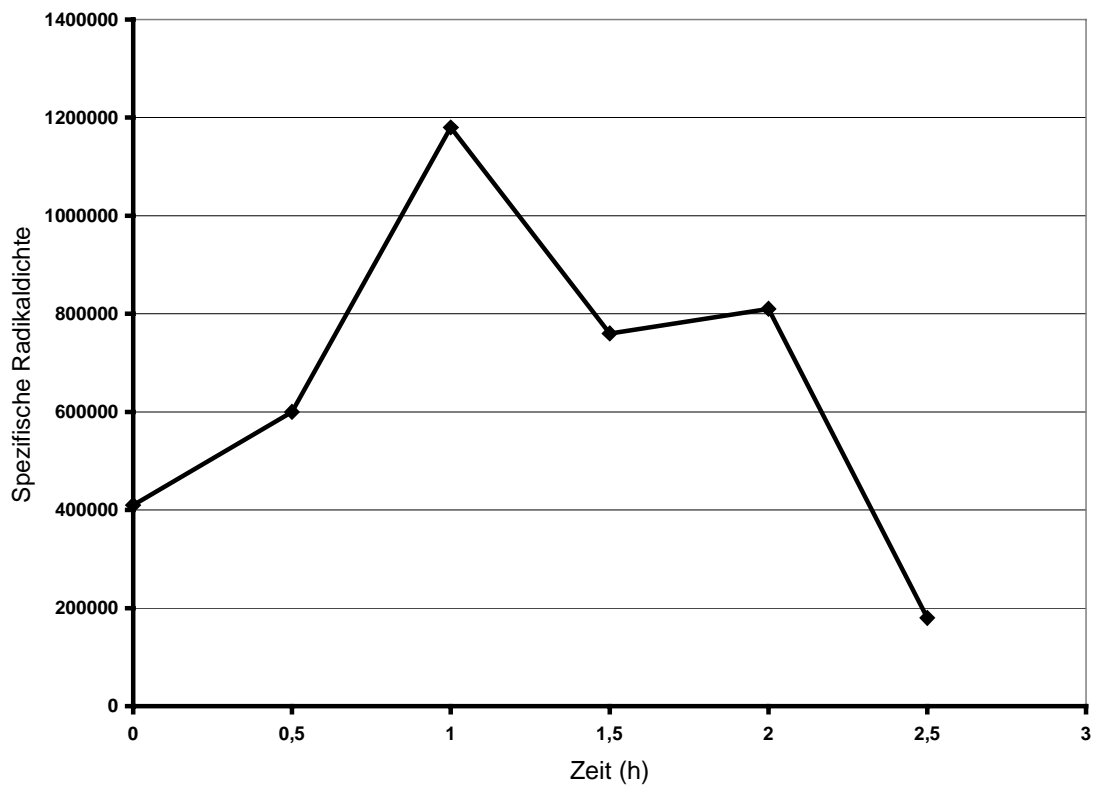


Abb.5.9: Spezifische Radikaldichte von Laccase-inkubierter Huminsäure in Abhängigkeit von der Zeitdauer der Inkubation

Die Ergebnisse der ESR-Untersuchungen zeigen, dass Laccase mit Huminsäure die gleiche Reaktion zeigt wie mit Lignin:

Es findet eine Ein-Elektronen-Elimination unter Bildung von Phenoxyradikalen statt, die eine bemerkenswerte Stabilität aufweisen. Bei längerer Inkubation kam es dann zu inter- und intramolekularen Quenchreaktionen, wodurch sich die Radikaldichte verringert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich der aus Kompost isolierte Humus in seinen Reaktionen mit Laccase weitgehend analog zu denen des Lignins mit Laccase verhält.

Die von Ulrich (1981) aufgestellte Hypothese über die Mechanismen der Humusdynamik konnte damit in den entscheidenden Annahmen nicht falsifiziert werden.

6 Modellversuche zur Humusbildung

6.1 Einleitung

Vergleicht man das Strukturmodell des Lignins (Abb.6.1.)

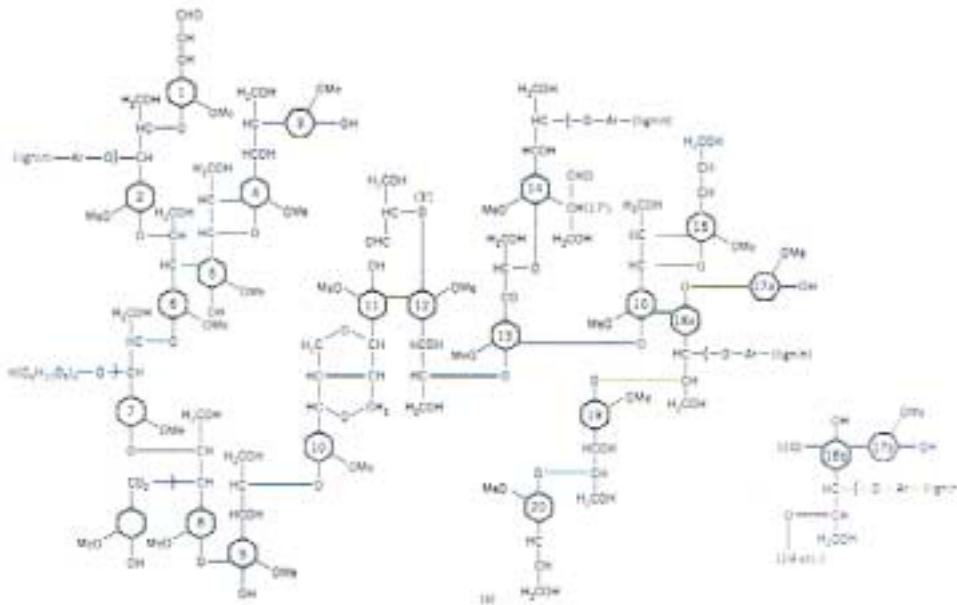


Abb.6.1: Strukturformel Lignin (Schachtschabel et al., 1989)

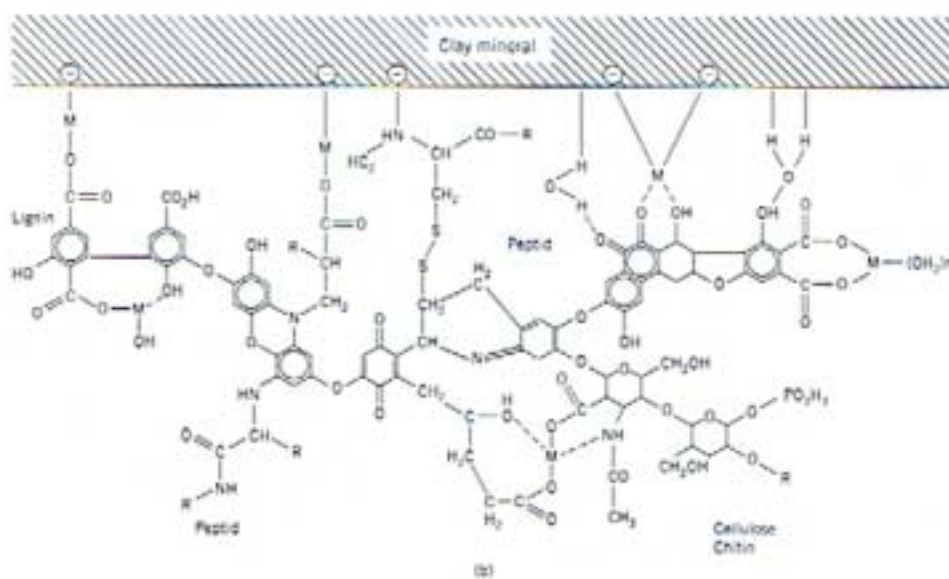


Abb.6.2: Strukturformel Humus (Schachtschabel et al., 1989)

mit dem des Humus (Abb.6.2), so stellen sich mehrere grundsätzliche Fragen:

1. Woher kommen die Aromaten im Humus? Ist das Lignin, die in der Natur mengenmäßig dominierende aromatische Substanz, die Vorläuferverbindung?
2. Wie kommt es zu der erheblichen Substitution des aromatischen Grundgerüsts mit aliphatischen Verbindungen, Kohlenhydraten und Stickstoffverbindungen?

Für die Bildung von Huminstoffen im Boden gibt es mehrere Möglichkeiten. Die wichtigsten werden in Abbildung 6.3 (Stevenson, 1994) gezeigt. Die klassische Theorie von Waksman (1932) ist die sogenannte *Lignin-Protein-Theorie*. Diese betrachtet Pflanzenlignin als Hauptbestandteil der Huminstoffe im Boden, welche unter Beteiligung von Aminoverbindungen durch mikrobielle Synthese produziert wurden (Weg 4, Abb.6.3). Der erste in Abbildung 6.3 dargestellte Weg zeigt, dass reduzierende Zucker und Aminosäuren, als Nebenprodukte des mikrobiellen Stoffwechsels, die einzigen Vorstufen der Huminstoffe sind. Die gegenwärtige Vorstellung der Huminstoffbildung favorisiert hauptsächlich den Mechanismus der *Polyphenol-Theorie*. Diese Theorie umfasst Polyphenole und Chinon, welche entweder aus Lignin abgeleitet (Weg 3, Abb.6.3), oder durch Mikroorganismen synthetisiert werden (Weg 2, Abb.6.3). In der Praxis laufen alle dargestellten Prozesse bei der Synthese von Huminstoffen ab. Ein Prozess, die *Polyphenol-Theorie*, überwiegt jedoch.

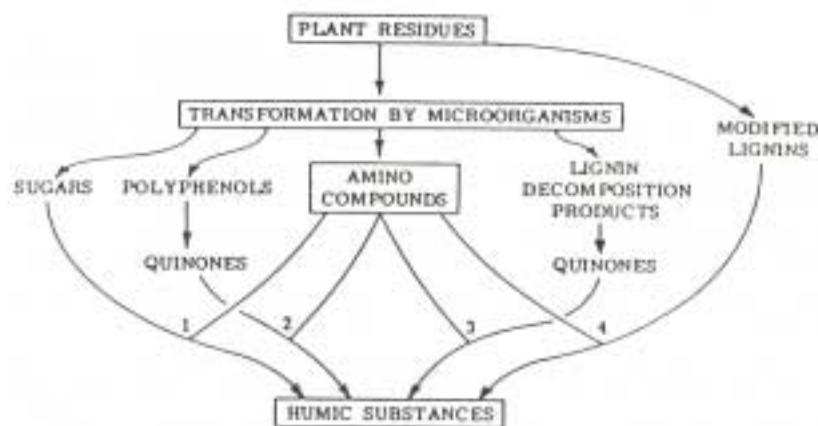


Abb.6.3: Wege der Huminstoffbildung im Boden (Stevenson, 1994)

6.1.1 Die Polyphenol –Theorie

Die zumeist akzeptierte Theorie ist, dass die Hauptbestandteile der Huminstoffe aus dem Polyphenol des Lignins entstehen, oder durch Mikroorganismen synthetisiert werden (vergl. Senesi und Loffredo, 2001). Der erste Schritt ist der Zusammenbruch der Pflanzenbiopolymere, einschließlich Lignin, in seine oligomeren Bestandteile. Mögliche Phenolquellen bei der Huminstoffbildung sind Pflanzenlignin, Glycoside, Tannine und Produkte der mikrobiellen Synthese. Gemäß der Hypothese von Flaig et al. (1975) wurden die Seitenketten der Lignin-Bestandteile, nachdem sie während des Abbaus der Pflanzenreste von der Zellulosebindung befreit wurden, oxidiert und dimethyliert. Dadurch entstanden Polyphenole, die durch Phenoloxidasen zu Chinon umgewandelt wurden. Chinon, das beispielsweise dem Lignin entstammte, reagierte mit stickstoffhaltigen Verbindungen und produzierte durch Polymerisation Humus-Makromoleküle zunehmender Komplexität. Die Abfolge der Humusbildung im Boden ist somit: FA - HA - Humus.

Die Rolle der Mikroorganismen als Polyphenolquelle ist bereits in früheren Arbeiten von Kononova (1966) hervorgehoben worden. Die Beobachtung, dass Huminstoff in Böden zunehmen konnte, ohne dass Lignin präsent war, spricht dafür, dass Huminstoffe auch ohne die Beteiligung von Lignin gebildet werden konnten. In kalten und feuchten Regionen wurden Huminstoffe beispielsweise von niedrigen Pflanzen wie Moose und Flechten gebildet, die kein Lignin enthielten. Bei der oxidativen und reduktiven Spaltung von Huminstoffen wurden phenolische Komponenten aus Lignin (Syringyl und Guajacyl Derivaten) und Mikroorganismen (Flavonoide) identifiziert. Das ist ein indirekter Beweis für die Beteiligung beider Systeme an der Huminstoffbildung (Stevenson, 1994). Bodeneigenschaften und -konditionen bedingen das Verhältnis von Lignin und Mikroorganismen als Quelle für phenolische Materialien der Huminstoff-Synthese. Phenolische Produkte sind im Boden nicht stabil und können daher der oxidativen Umwandlung zu Chinon unterliegen. Dies kann entweder chemisch in einem alkalischen Medium erfolgen oder durch Phenoloxidasen katalysiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Huminstoffe im Boden durch alle bereits beschriebenen Mechanismen gebildet werden können.

Die am meisten favorisierte Meinung ist die *Polyphenol-Theorie*. Das Ausgangsmaterial enthält organische Komponenten mit geringem Molekulargewicht aus dem Humus-Makromoleküle durch Oxidation, Kondensation und Polymerisationsreaktionen entstehen können. Die Zahl der möglichen Einzel-Moleküle und der involvierten chemischen Reaktionen ist sehr groß, ebenso wie die Zahl möglicher Kombinationen. Daraus mag die chemische Vielfalt der Humus-Makromoleküle resultieren, die eine fundamentale Ähnlichkeit ihrer Hauptbestandteile zeigen.

Bisher hat allerdings noch niemand gezeigt wie aliphatische Verbindungen unter Bodenbedingungen an die aromatische Grundstruktur angekoppelt werden. Während die Zahl der Arbeiten über Reaktionen zwischen aromatischen Monomeren und Lignin oder Humus inzwischen in den dreistelligen Bereich geht, gibt es keine bisher Arbeit, die sich mit der Reaktion von aliphatischen Verbindungen mit Lignin oder Humus beschäftigt hat. Dies liegt sicher auch daran, dass z.B. aliphatische Amine quantenchemisch ein vollkommen anderes Oxidationsverhalten aufweisen als aromatische (Pankratov et al., 2000).

Hüttermann et al. (Hüttermann et al., 2000) haben gezeigt, dass aktiviertes Lignin in der Lage ist, kovalent an Zellulose zu binden. Wenn dies der Fall ist, dann sollte auch eine Bindung an aliphatische Amine und Aminosäuren erfolgen.

6.1.2 Zielsetzung

In diesem Teil der Arbeit soll daher untersucht werden, inwieweit Lignin und Humus durch eine Reaktion mit Laccase an aliphatische Aminosäuren und Amine gebunden werden können.

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Gewinnung von reinem Humus aus Komposterde

6.2.1.1 Material

Tischwaage, Erlenmeyerkolben, Messkolben, Autoklav, Zentrifugengläser und -ständer, Zentrifuge, pH-Meter, Becherglas, Magnetrührer, Messzylinder, Schutzkleidung, Petrischalen, Alufolie, Schottflasche, Pipetten und -spitzen, 2M NaOH, Eis, Schwefelsäure (reinst), Komposterde, Spatel, Kühlschrank, Parafilm

6.2.1.2 Methode

Aus dem Kühlraum wurden 100g Komposterde entnommen, welche gleichmäßig mit 900ml 2M NaOH auf 2 Erlenmeyerkolben verteilt und vermischt wurden. Dabei sollte Schutzkleidung getragen werden, da 2M NaOH stark ätzend ist. Die Kolben wurden mit Alufolie verschlossen, anschließend nass autoklaviert und über Nacht stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurde das Volumen gleichmäßig, das heißt jeweils 125ml auf 8 Zentrifugengläser verteilt. Das Eigengewicht der Zentrifugengläser war sehr unterschiedlich, daher mussten sie mit einer Tischwaage genau austariert werden. Es wurden 8x125ml mit einem Messzylinder abgefüllt und gewogen. Mit Hilfe einer Pipette wurde so lange Flüssigkeit hinzugefügt oder entnommen, bis das Gewicht aller Gläser (mit Inhalt) gleich war.

Die verschlossenen Gläser wurden in der Zentrifuge 20min bei 2000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Gläser entnommen, die Überstände vorsichtig in ein Becherglas dekantiert und die Sedimente verworfen. Das Becherglas wurde, um den pH-Wert der Proben mittels Schwefelsäure (reinst) auf pH 5 einzustellen, auf Eis gelagert. Da hierbei Reaktionshitze entstand, musste das Glas gut gekühlt und die Schwefelsäure vorsichtig hinzugefügt werden. Ein Magnetrührer sorgte während der pH-Wert-Einstellung für eine gleichmäßige

Verteilung der Schwefelsäure. Anschließend wurde die Lösung in eine Schott-Flasche überführt und über Nacht im Kühlschrank gelagert, damit die Kolloide ausgefällt werden konnten.

Am darauffolgenden Tag wurde das Volumen der Lösung erneut aufgeteilt. Da etwa 1L der Lösung vorhanden war, wurden mit einem Messzylinder 500ml abgemessen und erneut auf Zentrifugengläser verteilt, je Glas ca. 62,5ml. Die Zentrifugengläser mussten erneut austariert werden.

Es folgte eine 20minütige Zentrifugation bei 2500rpm. Anschließend wurden die Überstände verworfen, die restliche Lösung gleichmäßig auf die Sedimente verteilt und gewogen. Die Lösung wurde erneut zentrifugiert und die Überstände ein weiteres Mal verworfen. Die restlichen Sedimente bildeten dann den gewonnenen Humus.

Mit einem Spatel wurden die noch etwas feuchten Sedimente in Petrischalen überführt und mit Parafilm verschlossen. Der Humus wurde zunächst im Gefrierfach aufbewahrt und später gefriergetrocknet.

6.2.2 Reaktion von CPG-Propylamin mit Humus

6.2.2.1 Material

Materialien/Chemikalien für den ABTS-Test, Tischwaage, Bechergläser, Spatel, Pipetten und -spitzen, Trockenschrank, Photometer, Vortex, Zentrifuge, Quarzküvette, Pyrexgläser und -ständler, CPG-Propylamin, 1M NH_4Cl , 0,1M NaOH, Humus, Mc Illvaine pH 4,5, Laccase, Horizontalschüttler

6.2.2.2 Methode

Zunächst wurde die Aktivität der Laccase mit Hilfe eines ABTS-Tests bestimmt (2664U/mL).

Danach wurden mit Hilfe der Tischwaage folgende Ansätze in Erlenmeyerkolben eingewogen:

Ansatz 1:

100mg CPG-Propylamin
40mg Humus
100µl Laccase
60µl Mc Illvaine Puffer pH 4,5

Ansatz 2:

100mg CPG-Propylamin
40mg Humus
160µl Mc Illvaine Puffer pH 4,5

Mit einem Spatel wurden die Substanzen vorsichtig zu einem relativ trockenen und körnigen Gemisch vermengt. Die Ansätze inkubierten über Nacht bei 80°C im Trockenschrank. Nach der Inkubation wurden 5ml 1M NH₄CL in die Bechergläser pipettiert, um die getrockneten Ansätze zu lösen. Die Ansätze wurden in ein Pyrexglas überführt, verschlossen und 30min zum Auswaschen auf einen Horizontalschüttler gestellt. Anschließend wurden die Ansätze vorsichtig bei 1000rpm für 2min zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde in ein neues Pyrexglas dekantiert. Da das Ammoniumchlorid (1M NH₄CL) nur sehr wenig aus den Glasperlen herauslösen konnte, folgte ein weiterer Waschvorgang mit 0,1M NaOH. Auf das Sediment wurden erneut 5ml 0,1M NaOH gegeben und die Ansätze gevortext. Anschließend wurden die Ansätze bei 1000rpm für 2min zentrifugiert und die Überstände in neue Pyrexgläser überführt.

6.2.2.3 Photometrische Bestimmung der CPG-Propylamin-Humus-Bindung

Zum quantitativen Vergleich der beiden Ansätze wurde eine Messung am Photometer durchgeführt. Bei einer Wellenlänge von 280nm wurden die Ansätze in Quarz-Küvetten gemessen. Als Referenz wurde 0,1M NaOH verwendet. Die Messung erfolgte in jeweils drei Wiederholungen.

Die beiden Überstände (5ml 1M NH₄CL + 5ml 0,1M NaOH) wurden zusammengegeben, gemischt und am Photometer gemessen.

6.2.3 Aufbereitung von Dimethylammoniumhydrochlorid

6.2.3.1 Material

Salzsäure (HCl), Schwefelsäure (H₂SO₄), Rotationsverdampfer, Rundkolben, Bidest, Filter, 1%ige Silbernitratlösung, Citronensäure (C₆H₈O₇), pH-Meter, Dimethylammoniumhydrochlorid (DMA-HCl)

6.2.3.2 Methode

6.2.3.2.1 Berechnung der Säure-Äquivalente

DMA-HCl	~	82,5g/mol
82,5mg	~	36,5mg HCl
1000mg	~	442mg HCl in 1g Substanz
		442mg/36,5mg = <u>12mg H⁺</u>

Schwefelsäure: MG = 98g; Dichte = 1,8; 95-98%

2mg H ⁺ /mMol	~	98g H ₂ SO ₄
12mg H ⁺	~	588g H ₂ SO ₄

Um genügend Überschuss zu erhalten wurde 1g H₂SO₄ hinzugefügt, um das Chlor zu verdrängen. Das bedeutet, 1g entspricht 0,55ml, so dass 600µl Schwefelsäure hinzugefügt werden mussten.

Für die quantitative Überführung bedeutet das, dass die Kapillare mit einem Glasschneider eingeritzt und geöffnet wurden. Die Substanz wurde mit Hilfe von Bidest durch einen Filter gegeben um mögliche Glassplitter herauszufiltern, und direkt in einem 50ml Rundkolben für den Rotationsverdampfer aufgefangen. Um Verluste zu vermeiden, wurde noch einmal mit Bidest nachgespült.

6.2.3.2.2 Chlorverdrängung

Dimethylammoniumhydrochlorid ist stark flüchtig und wird als Chlorsalz geliefert. Laccase wird in Gegenwart von Chlor inaktiv. Vor der Inkubation musste somit das Chlor entfernt werden. Mit Hilfe einer starken Säure wurden die Chlor-Ionen verdrängt und durch das Abdampfen mit dem Rotationsverdampfer der Lösung entzogen.

Nach Zugabe der Schwefelsäure wurde der pH-Wert, der sich im sauren Bereich befinden muss, kontrolliert. Die Lösung wurde mit Hilfe des Rotationsverdampfers eingeeengt, um die Chlordämpfe zu entfernen. Bei der Einengung musste zuerst ein Vakuum hergestellt werden, um den Kolben anschließend zu erhitzen. Insbesondere war darauf zu achten, dass die Lösung nicht zu sehr eingeeengt wurde. Eventuell vorhandene Chlorreste wurden mit einer 1%igen Silbernitratlösung nachgewiesen.

Falls im Konzentrat immer noch Chlorreste vorhanden waren, wurde die Lösung erneut mit Bidest aufgefüllt und bis zur vollständigen Entfernung des Chlors eingedampft. Der pH-Wert des resultierenden reinen Dikaliumhydrogenphosphats wurde mit Hilfe von reiner Citronensäure auf pH 4,5 eingestellt und konnte so für die Versuche eingesetzt werden.

6.2.4 Anbindung unterschiedlicher markierter Stickstoffverbindungen an Humus

6.2.4.1 Material

Stickstoffverbindungen

Die für die Versuchsreihen verwendeten Stickstoffverbindungen L-Tyrosin, Glutaminsäure und Dimethylamin stammen von der Firma Merck, während das Glycin der Firma Serva verwendet wurde.

Materialien/Chemikalien für den ABTS-Test, Weithals-Erlenmeyerkolben, Analysenwaage, Wasserbad, Alufolie, Zentrifugengläser, Zentrifuge, Petrischalen, Pipetten und -spitzen, Spatel, Schottflaschen, Laccase, Mc Illvaine Puffer pH 4,5 und 6, Bidest, 1M und 2M NaOH, 1M H₂SO₄, Glycin, Glutaminsäure, L-Tyrosin, Dimethylamin, Humus

6.2.4.2 Methode

Mit Hilfe des ABTS-Tests wurde die Aktivität der verwendeten Laccase bestimmt (1225 bis 2220nKat). Da bei diesen Versuchsreihen mit Aktivitäten um 800nKat gearbeitet wurde, musste die Laccase mit Hilfe von Mc Illvaine Puffer pH 4,5 entsprechend verdünnt werden. Die einzige Ausnahme bildete die Glutaminsäure, bei der Mc Illvaine Puffer pH 6 verwendet wurde. Dimethylamin musste für die Versuche in einem speziellen Verfahren aufbereitet werden. Um eine 25%ige Lösung zu erhalten, sind 2g Humus verwendet worden. Alle Ansätze erfolgten in Weithals-Erlenmeyerkolben in den unten angegebenen Mengen (Tab.6.1).

Tab.6.1: Einwaagen der Humusproben

N-Verbindung	Glycin	Glutaminsäure	L-Tyrosin	Dimethylamin
Einwaage	1g	1g	1g	7,5g
Humus	4g	2g	4g	2g
Mc-Illvaine-Puffer pH 4,5	20ml	7ml (pH 6)	7ml	--
Unverdünnte Laccase	15ml	10ml	10ml	13ml

Die Inkubation der Ansätze erfolgte über Nacht im Wasserbad bei Temperaturen um 36°C. Um die Ansätze während der Zeit der Inkubation vor Verdunstung zu schützen, wurden die Kolben mit einer Alufolie bedeckt, die Löcher für den Sauerstoffaustausch enthielt. Mit Hilfe von 1M und 2M NaOH wurden die Ansätze abgestoppt und auf Zentrifugengläser verteilt. Alle Erlenmeyerkolben wurden mit Bidest ausgespült und das Volumen ebenfalls auf Zentrifugengläser verteilt. Zum Ausfällen wurde den Lösungen 1M H₂SO₄ zugefügt und sie wurden bei 2000rpm 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Entnehmen aus der Zentrifuge wurde der Überstand mit Hilfe einer

Pasteurpipette abgesaugt und in Schottflaschen im Kühlschrank aufbewahrt. Das Sediment wurde in Petrischalen überführt und bei 70°C im Trockenschrank getrocknet. Das getrocknete Sediment wurde danach ebenfalls in Schottflaschen überführt und im Kühlschrank aufbewahrt.

Gewonnene Mengen:

Humus-Glutaminsäure ¹⁵ N	3,39 g
Humus-Glycerin ¹⁵ N	4,25 g
Humus-L-Tyrosin ¹⁵ N	3,69 g
Humus-Dimethylamin ¹⁵ N	2,06 g

6.2.5 Dünnschichtchromatographie der umgesetzten Humusverbindungen

6.2.5.1 Material

Ninhydrin

Bei allen Versuchsreihen wurde das Ninhydrin der Firma Merck verwendet.

Chromatographiekammer, Filterpapier, Kieselgel-F-Platten (fluoreszierend), Sprühflasche, 96% Ethanol (EtOH), Essigsäure (C₂H₄O₂), Ninhydrin, L-Tyrosin, Indulin, Trockenschrank, H₂O, 0,1M NaOH, Pipetten und –spitzen

6.2.5.2 Methode

Rezept Proben:

1mg L-Tyrosin/1ml H₂O

2mg Indulin/1ml 0,1M NaOH + 1mg L-Tyrosin

Die Chromatographiekammer wurde vor dem Versuch mit Filterpapier so ausgekleidet, dass die Außenwände bedeckt waren. Das Laufmittel wurde nach dem folgenden Rezept hergestellt.

Rezept Laufmittel:

63g Ethanol (96%)

37g H₂O

Zunächst wurde auf den Boden der Chromatographiekammer etwas Laufmittel gegeben. Dabei war zu beachten, dass nur soviel Laufmittel in der Kammer ist, dass sich sein Stand unterhalb der Auftragsfläche der Proben befand. Das Filterpapier sorgte für eine Laufmittel-Sättigung innerhalb der Kammer. Bevor die Platte in die Kammer gestellt wurde, musste das Filterpapier Laufmittel durchtränkt sein.

Die verwendeten Kieselgelplatten haben eine bereits vorgefertigte Probenauftragsfläche. Auf diese Fläche wurden mit Hilfe einer Pipette von jeder Probe ca. 20µl aufgetragen, wobei die Auftragungspunkte nicht zu dicht aneinander oder am Rand sein sollten. Die Platte wurde in die Kammer gestellt und wieder herausgenommen, nachdem das Laufmittel 2/3 der Kieselgelplatte erreicht hatte.

Ein Lauf dauerte ca. 2-3 Stunden. Nachdem die Platte aus der Kammer entfernt worden ist, wurde sie luftgetrocknet. Sollten die Retentionsfaktoren ermittelt werden, so musste der Stand der Laufmittelfront markiert werden.

Für die Auswertung wurde eine Anfärbe-Lösung für Aminosäuren hergestellt.

Rezept Anfärbe-Lösung:

0,2% Ninhydrin in 50ml 96% EtOH

10ml Essigsäure

Unter dem Abzug wurde das Färbereagenz gleichmäßig auf die Platte gesprüht und danach bei 100°C im Trockenschrank für insgesamt 15min zur Inkubation belassen. Alle Aminosäuren färbten sich dadurch rötlich.

6.2.6 Überprüfung der Bindung von ^{15}N -markierten Stickstoffverbindungen an Humus und Indulin mittels der Dünnschichtchromatographie

6.2.6.1 Material

Chromatographiekammer, Filterpapier, Kieselgel-F-Platten (fluoreszierend), Sprühflasche, 96% Ethanol, Essigsäure, Ninhydrin, L-Tyrosin, Indulin, Humus, Trockenschrank, H_2O , 0,1M NaOH, Bechergläser, 0,05M Schwefelsäure (H_2SO_4), Zentrifugengläser und -ständer, Analysenwaage, Zentrifuge, Dimethylamin (DMA), Glycin, Glutaminsäure

6.2.6.2 Methode

Alle ^{15}N markierten Proben wurden in einzelne Bechergläser gefüllt, um sie danach zu wiegen. Anschließend sollte in definierten Mengen solange 0,1M NaOH zugegeben werden, bis es zur vollständigen Lösung kam. Das war bei jeder Probe unterschiedlich. Die genauen Werte finden sich in Tab.6.2.

Tab.6.2: Werte der zugegebenen NaOH-Mengen

Proben	Gewicht (g)	Menge 0,1M NaOH (ml)
Humus Proben		
DMA	1,580	50
L-Tyrosin	3,207	250 (nicht vollständig gelöst)
Glycin	3,695	100
Glutaminsäure	2,893	50
Indulin Proben		
DMA	0,617	50
L-Tyrosin	0,823	150
Glycin	0,935	100

Die gelösten Proben wurden nun in Zentrifugengläser überführt. Zu jeder Probe wurde die gleiche Menge Schwefelsäure zugegeben. Da zumeist nicht das gesamte Probevolumen in ein Zentrifugenglas passte, wurde in mehreren Schritten zentrifugiert. Um Verluste zu minimieren, wurde für eine Probe immer ein und dasselbe Zentrifugenglas verwendet.

Anschließend wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet bei 80-100°C über Nacht im Trockenschrank getrocknet.

Am nächsten Tag wurde das trockene Pellet wieder mit einer entsprechenden Menge 0,1M NaOH vermengt, damit es in Lösung ging. Danach wurde jeweils ein Probevolumen von circa 30µl auf die Kieselgelplatten aufgetragen (Tab.6.3 und 6.4).

Tab.6.3: Pipettierschema der ¹⁵N markierten Proben auf Platte 1

Platte 1			
1. Spot	1mg DMA / 1ml 0,1M NaOH	H ₂ SO ₄ ausgefällt	Indulin
2. Spot	1mg DMA / 1ml 0,1M NaOH	H ₂ SO ₄ ausgefällt	Indulin
3. Spot	1mg Glycin/ 1ml 0,1M NaOH	H ₂ SO ₄ ausgefällt	Indulin
4. Spot	1mg Glycin/ 1ml 0,1M NaOH	H ₂ SO ₄ ausgefällt	Indulin
5. Spot	1mg DMA / 1ml 0,1M NaOH	H ₂ SO ₄ ausgefällt	Humus
6. Spot	1mg DMA / 1ml 0,1M NaOH	H ₂ SO ₄ ausgefällt	Humus

Tab.6.4: Pipettierschema der ^{15}N markierten Proben auf Platte 2

Platte 2			
1. Spot	1mg Glycin/ 1ml 0,1M NaOH	H_2SO_4 ausgefällt	Humus
2. Spot	1mg Glycin/ 1ml 0,1M NaOH	H_2SO_4 ausgefällt	Humus
3. Spot	1mg L-Tyrosin/ 1ml 0,1M NaOH	H_2SO_4 ausgefällt	Humus
4. Spot	1mg L-Tyrosin/ 1ml 0,1M NaOH	H_2SO_4 ausgefällt	Humus
5. Spot	1mg Glutaminsäure / 1ml 0,1M NaOH	H_2SO_4 ausgefällt	Humus
6. Spot	1mg Glutaminsäure / 1ml 0,1M NaOH	H_2SO_4 ausgefällt	Humus

Die Platte wurde mit Ninhydrin angefärbt, im Trockenschrank inkubiert und auf ihre Anfärbung hin untersucht.

Der gesamte Vorgang wurde so oft wiederholt, bis keine Aminosäurebanden nach der Anfärbung mehr zu sehen waren.

6.2.6.3 Messung der NMR-Spektren

Die ^{15}N NMR-Spektren wurden am Institut für Organische Chemie 1 der Universität Ulm, Prof. Dr. G. Maas, von Herrn Dr. Wertz mit einem Kernresonanzspektrometer, Bruker DRX 400 aufgenommen.

6.2.6.4 Massenspektrometrische Bestimmung

Die an den Humus gebundene Glutaminsäure wurde im Massenspektrometrie-Labor des Kompetenzzentrums Stabile Isotope (KOSI), der Forstlichen Fakultät der Georg-August Universität Göttingen von Herrn Dr. Jens Dyckmans gemessen.

6.2.7 Bindung von BSA an LSS und Indulin im Beisein und in Abwesenheit von 4-HBS

6.2.7.1 Material

4-HBS, BSA, 0,1M NaOH, Indulin, Ligninsulfonsäure, Laccase, Mc Illvaine Puffer pH 4,5, Tischwaage, Spatel, Pipetten und –spitzen, Wasserbad, Erlenmeyerkolben, Pyrexgläser und –stände, Alufolie, Ultraschallbad, Materialien/Chemikalien für den ABTS-Test

6.2.7.2 Methode

Nach Bestimmung der Laccaseaktivität wurden in 16 Erlenmeyerkolben je 0,8g Indulin und in 16 weitere Kolben je 0,8g Ligninsulfonsäure eingewogen. Anschließend wurden in jeweils 8 Kolben der unterschiedlichen Variationen 0,08g BSA gegeben. Als nächstes wurden mit Hilfe des verwendeten Mc Illvaine Puffers, 4-HBS-Lösungen unterschiedlicher Molarität angesetzt. Angesetzt wurden 0,2, 2 und 20mM 4-HBS-Lösungen. Die 4-HBS wurde später mit Hilfe der Laccase auf die vorgeschriebenen Konzentrationen verdünnt.

Berechnung:

2mM Lösung

$$\begin{array}{rcl}
 138,12\text{g} & = & 1\text{M} \\
 x & = & 0,002\text{M} \qquad x = \frac{0,002 \times 138,12}{1} = \underline{0,27624\text{g}} \\
 \\
 0,27624\text{g} & = & 1000\text{ml} \\
 x & = & 25\text{ml} \qquad x = \frac{25 \times 0,27624}{1000\text{ml}} = \underline{0,006906\text{g}}
 \end{array}$$

0,2mM Lösung

$$\begin{aligned}
 138,12\text{g} &= 1\text{M} \\
 x &= 0,0002\text{M} & x &= \frac{0,0002 \times 138,12}{1} = \underline{0,027624\text{g}} \\
 0,027624\text{g} &= 1000\text{ml} \\
 x &= 25\text{ml} & x &= \frac{25 \times 0,027624}{1000\text{ml}} = \underline{0,0006906\text{g}}
 \end{aligned}$$

20mM Lösung

$$\begin{aligned}
 138,12\text{g} &= 1\text{M} \\
 x &= 0,02\text{M} & x &= \frac{0,02 \times 138,12}{1} = \underline{2,7624\text{g}} \\
 2,7624\text{g} &= 1000\text{ml} \\
 x &= 25\text{ml} & x &= \frac{25 \times 2,7624}{1000\text{ml}} = \underline{0,06906\text{g}}
 \end{aligned}$$

Das Pipettierschema der Ansätze wird in den folgenden Tabellen 6.5 und 6.6 dargestellt:

Tab.6.5: Pipettierschema der Ligninsulfonatproben

0,8g Ligninsulfonat	ohne BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer ohne 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Ligninsulfonat	0,08g BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer ohne 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Ligninsulfonat	ohne BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer ohne 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5
0,8g Ligninsulfonat	0,08g BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer ohne 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5

0,8g Ligninsulfonat	ohne BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 0,2mM 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Ligninsulfonat	0,08g BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 0,2mM 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Ligninsulfonat	ohne BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 0,2mM 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5
0,8g Ligninsulfonat	0,08g BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 0,2mM 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5
0,8g Ligninsulfonat	ohne BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 2mM 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Ligninsulfonat	0,08g BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 2mM 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Ligninsulfonat	ohne BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 2mM 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5
0,8g Ligninsulfonat	0,08g BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 2mM 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5
0,8g Ligninsulfonat	ohne BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 20mM 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Ligninsulfonat	0,08g BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 20mM 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Ligninsulfonat	ohne BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 20mM 4- HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5

0,8g Ligninsulfonat	0,08g BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 20mM 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5
---------------------	-----------	--	-------------------------------------

Tab.6.6: Pipettierschema der Indulinproben

0,8g Indulin	ohne BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer ohne 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Indulin	0,08g BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer ohne 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Indulin	ohne BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer ohne 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5
0,8g Indulin	0,08g BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer ohne 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5
0,8g Indulin	ohne BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 0,2mM 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Indulin	0,08g BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 0,2mM 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Indulin	ohne BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 0,2mM 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5
0,8g Indulin	0,08g BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 0,2mM 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5
0,8g Indulin	0,8g Indulin	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 2mM 4-HBS	1,56ml Laccase

0,8g Indulin	0,8g Indulin	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 2mM 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Indulin	0,8g Indulin	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 2mM 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5
0,8g Indulin	0,8g Indulin	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 2mM 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5
0,8g Indulin	ohne BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 20mM 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Indulin	0,08g BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 20mM 4-HBS	1,56ml Laccase
0,8g Indulin	ohne BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 20mM 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5
0,8g Indulin	0,08g BSA	1,56ml Mc Illvaine Puffer mit 20mM 4-HBS	1,56ml Mc Illvaine Puffer pH 4,5

Alle Proben wurden in Erlenmeyerkolben angesetzt und zur Inkubation in ein 45°C heißes Wasserbad gestellt. Die Laccase wurde erst im Wasserbad zu den Ansätzen gegeben, um sofort eine 0h-Probe für die HPLC zu entnehmen. Zu dem Probevolumen von 100µl wurden jeweils 2ml 0,1M NaOH hinzugegeben. Nach dreistündiger Inkubation wurde eine weitere HPLC-Probe entnommen und für die Messung aufgearbeitet.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

6.3.1 Versuche mit CPG-Propylamin

Die einfachste Versuchsanordnung, um festzustellen, ob eine Reaktion zwischen zwei Verbindungen stattfindet, ist eines der beiden Edukte an eine feste Matrix zu binden. Dieses war möglich, indem man mit Controlled-Pore-Glass (CPG) arbeitete, an dessen Oberfläche Aminopropyl gebunden war (Abb.6.4).

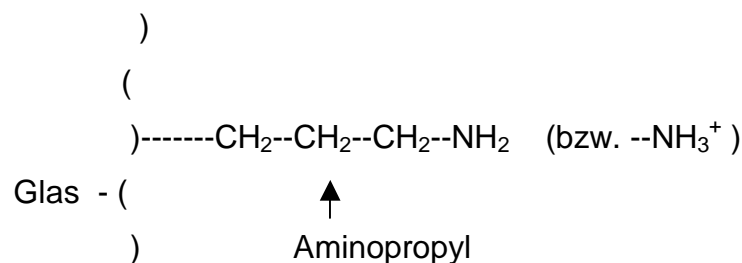


Abb.6.4: Aufbau von Glas-Propylamin.

6.3.2 Bindung von Ligninsulfonat an CPG-Propylamin

In einer Pufferlösung wurden 20mg Ligninsulfonat mit Laccase und 100mg CPG-Propylamin über Nacht umgesetzt. Der Überstand wurde dekantiert und durch 10ml 1M NaOH ersetzt. Diese CPG-Suspension wurde 30min auf einem Horizontalschüttler geschüttelt, abgesaugt und mit NaOH gespült. Im gesammelten Filtrat wurde der Ligningehalt photometrisch bestimmt.

Das Ergebnis war deutlich: in der Kontrolle ohne Laccase fand keinerlei Bindung des Ligninsulfonates an das CPG-Propylamin statt. Bei der Probe mit Laccase hingegen konnten insgesamt 16,3mg Ligninsulfonat an 100mg CPG-Propylamin gebunden werden.

Um diese Bindung weiter zu untersuchen wurde eine filtrierte CPG-Propylamin-Probe getrocknet und mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht.

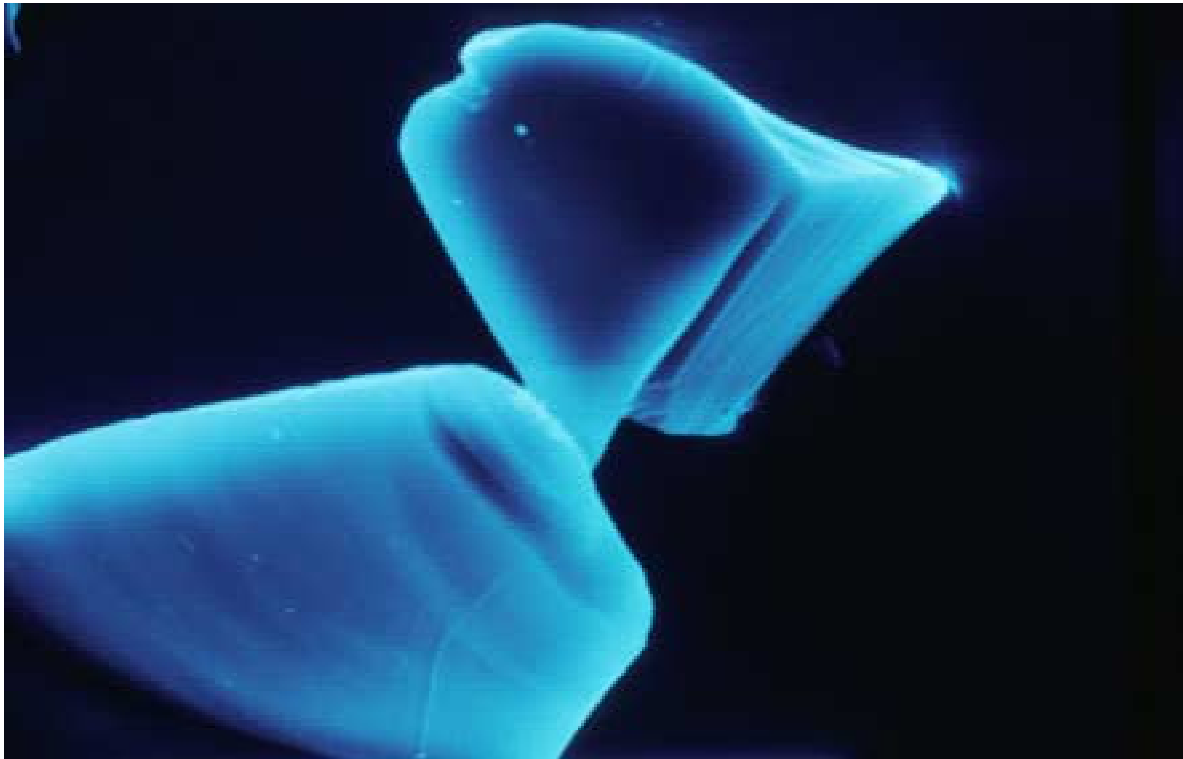


Abb.6.5: Zwei durch Ligninsulfonat kovalent gebundene CPG-Propylamin-Kügelchen (50fache Vergrößerung)

Es zeigte sich, dass trotz halbstündigen Schüttelns und der anschließenden Trocknung im Hochvakuum die beiden Glaskugeln fest miteinander verbunden waren. Dies zeigt, dass die Bindung des aktivierten Ligninsulfonats an das Propylamin so fest ist, dass sie sogar das mit einer ziemlich hohen mechanischen Belastung verbundene Wandern des Meniskus durch die beiden Kugeloberflächen während der Trocknung im Hochvakuum ausgehalten hat.

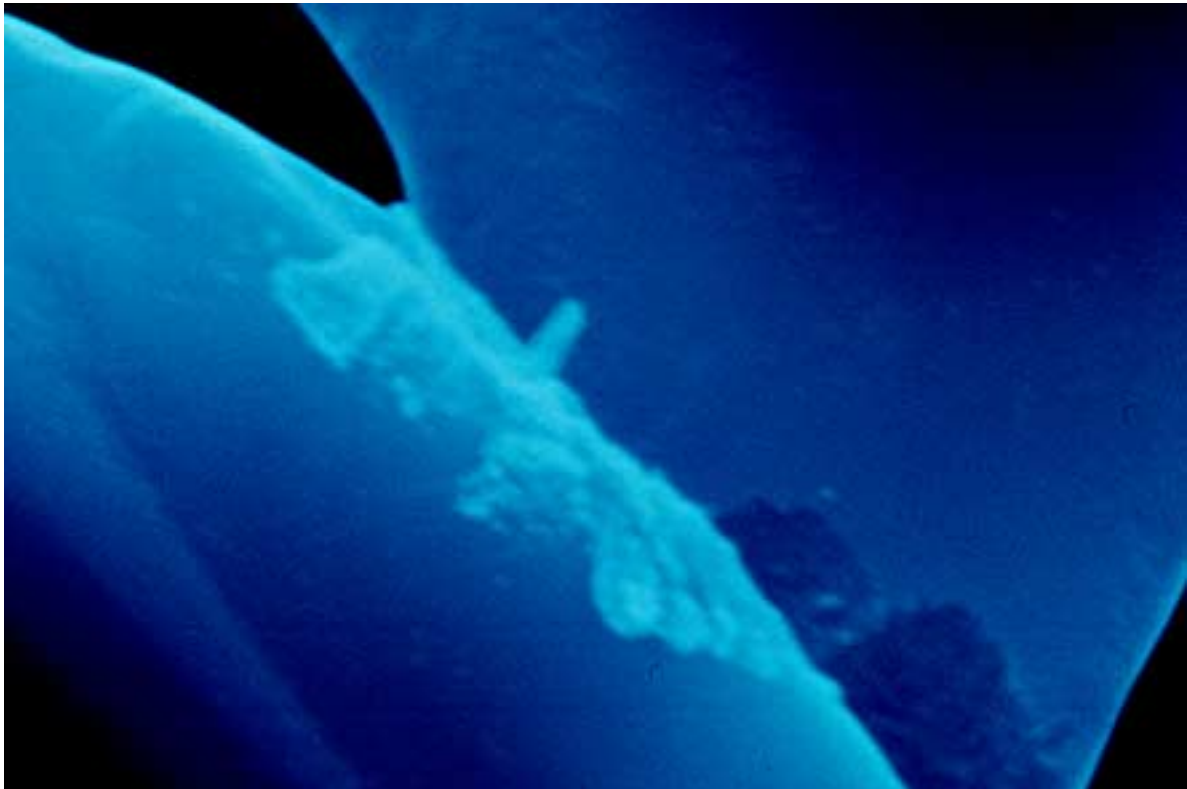


Abb.6.6: Leimfuge der durch Ligninsulfonat kovalent gebundenen CPG-Propylamin-Kugeln (500 fache Vergrößerung)

6.3.3 Bindung von Humus an CPG-Propylamin

Nach der gleichen Methode wie die Bindung von aktiviertem Ligninsulfonat wurde auch die Bindung von Humus an CPG-Propylamin untersucht.

Tab.6.7: Ergebnisse der Auswaschversuche

	Ansatz 1	Ansatz 2
Extinktion (E) 1 : 100 verdünnt	---	0,2344

Die Ergebnisse zeigen, dass ein Teil des Humus alkalifester an das Propylamin gebunden wurde. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch aliphatische Amine enzymatisch durch Laccase sowohl an Lignin als auch an Humus gebunden werden können.

6.3.4 Reaktion von ^{15}N -markierten Stickstoffverbindungen mit Humus

Zur Umsetzung von ^{15}N -markierten Verbindungen, wie Dimethylamin und verschiedene Aminosäuren, reagierten diese miteinander für etwa 22h in einem thermostatisierten Schüttelbad.

Nach der Trocknung wurde von allen Proben eine ^{15}N -Bestimmungen gemacht. Der Gehalt an ^{15}N -Stickstoff betrug circa 60%.

6.3.5 Dünnschichtchromatographische Überprüfung des Reinheitsgrades der hergestellten Kopplungsverbindungen

Zur Untersuchung des Reinheitsgrades wurden die Produkte für eine Dünnschichtchromatographie verwendet. Die Dünnschichtchromatographie des ungereinigten Kopplungsprodukts zeigte bei allen Varianten einen Lignin- bzw. Humus-Spot sowie eine zusätzliche deutliche Aminosäurebande. Dies zeigt, dass die Trennung von Edukt und Produkt noch nicht hinreichend war. Daher wurden die Produkte zur weiteren Aufreinigung erneut mit Säure gefällt und wieder in Alkali gelöst.

Nach der 3. Ausfällung waren außer bei L-Tyrosin in Humus bei allen übrigen Proben keine Aminosäurebanden mehr zu erkennen. Die L-Tyrosin-Humus-Probe musste daher weiteren Ausfällungs- und Wiederauflösungszyklen unterworfen werden, bis auch hier keine Aminosäurebande mehr zu beobachten war.

6.3.6 Untersuchung des Stickstoffgehalts der umgesetzten Proben

Die hergestellten Kopplungsprodukte von Aminosäuren und Humus wurden massenspektrometrisch auf ihren Stickstoffgehalt untersucht. Dabei wurden folgende Werte erhalten:

Tab.6.8: Stickstoffgehalt der Proben

Name	Einwaage	N-Menge (μg)	N-Gehalt in %
50% Glutaminsäure	2,030	74,65	3,68
25% Glutaminsäure	2,992	102,50	3,43
10% Glutaminsäure	2,336	78,62	3,37
25% Ethylamin	2,560	107,79	4,21
12,5% Ethylamin	2,882	105,97	3,68
5% Ethylamin	2,098	67,84	3,23
25% Glycin	2,770	122,28	4,41
12,5% Glycin	2,863	105,30	3,68
5% Glycin	2,779	79,79	2,87
50% Tyrosin	2,605	85,85	3,30
25% Tyrosin	2,073	56,44	2,72
10% Tyrosin	2,289	58,66	2,56

Der durchschnittliche N-Gehalt des eingesetzten Humus betrug 0,8% N.

Im Ergebnis war eine deutliche Erhöhung des N-Gehalts zu verzeichnen. Zudem stieg, abgesehen von dem Reaktionsprodukt zwischen Humus und Glutaminsäure, der N-Gehalt mit steigender Konzentration des Edukts in der Reaktionslösung deutlich an.

6.3.7 Untersuchung des ^{15}N -Gehalts der umgesetzten Proben

Sechs verschiedene Glutaminsäure-Produkte wurden an Humus gebunden und im Massenspektrometrie-Labor des KOSI gemessen.

Tab.6.9: ^{15}N -Gehalt von Humus und den Kopplungsprodukten

Probe	^{15}N-Atomprozent
Unmarkierter Humus	0,369535
	0,369378
Glutaminsäure an Humus gekoppelt:	62,434719
	62,308625
	62,040151
	60,441896
	61,784889
	60,250432

Die Erhöhung des ^{15}N -Atomprozent von 0,4 auf 61% entspricht relativ gut den in Versuchen mit unmarkierter Glutaminsäure gemessenen Stickstoffgehalten in reinem Humus und dem Kopplungsprodukt.

6.3.8 NMR-Spektren

Um eine Vorstellung von der chemischen Natur der Bindung der Stickstoffverbindungen an den Humus zu erhalten, wurde das Material am Institut für Organische Chemie 1 der Universität Ulm, Prof. Dr. Maas, von Herrn Dr. Wertz untersucht.

N15IG, Inverse gated, Relax-Delay-4 sec, p1-12 (ca. 40 Grad); Probe: Dimethylamin/Humus in ca. 1 m NaOD
 Sereetzung??

```

Current Data Parameters
NAME      dma
EXPNO     2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20030516
Time      17.36
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBI 1H-BB
PULPROG   zgpg
TD         65536
SOLVENT   D2O
NS         1962
DS         4
SWS        37878.789 Hz
FIDRES     0.577984 Hz
AQ         0.8651752 sec
RG         65536
DW         13.200 usec
DE         100.00 usec
TE         300.0 K
D1         4.00000000 sec
d11        0.03000000 sec
MCREST     0.00000000 sec
MCMRRC     0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       15N
P1         10.00 usec
PL1        -4.00 dB
SFO1       40.5485945 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    waltz16
NUC2       1H
PCPD2      90.00 usec
PL2         5.00 dB
PL12       24.00 dB
SFO2       400.1316005 MHz

F2 - Processing Parameters
SI         32768
SF         40.5603010 MHz
MOM        EM
SSB        0
LB         5.00 Hz
GB         0
PC         1.50
    
```

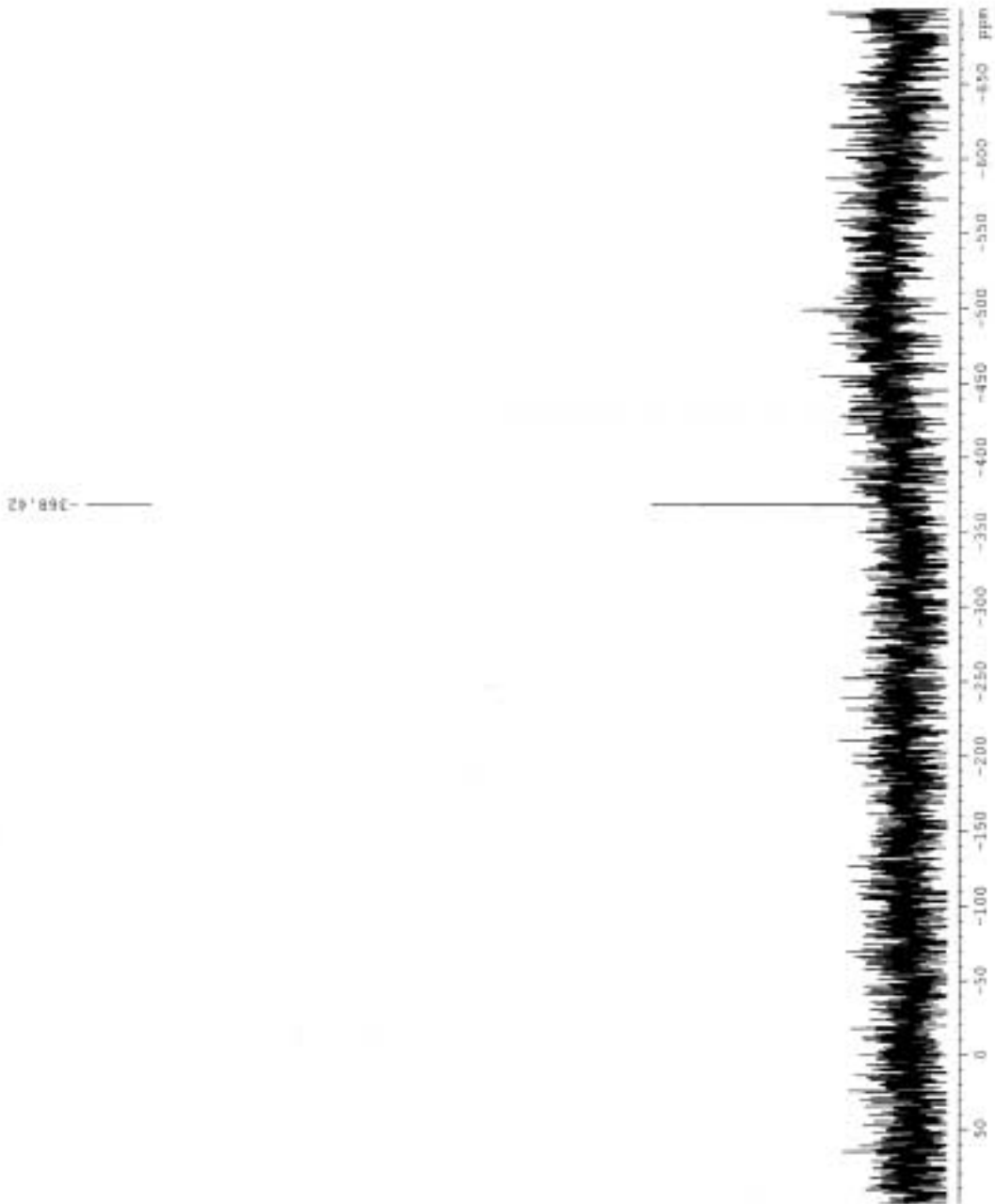


Abb.6.7: Dimethylamin-Humus

MiSiG, inverse gated, Relax-Delay=4 sec, pl=12 (ca. 40 Grad); Probe: Glycin/Humus in ca. 1 m NaOD/D2O,
 Eschung: Spektrum Nitromethan r.in (0 ppm) mit D2O watern mit Spektrum der P nbe ueberlagert (00)

```

Current Data Parameters
NAME          glycin
EXPNO        3
PROCNO       1

F2 - Acquisition Parameters
Date_        20030516
Time         14.32
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm BBI LH-BB
PULPROG      zgpg
TD           65536
SOLVENT      D2O
NS           513
DS           4
SWH          37878.789 Hz
FIDRES       0.577984 Hz
AQ           0.8651252 sec
RG           65536
DW           13.200 usec
DE           100.00 usec
TE           300.0 K
D1           4.0000000 sec
d11          0.0300000 sec
MCHST        0.0000000 sec
MCMRK        0.0150000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1         15N
P1           12.00 usec
PL1          -4.00 dB
SFO1         40.5485945 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2      waltz16
NUC2         1H
PCPD2        90.00 usec
PL2          5.00 dB
PL12         24.00 dB
SFO2         400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI           32768
SF           40.5603010 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           5.00 Hz
GB           0
PC           1.50
    
```

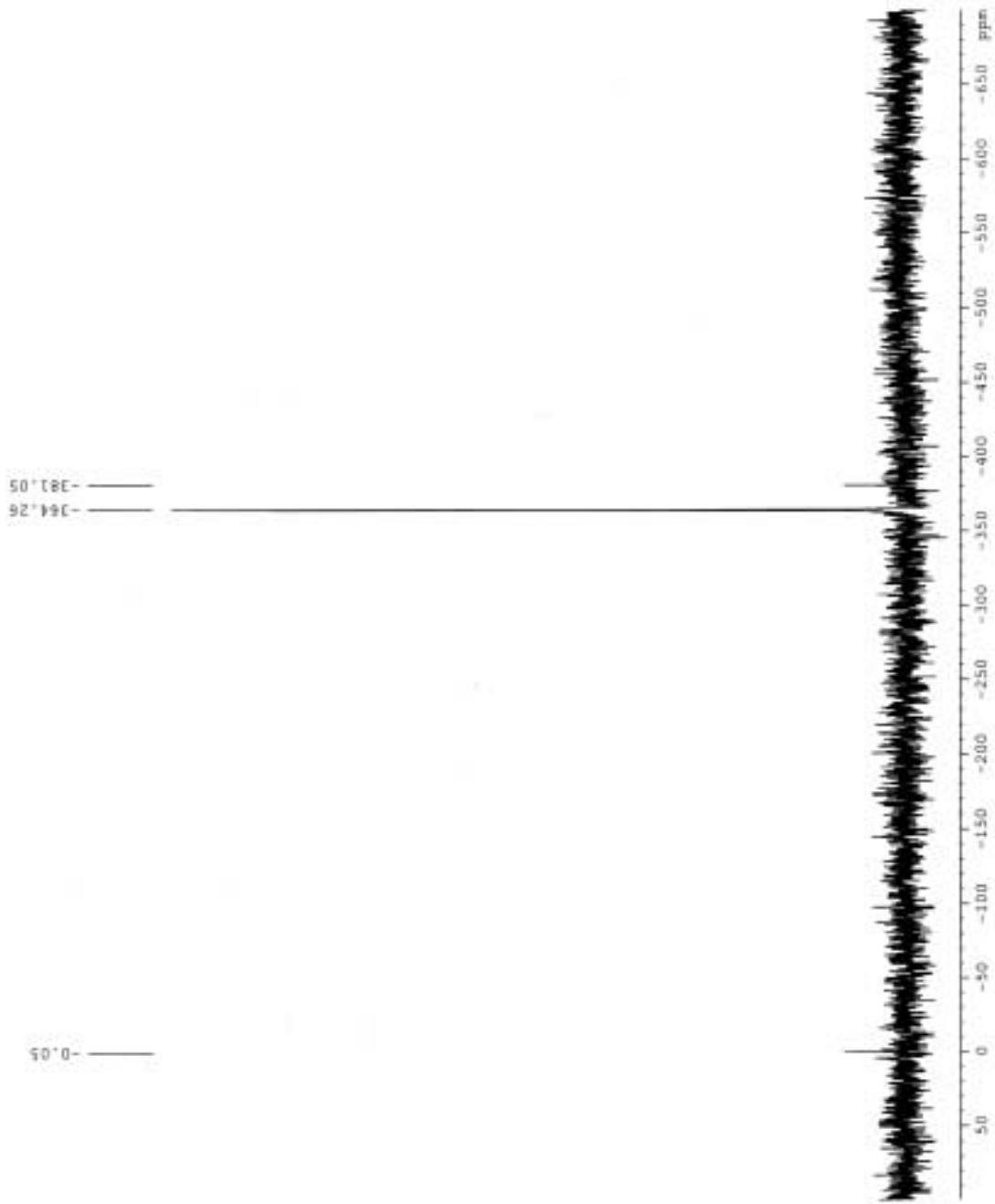
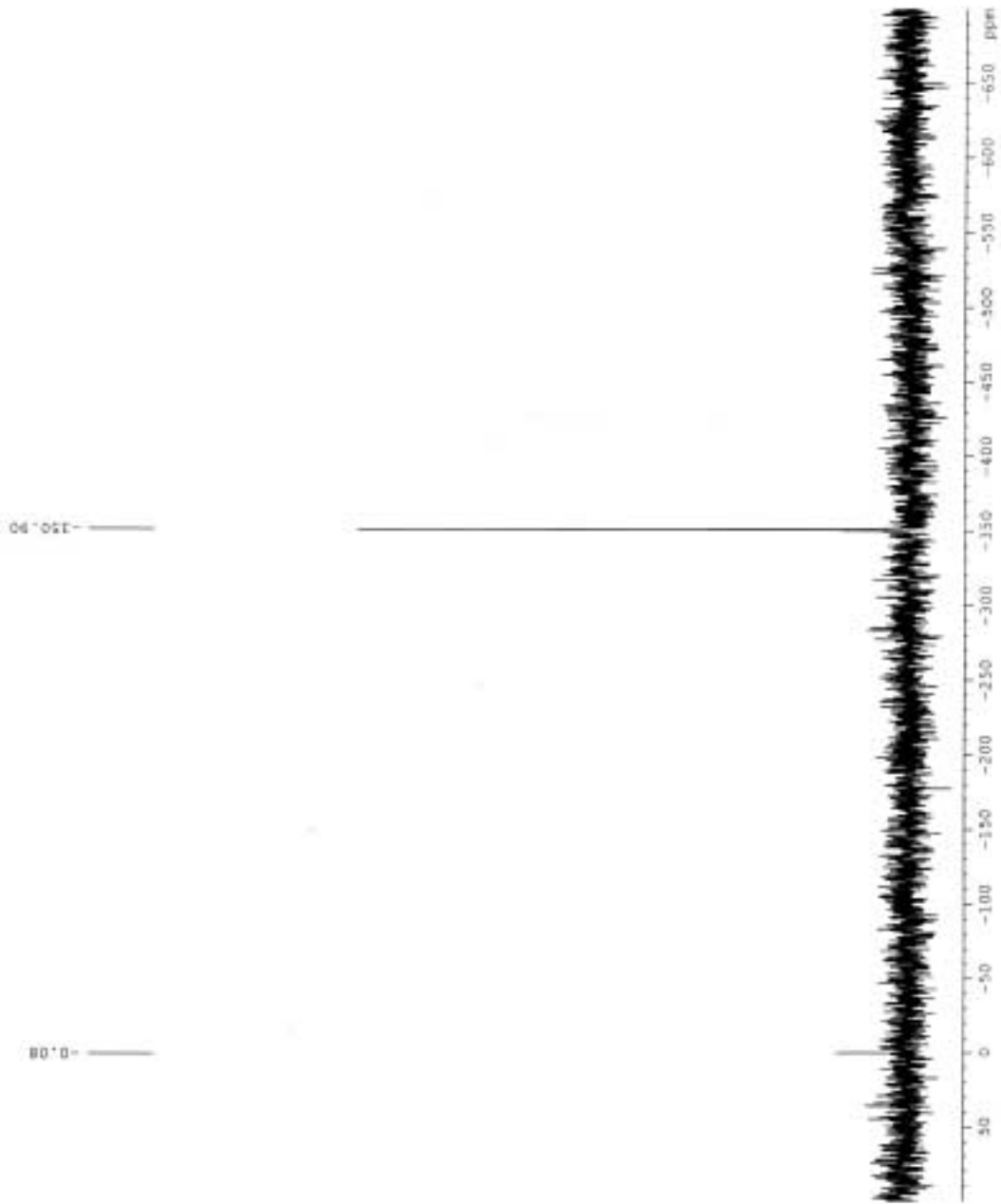


Abb.6.8: Glycin-Humus

m151G, inverse gated, Re1a: -Delay=6 sec, p1=12 (ca. 40 Grad); Probe: Th-rasin/Humus in ca. 1 m NaOD/D2O, Eichung: Spektrum Nitromethan rein (0 Ppm) mit D2O extern mit Spektrum der Probe ueberlagert (gg)



```

Current Data Parameters
NAME      ThyroalN
EXPNO    3
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20030516
Time     13.43
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm BBI 1H-BB
PULPROG  zg10
TD       65536
SOLVENT  D2O
NS       278
DS       4
SWH      37878.789 Hz
FIDRES   0.377984 Hz
AQ       0.8651252 sec
RG       65536
DE       13.200 usec
TE       300.0 K
D1       4.00000000 sec
d11      0.03000000 sec
MCREST   0.00000000 sec
MCMK     0.01500000 sec

===== CHANNEL F1 =====
NUC1     15N
P1       12.00 usec
PL1      -4.00 dB
SFO1     40.5485945 MHz

===== CHANNEL F2 =====
CPDPRG2  waltz16
NUC2     1H
PCPD2    90.00 usec
PL2      5.00 dB
PL12     24.00 dB
SFO2     400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       40.5603010 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       5.00 Hz
GB       0
PC       1.50
    
```

Abb.6.9: Tyrosin-Humus

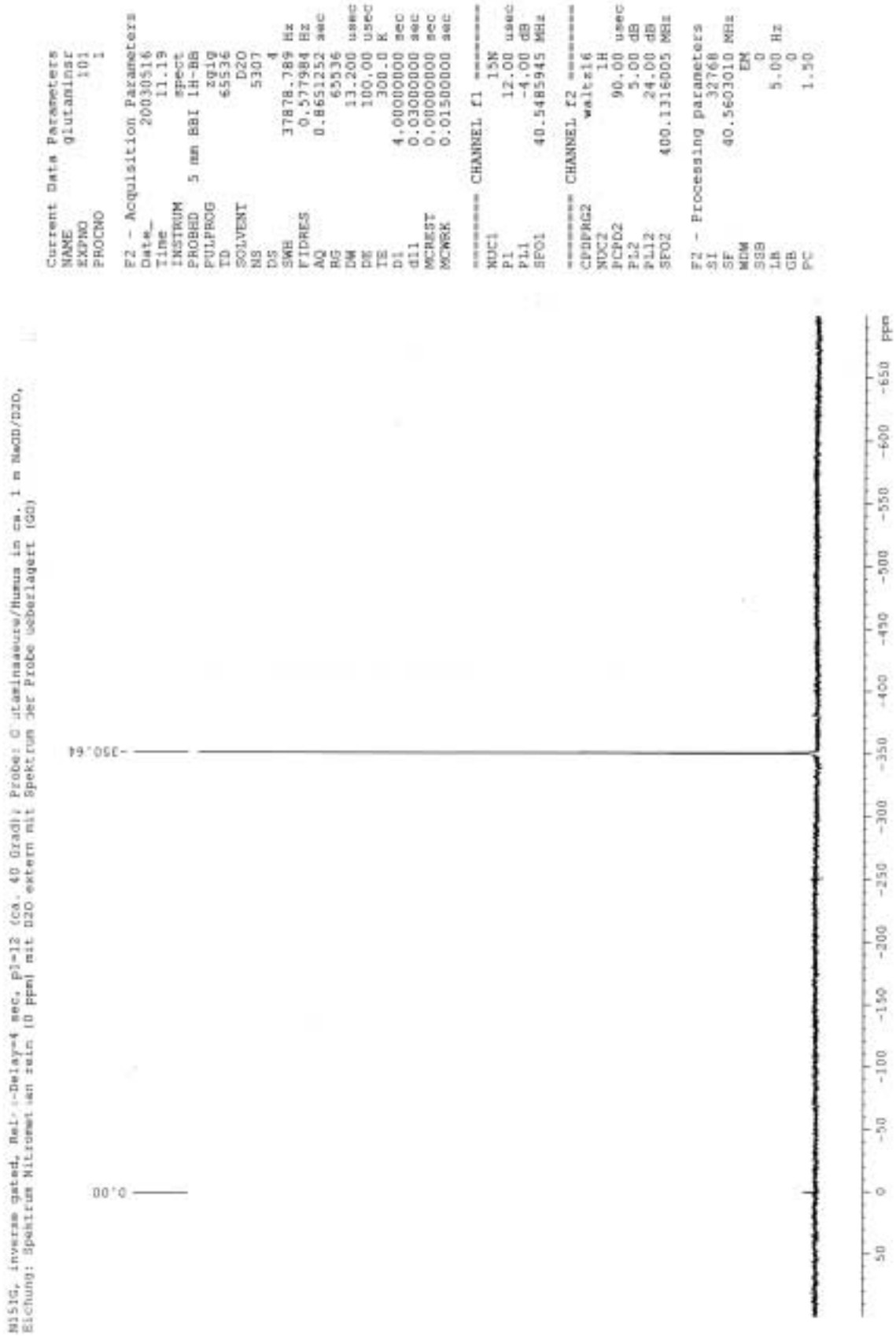


Abb.6.10: Glutaminsäure-Humus

Die Spektren, mit der Ausnahme von Glycin-Humus, zeigen an, dass der in der Aminosäure gebundene Stickstoff nur in einer einzigen atomar gebundenen Form vorliegt: einem Amin.

Vergleicht man die hier gemessenen *chemical shifts* mit den Literaturwerten für das eingesetzte Amin und die Aminosäuren (Berger et al., 1992), so kann festgestellt werden, dass diese nur etwa um einen Wert von 10 – 15ppm verschieden sind. Daraus kann geschlossen werden, dass die Bindung der Aminosäure an den Humus über eine C-C-Bindung verlaufen muss, während die Amino-Gruppe an dieser Reaktion unbeteiligt zu sein scheint.

Diese Interpretation wird durch das Spektrum von Glycin-Humus gestützt, wo zwei unterschiedlich hohe Signale in einem Abstand von 17ppm gemessen wurden. Hier liegt die Aminosäure sowohl kovalent an den Humus gebunden vor (hohes Signal) als auch als nicht reagiertes Molekül, welches nicht vollständig ausgewaschen wurde. Dies hätte eigentlich nicht passieren dürfen, ist für die Interpretation der Spektren insgesamt jedoch als ein ungewollter Glücksfall anzusehen.

Um die chemische Natur der Bindung der Amine und Aminosäuren an den Humus aufzuklären, hätte es weiterer umfangreicher Versuche bedurft, die im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr durchgeführt werden konnten.

6.3.9 Untersuchung der Bindung von Protein an Lignin

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass Aminosäuren sogar an Humus gebunden werden können, wurde untersucht, ob dies auch für Proteine gilt. Dazu wurde eine Versuchsanordnung mit Indulin und Ligninsulfonsäure gewählt. Bei dem verwendeten Protein handelte es sich um BSA, als Mediator wirkte 4-HBS.

Die unterschiedlichen Lignine wurden mit und ohne Laccase, mit und ohne BSA sowie mit und ohne 4-HBS in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde das Molekulargewicht mittels der HPLC bestimmt. Diese Methode war der einfachste Weg, eine mögliche Bindung des Proteins

(MW = 67.000D) zu beweisen. Wenn auch nur ein einziges BSA-Molekül an das Lignin gebunden worden wäre, so würde sich bei der HPLC-Messung das Molekulargewicht stark erhöhen.

Festgestellt wurde jedoch, dass dies bei keinem einzigen der in Material und Methoden beschriebenen Ansätze der Fall war. Offensichtlich sind bei der Reaktion zwischen Aminosäuren und Lignin auf der einen und Proteinen und Lignin auf der anderen Seite doch unterschiedliche Faktoren ausschlaggebend.

7 Zusammenfassung

Bei Untersuchungen von Lignin während des Aktivierungsprozesses mit Laccase war die einzige signifikante Änderung der chemischen Struktur die Dichte der Phenoxyradikale. Diese stabilen Radikale wurden während der Inkubation mit Laccase unter Belüftung gebildet. Sie sind reaktiver und reagierten mit mehr Molekülen als das nicht aktivierte Lignin, sogar mit Nucleophilen wie Zellulose und Stärke (Hüttermann et al., 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte aufgezeigt werden, mit welchen Systemen das aktivierte Lignin reagieren kann. Zudem sollte überprüft werden, ob die für Lignin gefundenen Ergebnisse auch auf Humus übertragbar sind.

4. Untersuchung der Reaktion zwischen aktiviertem Lignin und Wachsmaisstärke

Es sind Verbundwerkstoffe aus aktiviertem, wasserunlöslichem Indulin AT, Ligninsulfonsäure und Wachsmaisstärke hergestellt worden. Die so hergestellten Verbindungen wurden einem Auswaschtest in kochendem Wasser unterworfen. Dabei zeigten die Ligninsulfonsäureproben eine wesentlich höhere Auswaschung als die Indulinproben. Die an Ligninsulfonsäure gebundene Stärke wurde zu ca. 70% ausgewaschen, während bei den Indulinproben nur 0,27% der Stärke ausgewaschen wurde. Ein Wert, der deutlich geringer war als die Auswaschung aus dem Kontrollansatz, welcher aus reiner Wachsmaisstärke bestand. Damit wurde erstmals eine wasserfeste kovalente Bindung von wasserfester Stärke an Lignin gezeigt. So ist ein Weg bereitet, biologisch abbaubare Werkstoffe aus wasserfester Stärke herzustellen.

5. Einfluss von Mediatoren auf die Radikaldichte und Ligninablösung von Holzfasern

Es wurde der Einfluss von Mediatoren auf die Aktivierung von Holzfasern mit Laccase untersucht. Durch photometrische und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei Anwesenheit von Laccase in deutlichen Mengen Lignin abgelöst wurde und sich bei einer längeren

Inkubationsdauer der Grad der Ablösung weiter erhöhte. Bei der Inkubation von Laccase und dem Mediator 4-Hydroxybenzoesäure zeigte sich, dass weniger Lignin von der Faseroberfläche abgelöst wurde. Der Einsatz eines Mediators bremst somit die Ligninablösung an der Oberfläche und ebenso die Polymerisation. Der Zusatz des Mediators hat demnach eher eine Aktivierung der Ligninmoleküle auf der Faseroberfläche bewirkt als deren Ablösung.

Mit Hilfe einer Bestimmungstabelle sollte dieses Phänomen okular erfasst werden. Aufgrund der unterschiedlichen Morphologie der Faseroberfläche gestaltete sich die Bestimmung allerdings zu ungenau, als dass man sie als Indikator für die Prozessoptimierung nutzen könnte. Die Reaktion von Enzym und Faseroberfläche konnte mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht weiter verfolgt werden. Um die Wirkung der Inkubation mit Mediatoren auf die Chemie des Lignins der Faseroberfläche genauer zu analysieren, wurden Messungen der Elektronenspindichte durchgeführt. Bei allen Messungen zeigte sich eine Erhöhung der Spindichte der Phenoxyradikale gegenüber der Kontrolle. Daher ist anzunehmen, dass die für die Verklebung relevante Wirkung der Laccase auf das Oberflächenlignin nicht nur darin besteht, dass Mittellamellenlignin in Lösung zu bringen. Die gesteigerte Reaktivität der Faseroberfläche durch die erhöhte Dichte der Phenoxyradikale scheint der entscheidendere Effekt zu sein.

6. Herstellung von faserverstärkten Kunststoffen mit Acrylmonomeren und Holzfasern

Ziel der Versuche war es faserverstärkte Kunststoffe mit Holzfasern und einer Polyacrylat-Matrix herzustellen. Als gangbarer Weg erwies sich dabei eine Zweistufen-Strategie:

Zunächst wurden Holzfasern mit aktiviertem Ligninsulfonat zur Reaktion gebracht, danach erfolgte eine Laccase-katalysierte Aufpolymerisation von Acrylamid auf die aktivierte Faseroberfläche. Sowohl durch Auswaschversuche als auch durch Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop konnte gezeigt werden, dass das aufpolymerisierte Acrylamid fest an die Faseroberfläche gebunden war und auf dieser eine Polymerschicht bildete.

Die Zugabe des Quervernetzers Bisacrylamid zur Aufpolymersierung von Acrylamid auf die Faseroberfläche hatte keine Verbesserung zur Folge, im Gegenteil: die

Bindung des Acrylamids wurde dadurch gehemmt. Die Quervernetzungsreaktion zwischen Acrylamid und Bisacrylamid verlief offenbar schneller als mit dem Ligninsulfonat auf der Faseroberfläche, so dass es zu keiner nennenswerten Bindung an die Oberfläche der Holzfasern kam.

In weiteren Versuchsreihen wurde das Holzfaservlies mit Brenzkatechin beschichtet, um zu untersuchen, ob auch monomere Phenole an die Faseroberfläche gebunden werden können. Die Auswaschlösung wurde photometrisch bestimmt und mit Hilfe einer Brenzkatechineichreihe quantitativ erfasst. Auch ohne Laccase kam es dabei zu einer hohen Bindung von Brenzkatechin an das aktivierte Ligninsulfonat der Faseroberfläche. Offensichtlich war Brenzkatechin bereits ohne Laccase so reaktiv, dass es mit der Faseroberfläche eine Bindung eingehen konnte. Durch Laccase wurde dieser Effekt noch verstärkt und durch die geringeren Auswaschungen der Proben gegenüber den Kontrollen nachgewiesen.

7. Modellversuche zur Humusdynamik

Um die Reaktivität der humuseigenen Aromaten zu testen, wurden Aktivierungsansätze mit Humus hergestellt. Diese wurden mit Hilfe von HPLC- und ESR-Mesungen untersucht. Zunächst galt es festzustellen, ob die für Lignin ausgearbeitete Methode von Majcherczyk und Hüttermann (1997) auch auf Huminstoffe anwendbar ist. Das HPLC-System trennte über einen Bereich von drei Zehnerpotenzen mit einer linearen Proportionalität zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der Retentionszeit. Das Ergebnis war reproduzierbar und das erhaltene Chromatographiemuster entsprach dem einer typischen Ligninprobe. Der gemessene Alkali-Extrakt und die Huminsäuren-Fraktion wiesen nahezu identische Molekulargewichte auf. Mit der Ionpair-Size-Exclusion-Chromatographie steht eine brauchbare Methode zur Verfügung, mit der die relativen Molekulargewichte von Huminstoffen schnell und reproduzierbar zu bestimmen sind.

Um zu überprüfen, ob Laccase wirklich in der Lage ist Humus zu polymerisieren, wurde Huminsäure mit Laccase umgesetzt. Obwohl es sich um einen wasserunlöslichen Stoff handelte, konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine erhebliche Polymerisation erfolgte. Daraufhin wurde die Polymerisation von Sickerwasserproben der Versuchsfläche Zierenberg weiter untersucht. Die Polymerisation der organischen Substanz (DOC) aus Sickerwasser gelang jedoch

nur bei einer einzigen Probe, die anderen Proben hatten einen zu hohen Aluminiumgehalt, welcher die Reaktion hemmte.

Die Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass durch die Reaktion mit Laccase im Huminsäure-Molekül Radikale gebildet wurden, die zur Reaktion der Huminsäuremoleküle untereinander führten. Diese Annahme wurde mit Hilfe einer ESR-Messung überprüft. Es wurden Phenoxyradikale gefunden. Entgegen der Erwartung auch in völlig unbehandelten, durch Extraktion im Autoklaven mit Alkali isolierten Huminsäuren. Selbst kommerziell erhältliche Huminsäure wies Phenoxyradikale auf. Die Ergebnisse der ESR-Untersuchungen zeigten, dass Laccase mit Huminsäure prinzipiell die gleiche Reaktion eingeht wie mit Lignin. Es fand eine Ein-Elektronen-Elimination unter Bildung von Phenoxyradikalen mit einer bemerkenswerten Stabilität statt. Bei längerer Inkubation kam es sogar zu inter- und intramolekularen Quenchreaktionen, wodurch die Radikaldichte wieder verringert wurde. Der aus Kompost isolierte Humus verhielt sich in seinen Reaktionen mit Laccase völlig analog zu denen des Lignins. Die von Ulrich (1981) aufgestellte Hypothese über die Mechanismen der Humusdynamik konnte so nicht falsifiziert werden.

8. Modellversuche zur Humusbildung

Bisher finden sich in der Literatur noch keine Vorstellungen darüber, wie die aliphatischen Komponenten, Aminosäuren und Kohlenhydrate, in die Humuskörper einpolymerisiert werden. Daher wurde untersucht, inwieweit die für die Reaktion zwischen Ligninen und Kohlenhydraten gefundenen Ergebnisse auch auf Lignine und aliphatische Amine sowie Aminosäuren übertragen werden können und inwieweit auch reifer Humus selbst noch zu diesen Reaktionen fähig ist.

Dazu wurde zunächst die Reaktion von an Controlled-Pore-Glass (CPG) gebundenen Propylamin und Lignin untersucht. Bei der Umsetzung von Ligninsulfonat mit Laccase und CPG-Propylamin zeigte sich, im Gegensatz zur Kontrolle, dass bei der Probe mit Laccase Ligninsulfonat eindeutig an CPG-Propylamin gebunden wurde.

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass auch nach Schütteln und anschließender Trocknung im Hochvakuum die CPG-Propylamin-Kugeln teilweise fest miteinander verbunden waren. Die Bindung des

aktivierten Ligninsulfonats an das Propylamin war so fest, dass sie sogar dem mit einer hohen mechanischen Belastung verbundenen Wandern des Meniskus durch die Kugeloberflächen während der Trocknung im Hochvakuum standgehalten hatten. Bei der Bindung an CPG-Propylamin zeigte sich, dass auch Humus alkalifest gebunden wurde. Erstmals wurden damit aliphatische Amine enzymatisch durch Laccase an Humus gebunden.

In weiteren Versuchen wurde mit Dimethylamin und Aminosäuren gearbeitet. Diese wurden nach den für Lignin ausgearbeiteten Vorschriften mit Humus umgesetzt. Zur Untersuchung des Reinheitsgrades wurden die Proben für eine Dünnschichtchromatographie verwendet, welche bei allen Varianten einen Lignin- bzw. Humusspot sowie eine zusätzliche deutliche Aminosäurebande aufwies. Das bedeutete, dass die Trennung von Edukt und Produkt noch nicht abgeschlossen war. Erst nach mehrmaliger Ausfällung waren bei den Proben keine Aminosäurebanden mehr zu erkennen. Die L-Tyrosin-Humus-Probe musste weiteren Ausfällungs- und Wiederauflösungszyklen unterworfen werden, bis auch hier keine Aminosäurebande mehr zu beobachten war. Die Kopplungsprodukte wurden massenspektrometrisch untersucht. Es wurde ein durchschnittlicher Stickstoffgehalt des eingesetzten Humus von 0,8 % ermittelt.

Im Ergebnis war eine deutliche Erhöhung des Stickstoffgehalts zu verzeichnen, der mit steigender Konzentration des Edukts in der Reaktionslösung anstieg.

Bei der Messung von an Humus gebundenen ^{15}N -Glutaminsäure-Edukten entsprach eine Erhöhung des ^{15}N -Atomprozent nahezu der Erhöhung, welche bei Versuchen mit unmarkierter Glutaminsäure in reinem Humus und dem Kopplungsprodukt, ermittelt wurden.

Um eine Vorstellung von der chemischen Natur der Stickstoffbindungen an Humus zu erhalten, wurden NMR-Spektren angefertigt. Alle untersuchten Spektren, mit Ausnahme von Glycin-Humus, zeigten, dass der in der Aminosäure gebundene Stickstoff nur in einer einzigen atomar gebundenen Form vorliegt, nämlich dem Amin. Vergleiche aus Beschreibungen der Literatur lassen darauf schließen, dass die Bindung von Aminosäure an Humus über eine C-C-Bindung verläuft, während die Amino-Gruppe an dieser Reaktion unbeteiligt ist.

Diese Interpretation wurde durch das Spektrum von Glycin-Humus gestützt. Es wurden zwei unterschiedlich hohe Signale in einem Abstand von 17 ppm gemessen. Hier liegt die Aminosäure sowohl kovalent an Humus gebunden (hohes Signal) als auch als nicht reagiertes Molekül vor, welches nicht vollständig ausgewaschen wurde. Dies hätte eigentlich nicht auftreten sollen, war jedoch für die Interpretation der Spektren ein ungewollter Glücksfall.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass Aminosäuren sogar an Humus gebunden werden können, wurde untersucht, ob dies gleichermaßen auch für Proteine gilt. Dazu wurde eine Versuchsanordnung mit Indulin und Ligninsulfonsäure gewählt. Bei dem verwendeten Protein handelte es sich um BSA und als Mediator wirkte 4-HBS. Bei keinem einzigen der beschriebenen Ansätze konnte jedoch eine Bindung festgestellt werden. Offensichtlich sind bei der Reaktion zwischen Aminosäuren und Lignin auf der einen und Proteinen und Lignin auf der anderen Seite doch unterschiedliche Faktoren maßgeblich.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Schema des Aufbaus einer verholzten Zellwand (Zeichnung: Tambour)	2
Abb.2: Ligninmonomere (von links: Cumarylalkohol, Coniferylalkohol, Sinapylalkohol)	2
Abb.3: Strukturformel von Lignin	3
Abb.4: Teil einer Lackschnitzerei.....	4
Abb.5: Die Oxidation des Urushiols	5
Abb.6: Japanisches Lackbild	6
Abb.7: Polymerisation des Lignins.....	11
Abb.8: Bindung von Lignin an Zellulose während der Inkubation unter hohem Sauerstoffpartialdruck (Hüttermann et al., 2000)	12
Abb.9: Änderung des Molekulargewichts des Lignins während der Inkubation (aus Hüttermann et al., 2000)	13
Abb.10: Einfluss von 10mg aktiviertem Lignin auf die Laccase katalysierte Polymerisation von 100mg Lignin (aus Hüttermann et al., 2000).....	13
Abb.2.1: Rohstoffaufkommen für die Stärkeproduktion in Deutschland 2001 (4,4 Mio. t laut Fachverband der Stärkeindustrie)	15
Abb.2.2: Aufbau der Amylose	16
Abb.2.3: Aufbau des Amylopektins.....	16
Abb.2.4: Die helikale Struktur des Amylopektins	17
Abb.2.5: Quellverhalten unbeschichteter Stärke (Zeichnung: Tambour)	22
Abb.2.6: Mit Lignin beschichtete Stärke (Zeichnung: Tambour)	23
Abb.2.7: Quellungsverhalten der mit Lignin beschichteten Stärke (Zeichnung: Tambour).....	23
Abb.2.8: Aktivität der Laccase	32
Abb.2.9: Stärkeeichreihe	33
Abb.3.1: Oxidativer Weg der katalytischen Reaktion von Manganperoxidase und Lignin (Bajpai et al., 1999)	36
Abb.3.2: Mögliches Reaktionsschema für die Oxidation von aromatischem Alkohol mit ABTS ⁺ / ABTS ²⁺ Paar (Majcherczyk et al., 1999).....	37
Abb.3.3: Standard 1.....	49
Abb.3.4: Standard 2.....	50

Abb.3.5: Chromatogramm einer Faserprobe, Kontrolle ohne Laccase, 6h, 1mM 4-HBS	50
Abb.3.6: Chromatogramm einer Faserprobe, Kontrolle mit Laccase, ohne 4-HBS, 6h	51
Abb.3.7: Chromatogramm einer Faserprobe mit Laccase, 6h, 1mM 4-HBS.....	52
Abb.3.8: Tabelle zur Bonitierung der Hoftüpfel.....	54
Abb.3.9: Mikroaufnahme nach 0h, 10mM 4-HBS	55
Abb.3.10: Mikroaufnahme der Fasern nach 48h, 10mM 4-HBS	56
Abb.3.11: Elektronenspindichte der Phenoxyradikale von mit Laccase und Mediatoren inkubierten Holzfasern.....	57
Abb.4.1: Dehnungseigenschaften verschiedener Fasern.....	58
Abb.4.2: Oberfläche einer in der Faserplattenproduktion eingesetzten Faser.....	79
Abb.4.3: Zellulosefasern mit Acrylamid, Kontrolle, 24fach vergrößert	79
Abb.4.4: Zellulosefasern mit Acrylamid und Laccase, 24fach vergrößert	80
Abb.4.5: Zellulosefasern mit Acrylamid und Laccase, 200fach vergrößert	80
Abb.4.6: Zellulosefasern mit Acrylamid und Laccase, 1600fach vergrößert	81
Abb.5.1: Kohlenstoffkreislauf (nach Deutscher Bundestag, 1988).....	86
Abb.5.2: Modell der Humusdynamik (Zeichnung aus Eichhorn und Hüttermann, 1994)	92
Abb.5.3: Molekulargewichtsstandards aus Polystyrol als Beispiel für die Trennleistung der verwendeten Säule.....	96
Abb.5.4: Abhängigkeit der Retentionszeit vom Molekulargewicht der eingesetzten Polystyrolstandards.....	97
Abb.5.5: Chromatographiemuster einer typischen Humusprobe	98
Abb.5.6: Formeln von Actinomycin (links) und Brilliant Blue G (rechts).....	99
Abb.5.7: HPLC-Chromatogramme von Huminsäuren, die durch Alkaliextraktion bei 120°C unter Druck gewonnen wurden	101
Abb.5.8: Elektronenspinresonanz-Signal von Phenoxyradikalen.....	103
Abb.5.9: Spezifische Radikaldichte von Laccase-inkubierter Huminsäure in Abhängigkeit von der Zeitdauer der Inkubation.....	104
Abb.6.1: Strukturformel Lignin (Schachtschabel et al., 1989).....	105
Abb.6.2: Strukturformel Humus (Schachtschabel et al., 1989)	105
Abb.6.3: Wege der Huminstoffbildung im Boden (Stevenson, 1994).....	106
Abb.6.4: Aufbau von Glas-Propylamin.....	125

Abb.6.5: Zwei durch Ligninsulfonat kovalent gebundene CPG-Propylamin-Kügelchen (50fache Vergrößerung).....	126
Abb.6.6: Leimfuge der durch Ligninsulfonat kovalent gebundenen CPG-Propylamin- Kugeln (500 fache Vergrößerung).....	127
Abb.6.7: Dimethylamin-Humus.....	131
Abb.6.8: Glycin-Humus.....	132
Abb.6.9: Tyrosin-Humus.....	133
Abb.6.10: Glutaminsäure-Humus	134

9 Tabellenverzeichnis

Tab.2.1: Verdünnungsreihe	29
Tab.2.2: Ergebnisse der Stärkeauswaschung	33
Tab.4.1: Mittelwerte der Eichreihe	74
Tab.4.2: Auswaschergebnisse der Faserprüflinge.....	76
Tab.4.3: Werte der AcrylamidAuswaschung	77
Tab.4.4: Ergebnisse der Acrylamid-/BisacrylamidAuswaschung	82
Tab.4.5: Werte der Brenzkatechin-Eichreihe	83
Tab.4.6: Ergebnisse der Brenzkatechinauswaschung.....	84
Tab.5.1: Überprüfung der Reproduzierbarkeit	98
Tab.5.2: Vergleich der Molekulargewichte von bekannten humusähnlichen Substanzen	99
Tab.5.3: Molekulargewichte einer typischen Humusextraktion.....	100
Tab.5.4: Einfluss der Gaszusammensetzung bei der Alkali-Extraktion von Huminsäure bei 120 °C unter Druck	100
Tab.5.5: Polymerisation von Huminsäure mit Laccase.....	102
Tab.5.6: Polymerisation der organischen Substanz (DOC) in Sickerwasser	102
Tab.6.1: Einwaagen der Humusproben	114
Tab.6.2: Werte der zugegebenen NaOH-Mengen	117
Tab.6.3: Pipettierschema der ¹⁵ N markierten Proben auf Platte 1	118
Tab.6.4: Pipettierschema der ¹⁵ N markierten Proben auf Platte 2.....	119
Tab.6.5: Pipettierschema der Ligninsulfonatproben	121
Tab.6.7: Ergebnisse der Auswaschversuche.....	127
Tab.6.8: Stickstoffgehalt der Proben	129
Tab.6.9: ¹⁵ N-Gehalt von Humus und den Kopplungsprodukten.....	130

10 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
α	Alpha
®	Eingetragene Marke
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
°K	Grad Kelvin (Temperatureinheit)
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2 Azinobis- (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure-) – Diammoniumsalz
AGS	Amyloglucosidase
AKD	Alkylketendimer
ASA	American Standards Association, bezeichnet die Filmempfindlichkeit
bar	Bar = veraltete Maßeinheit des Druckes
cm	Zentimeter
CPG	Controlled Pore Glass
D	Dalton (Molekulargewicht)
dB	Dezibel
DIN	Deutsche Industrie Norm(en)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Dissolved organic carbon (Gelöster organischer Kohlenstoff)
E	Extinktion
E-cup	Eppendorfcup
E-Glas	(E=Elektric)- Glas
ESR	Elektronenspinresonanz
et al.	Et alii (lat.) = und andere
FA	Fulvic acid (Fulvinsäure)
g	Gramm
Gauss	Einheit der magnetischen Flussdichte
GHz	Gigahertz

GPC	Gel-Permeationschromatographie
GRP	Glass reinforced Polyester (glasfaserverstärktes Polyester)
Gt	Gigatonne
HA	Humic acid (Huminsäure)
HIPS	High impact Polystyrene (hoch beanspruchbares Polystyrol)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Säulen-Flüssig-Chromatographie)
kg	Kilogramm
KOSI	Kompetenzzentrum Stabile Isotope
L	Liter
LDPE	Low density Polyethylene (Polyethylen mit geringer Dichte)
LSS	Ligninsulfonsäure
M	Molar
MDF	Mitteldichte Faserplatte
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
mM	Millimol
mol	Mol = Einheit der Stoffmenge
MW	Mittleres Molekulargewicht
N	Normal
nKat	Nanokatal
nm	Nanometer
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernresonanzspektroskopie)
OD	Optische Dichte
PDI	Polydispersitätsindex
PDI	Polydispersitätsindex
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
PET	Polyethylenterephthalat
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
phr	Parts per hundred
pKa	Negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PLA	Poly lactid (Polymilchsäure)

PP	Polypropylen
ppm	Parts per million
PVC	Polyvinylchlorid
QAM	Quaternäre Amine
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	rounds per minute (Umdrehungen/Minute)
SBR	Styrol-Butadien-Gummi
SD	Standartabweichung
SEE	Oberflächenspannungs-Evaluationssystem
Tab.	Tabelle
TDMA	N-Methyl Trioctylammoniumchlorid
THF	Tetrahydrofuran
U	Units
V	Volt (Spannung)
wt.	Weight = Gewicht

11 Literaturverzeichnis

- Almendros, G.; Fründ, R.; Gonzales-Vila, F. J.; Haider, K. M.; Knicker, H.; Lüdemann, H. D. (1991): Analysis of ^{13}C und ^{15}N CP-MAS NMR-spectra of soil organic matter and composts; FEBS Letters 282: 119-121; Elsevier Science; Amsterdam
- Atlas, R. M.; Bartha, R. (1987): Microbial Ecology: Fundamentals and Applications: 532; Cummings; New York
- Bajpai, P.; Bajpai, P.K.; Kondo, R. (1999): Biotechnology for Environmental Protection in the Pulp and Paper Industry: 74; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Balakshin, M.; Chen, C. L.; Gratzl, J. S.; Kirkman, A. G.; Jakob, H. (2001): Biobleaching of pulp with dioxygen in laccase-mediator-system-effect of variables on the reaction kinetics; Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 16 (3-4): 205-215; Elsevier Science; Amsterdam
- Barreca, A. M.; Shogren, B.; Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P. (2004): Catalytic efficiency of some mediators in laccase-catalysed alcohol oxidation; Biocatalysis and Biotransformation 22 (2): 105-112; Informa Healthcare; London
- Baumberger, S.; Lapierre, C.; Monties, B.; Della Valle, G. (1997): Use of kraft lignin as filler for starch films; Polymer Degradation and Stability 59: 273-277; Elsevier Science; Amsterdam
- Baumberger, S.; Lapierre, C.; Monties, B.; Loerdin, D.; Colonna, P. (1996): Preparation and properties of thermally moulded and cast ligninsulfonates-starch blend; Industrial Corps and Products 6: 253-258; Elsevier Science; Amsterdam
- Berger, S.; Braun, S.; Kalinowski, H. O. (1992): NMR-Spektroskopie von Nichtmetallen 2: 137-138; Thieme; Stuttgart

-
- Berry, D. F.; Boyd, S. A. (1984): Oxidative coupling of phenols and anilines by peroxidase: Structure-activity relationships; *Soil Science Society of America Journal* 48: 565-569; The Soil Science Society of America; Stanford University; Palo Alto
- Berry, D. F.; Boyd, S. A. (1985): Reaction rates of phenolic humus constituents and anilines during cross-coupling; *Soil Biology & Biochemistry* 17: 631-636; Elsevier Science; Amsterdam
- Bledzki, A. K., Gassan, J. (1999): Composites reinforced with cellulose based fibres; *Progress in Polymer Science* 24 (2): 221-274; Elsevier Science; Amsterdam
- Bollag, J. M.; Liu, S. Y.; Minard, R. D. (1980): Cross coupling of phenolic humus constituents and 2,4-dichlorophenol; *Soil Science Society of America Journal* 44: 52-56; The Soil Science Society of America; Stanford University; Palo Alto
- Bollag, J. M.; Liu, S. Y.; Minard, R. D. (1982): Enzymatic oligomerization of vanillic acid; *Soil Biology & Biochemistry* 14: 157-163; Elsevier Science; Amsterdam
- Brahmakumar, M.; Pavithran, C.; Pillai, R. M. (2005): Coconut fibre reinforced polyethylene composites: effect of natural waxy surface layer of the fibre on fibre/matrix interfacial bonding and strength of composites; *Composites, Science and Technology* 65 (3-4): 563-569; Elsevier Science; Amsterdam
- Bratkovskaya, I.; Ivanec, R.; Kulys, J. (2006): Mediator-assisted laccase-catalysed oxidation of 4-hydroxybiphenyl; *Biochemistry-Moscow* 71 (5): 550-554; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Braun-Lüllemann, A. A.; Hüttermann, A.; Majcherczyk, A. (1999): Screening of ectomycorrhizal fungi for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons; *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 127-132; Springer; Berlin, Heidelberg, New York

-
- Call, H. P.; Mücke, I. (1997): History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process); *Journal of Biotechnology* 53: 163-202; Elsevier Science; Amsterdam
- Carvalho, A. J. F.; Job, A. E.; Alves, N.; Curvelo, A. A. S.; Gandini, A. (2003): Thermoplastic starch/ natural rubber blends; *Carbohydrate Polymers* 53 (1): 95-99; Elsevier Science; Amsterdam
- Chen, R. L.; Kokta, B. V.; Daneault, C.; Valade, J. L. (1986): Some watersoluble copolymers from lignin, *Journal of Applied Polymer Science* 32: 4815-4826; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Chiellini, E.; Solaro, R.; Vallini, G.; Corti, A.; Pera, A. (1991): Degredation of Starch-Filled Polyethylene Films in a Composting Environment; *La Chimica & L'industria* 73: 656-663; Promedia Publishing; Mailand
- Christman, R. F.; Oglesby, R. T. (1971): Microbial degradation and formation of humus: Sarkanen, K. V., Ludwig, C. H. (eds.); *Lignins, Occurrence, Formation, Structure and Reactions*: 769-795; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Cinelli, P.; Chiellini, E.; Gordon, S. H.; Imam, S. H. (2003): Characteristics and degradation of hybrid composite films prepared from PVA, starch and lignocellulosics; *Macromolecular Symposia* 197: 143-155; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Cronan, S. C. (1985): Comparative effects of precipitation acidity on three forest soils: carbon cycligresponses; *Plant and Soil* 88: 101-112; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Curvelo, A. A. S.; de Carvalho A. J. F.; Agnelli J. A. M. (2001): Thermoplastic starch-cellulosic fibers composites: preliminary results; *Carbohydrate Polymers* 45 (2): 183-188; Elsevier Science; Amsterdam

- Daniel, J. A.; Whistler, R. L.; Voragen, A. C. J.; Pilnik, W. (1994): Starch and other polysaccharides: Elvers, B.; Hawkins, S.; Russey, W. (eds.); Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry; 5th ed.:1-62; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- De Carvalho, A. J. F.; Curvelo, A. A. S.; Agnelli, J. A. M. (2001): A first insight on composites of thermoplastic starch and kaolin; Carbohydrate Polymers 45 (2): 189-194; Elsevier Science; Amsterdam
- Dean, J. F. D.; Eriksson, K. E. L. (1994): Laccase and the deposition of lignin in vascular plants; Holzforschung 48: 1-33; de Gruyter; Berlin, New York
- Deutscher Bundestag (1988): Schutz der Erdatmosphäre: eine internationale Herausforderung; Deutscher Bundestag; Referat für Öffentlichkeitsarbeit; Bonn
- Eichhorn, J. (1995): Stickstoffsättigung und ihre Auswirkungen auf das Buchenwaldökosystem der Fallstudie Zierenberg; Berichte des Forschungszentrums Waldökosysteme A 124: 175p.; Forschungszentrum Waldökosysteme; Universität Göttingen
- Eichhorn, J.; Hüttermann, A. (1994): Humus Disintegration and N-Mineralisation: Godbold, D. L.; Hüttermann, A. (eds.); Effekt of acidification on forest processes; Microbial Ecology Series: 129-162; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Ertel, J. R. (1988): Genesis, Group Report: Frimmel, F. H.; Christman, R. F. (eds.); Humic Substances and their Role in the Environment; Report of the Dahlem Workshop: 105-112; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Fengel, D.; Wegener, G. (1989): Wood - chemistry, ultrastructure, reactions; de Gruyter; Berlin, New York
- Filip, Z.; Preusse, T. (1985): Phenoloxidierende Enzyme- ihre Eigenschaften und Wirkungen im Boden; Pedobiologia 28: 133-142; Elsevier Science; Amsterdam

-
- Findik, F.; Misirlioglu, M.; Soy, U. (2002): The structural features of glass fibre reinforced polyester matrix composites; *Science and Engineering of Composite Materials* 10 (4): 287-295; Freund Publishing; Tel Aviv
- Flaig, W. H. (1988): Generation of model chemical precursors: Frimmel, F. H.; Christman, R. F. (eds.); *Humic Substances and their Role in the Environment, Report of the Dahlem Workshop: 75-92*; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Flaig, W.; Beutelspacher, H.; Rietz, E. (1975): Chemical composition and physical properties of humic substances: Gieseking, J. E. (eds.); *Soil Components 1, Organic Components: 1-211*; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Fritz, H.- G.; Widmann, B. (1993): Der Einsatz von Stärke bei der Modifizierung synthetischer Kunststoffe; *Starch/Stärke* 45 (9): 314-322; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Fründ, R.; Lüdemann, H. D. (1989): The quantitative analysis of solution and CP-MAS-C-NMR spectra of humic material; *The Science of the total environment* 81/82: 157-168; Elsevier Science; Amsterdam
- Gandini, A.; Curvelo, A. A. D.; Pasquini, D.; De Menezes, A. J. (2005): Direct transformation of cellulose fibres into self-reinforced composites by partial oxypropylation; *Polymer* 46 (24) : 10611-10613; Elsevier Science; Amsterdam
- Ganster, J.; Fink, H. P. (2006): Novel cellulose fibre reinforced thermoplastic materials; *Cellulose* 13 (3): 271-280; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Georgopoulos, S. T.; Trantili, P. A.; Avgerinos, E.; Andreopoulos, A. G.; Koukios, E. G. (2005): Thermoplastic polymers reinforced with fibrous agricultural residues; *Polymer Degradation and Stability* 90 (2): 303-312; Elsevier Science; Amsterdam

-
- Glasser, W. G. (1989): Cross-linked options for lignins: Hemingway, R. W.; Conn, A. H. (eds.); Adhesives from renewable resources; ACS Symposium 385: 43-54; American Chemical Society; Washington DC
- Gordon, M. S.; Olson, E. C. (1995): Invasions of the land; Columbia University Press; New York
- Goring, D. A. I. (1989): The lignin paradigm; Glasser, W. G.; Sarkanen, S. (eds.): New polymeric materials from lignin; ACS Symposium Series 397: 2-10; American Chemical Society; Washington DC
- Göttlein, A. (1988): Einfluss von saurer Beregnung und Kalkung auf wasserlösliche organische Stoffe eines Waldbodens unter Fichte: 179; Dissertation; Universität München
- Göttlein, A.; Kreutzer, K.; Schierl, R. (1991): Beiträge zur Charakterisierung organischer Stoffe in wässriger Bodenextrakten unter dem Einfluss von saurer Beregnung und Kalkung: Kreutzer, K.; Göttlein, A. (eds.); Ökosystemforschung Högwald: Beiträge zur Auswirkung von saurer Beregnung und Kalkung in einem Fichtenbestand: 212-221; Paul Parey; Hamburg
- Göttlein, A.; Pruschka, H. (1991): Statistische Auswertung des Einflusses von saurer Beregnung und Kalkung auf die Wasserlöslichkeit organischer Bodeninhaltsstoffe: Kreutzer, K.; Göttlein, A. (eds.); Ökosystemforschung Högwald: Beiträge zur Auswirkung von saurer Beregnung und Kalkung in einem Fichtenbestand: 221-227; Paul Parey, Hamburg
- Greenland, D. J.; Oades, J. M. (1975): Saccharides: Gieseking, J. E. (eds.); Soil Components 1, Organic Components: 213-261; Springer; Berlin, Heidelberg, New York

-
- Haars, A.; Hüttermann, A. (1980a): Function of laccase in the white-rot fungus *Fomes annosus*; *Archives of Microbiology* 125: 233; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Haars, A.; Hüttermann, A. (1980b): Macromolecular mechanisms of lignin degradation by *Fomes annosus*; *Naturwissenschaften* 67: 39-40; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Haars, A.; Hüttermann, A.; Kharazipour, A. (1986): Emissionsarmes Bindemittel für holz- und cellulosehaltige Werkstoffe; German Patent: 3644397
- Haars, A.; Kharazipour, A.; Zanker, H.; Hüttermann, A. (1989): Roomtemperature curing adhesives based on lignin and phenoloxidases: Hemingway, R. W., Conner, A. H., Branham, S. J. (eds.); *Adhesives from renewable resources*; ACS Symposium Series 385: 126-134; American Chemical Society; Washington DC
- Haars, A.; Trojanowski, J.; Hüttermann, A. (1987): Lignin bioconversion and its technical application: Wise D. L. (eds.); *Bioenvironmental systems* 1: 89-129; CRC-Publications; Boca Raton
- Haider, K.; Martin, J. P. (1967): Synthesis and transformation of phenolic compounds by *Epicoccum nigrum* in relation to humic acid formation; *Soil Science Society of America Journal* 31: 766-771; The Soil Science Society of America; Stanford University; Palo Alto
- Haider, K.; Martin, J. P. (1970): Humic-acid type phenolic polymers from *Aspergillus sydowi* culture medium, *Stachybotrys* ssp. Cells and autoxidized phenol mixtures; *Soil Biology & Biochemistry* 2: 145-156; Elsevier Science; Amsterdam
- Haider, K.; Martin, J. P.; Filip, Z. (1975): Humus Biochemistry: Paul, E. A., McLaren, A. D. (eds.); *Soil Chemistry* 4: 195-244; Dekker; New York

- Hedges, J. I. (1988): Polymerization of humic substances in natural environments: Frimmel, F. H.; Christman, R. F. (eds.); Humic Substances and their Role in the Environment, Report of the Dahlem Workshop: 45-58; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Hempfling, R.; Schulten, H. R. (1990): Direct chemical characterization of dissolved organic matter in water by pyrolysis-field ionization mass spectrometry; International journal of environmental analytical chemistry 43: 55-62; Taylor & Francis Group; London
- Herpoel, I.; Jeller, H.; Fang, G.; Petit-conil, M.; Bourbonnais, R.; Robert, J. L.; Asther, M.; Sigoillot, J. C. (2002) : Efficient enzymatic delignification of wheat straw pulp by a sequential xylanase-laccase mediator treatment, Journal of Pulp and Paper Science 28 (3): 67-71; Pulp and Paper Technical Association of Canada (PAPTAC); Montréal
- Higuchi, T. (1997): Biochemistry and molecular biology of wood; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Huang, Y.; Guozjen, B. H. S.; Gao, J. (1992): Graft copolymerization of methyl methacrylate on stone ground wood using the H_2O_2 - Fe^{2+} method; Journal of Applied Polymer Science 45: 71-77; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Hüttermann, A.; Mai, C.; Kharazipour, A. (2001): Modification of lignin for the production of new compounded materials; Applied Microbiology and Biotechnology 55: 387-394; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Hüttermann, A. (1978): Gel permeation chromatography of water insoluble lignins on controlled pore glass and sepharose CL-8B; Holzforschung 32: 108-111; de Gruyter; Berlin, New York

-
- Hüttermann, A.; Fastenrath, M.; Kharazipour, A.; Schindel, U. (1995): Making of papyrus-an ancient biotechnology, or Pliny was right indeed: 414-416; *Naturwissenschaften* 82; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Hüttermann, A.; Gebauer, M.; Volger, C.; Rösger, C. (1977): Polymerisation und Abbau von Ligninsulfonat durch *Fomes annosus*; *Holzforschung* 31: 83-89; de Gruyter; Berlin, New York
- Hüttermann, A.; Haars, A. (1981): Mikrobielle Transformation von Ligninsulfonsäure: Hüttermann, A. (eds.); *Der Wald als Rohstoffquelle*: 184-194; Sauerländer; Frankfurt am Main
- Hüttermann, A.; Haars, A.; Trojanowski, J.; Milstein, O.; Kharazipour, A. (1989): Enzymatic modification of lignin for its technical use-strategies and results: Glasser, W.; G.; Sarkanen, S. (eds.); *New polymeric materials from lignin*; ACS Symposium Series 397: 361-371 American Chemical Society; Washington DC
- Hüttermann, A.; Kharazipour, A. (1996): Enzymes as polymerization catalysts: Maijanen, A.; Hase, A. (eds.); *New catalysts for a clean environment*; VTT Symposium 163: 143-148; Technical Research Centre of Finland (VTT); Espoo
- Hüttermann, A.; Kharazipour, A.; Haars, A.; Nonninger, K. (1990): Ersetzt ein biologisches Bindemittel herkömmliche Kunstharzleime? Enzymgebundene Spanplatten auf der Basis nachwachsender Rohstoffe- Stand und Entwicklung; *Holz- und Möbelindustrie* 25: 1215-1219
- Hüttermann, A.; Majcherczyk, A.; Braun-Lüllemann, A.; Mai, C.; Fastenrath, M.; Kharazipour, A.; Hüttermann, J.; Hüttermann, A. H. (2000): Enzymatic activation of Lignin leads to an unexpected copolymerization with carbohydrates; *Naturwissenschaften* 87: 539-541; Springer; Berlin, Heidelberg, New York

-
- Hüttermann, A.; Trojanowski, J.; Oelbe, M. (1986): Biochemistry of mycorrhizal fungi- Anatomy of a Symbiosis: Hüttermann, A.; Chet, I. (eds.); Soil-plant interactions; Göttinger Bodenkundlicher Bericht 85: 252-265; Göttingen
- Ibarra, D.; Camarero, S.; Romero, J.; Martinez, J. R.; Martinez, A. T. (2006): Integrating laccase-mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine-free bleaching of eucalypt kraft pulp; Journal of Chemical Technology & Biotechnology 81: 1159-1165; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Jentschke, G. (1984): Untersuchungen zum biochemischen Mechanismus der Humusdisintegration - Versuch einer Falsifizierung; Fachbereich Biologie, Universität Göttingen
- Jin, L.; Nicholas, D. D.; Schultz, T. P. (1991): Wood laminates glued by enzymatic oxidation of brown-rotted lignin; Holzforschung 45: 467-468; de Gruyter; Berlin, New York
- Johannes, C.; Majcherzyk, A. (2000): Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems; Applied and Environmental Microbiology 66 (2): 524-528; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Joseph, K., Thomas, S., Pavithran, C. (1996): Effect of chemical treatment on the tensile properties of short sisal fibre-reinforced polyethylene composites; Polymer 37 (23): 5139-5149; Elsevier Science; Amsterdam
- Joseph, P. V.; Oommen, Z.; Joseph, K.; Thomas, S. (2002): Melt rheological behaviour of short sisal fibre reinforced polypropylene composites; Journal of thermoplastic Composite Materials 15 (2): 89-114; Sage; London
- Kharazipour, A. (1995): Enzyme von Weißfäulepilzen als Grundlage für die Herstellung von Bindemitteln für Holzwerkstoffe; Habilitation; Fakultät für Forstwissenschaften und Waldökologie; Universität Göttingen

-
- Kharazipour, A.; Haars, A.; Shekholeslami, M.; Hüttermann, A. (1991): Enzymgebundene Holzwerkstoffe auf der Basis von Lignin und Phenoloxidasen; Adhäsion 5: 30-36; GWV Fachverlage GmbH; Wiesbaden
- Kharazipour, A.; Hüttermann, A. (1992): Kleber aus Lignin- die Chemie wird durch Naturprodukte ersetzt; Energie 44: 36-42
- Kharazipour, A.; Hüttermann, A. (1993): Enzymatische Behandlung von Holzfasern als Weg zu vollständig bindemittelfreien Holzwerkstoffen: Hüttermann, A.; Kharazipour, A. (eds.); Die pflanzliche Zellwand als Vorbild für Holzwerkstoffe, Naturorientierte Herstellung von Span- und Faserplatten, Stand der Technik und Perspektiven: 83-98; Sauerländer; Frankfurt am Main
- Kharazipour, A.; Hüttermann, A. (1998): Biotechnological production of wood composites: Bruce, A.; Palfreyman, J. W. (eds.); Forest products biotechnology: 141-150; Taylor and Francis; London
- Kharazipour, A.; Hüttermann, A.; Lüdemann, H. D. (1997): Enzymatic activation of wood fibres as a means for the production of wood composites; Journal of Adhesion Science and Technology 11: 419-427; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Kharazipour, A.; Mai, C.; Hüttermann, A. (1998a): Polyphenols for compounded materials; Polymer Degradation and Stability 59: 237-243; Elsevier Science; Amsterdam
- Konova, M. M. (1966): Soil Organic Matter 2; Pergamon Press; Oxford
- Koshijima, T.; Muraki, E. (1968): Radical grafting on lignin, 1. radiation-induced grafting of styrene onto hydrochloric acid lignin; Journal of Applied Polymer Science 6: 1431-1440; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim

-
- Kosikova, B.; Hricovini, M.; Simonutti, R. (1996): ^{13}C -NMR study of solid state reaction of cellulose with lignin monomers; *Holzforschung* 50: 335-341; de Gruyter; Berlin, New York
- Krump, H.; Hudec, I.; Jasso, M.; Dayss, E.; Luyt, A. S. (2006): Physical-morphological and chemical changes leading to an increase in adhesion between plasma treated polyester fibres and a rubber matrix; *Applied Surface Science* 252 (12): 4264-4278; Elsevier Science; Amsterdam
- Kühne, G. (1993): Modifizierung von Rohholz durch Pilze für die Holzwerkstoffherstellung: Hüttermann, A.; Kharazipour, A (eds.); *Die pflanzliche Zellwand als Vorbild für Holzwerkstoffe*: 55-68; Sauerländer; Frankfurt am Main
- Kumanotani, J. (1988): The chemistry of oriental lacquer (*Rhus verniciflua*): Brommelle, N. S.; Smith, P. (eds.); *Urushi: Proceedings of the Urushi Study Group*: 243-251; Getty Conservation Institute; Los Angeles
- Kumar, R. P.; Nair, K. C. M.; Thomas, S.; Schit, S. C.; Ramamurthy, K. (2000): Morphology and melt rheological behaviour of short-sisal-fibre-reinforced SBR composites; *Composites, Science and Technology* 60 (9): 1737-1751; Elsevier Science; Amsterdam
- Leonowicz, A.; Bollag, J. M. (1987): Laccases in soils and the feasibility of their extraction; *Soil Biology & Biochemistry* 19: 237-242; Elsevier Science; Amsterdam
- Lörcks, J. (1997): Properties and applications of compostable starch based plastic materials: *International Conference on Advanced Materials and European Materials Research Society; Abstract Book; Spring Meeting; Strasbourg*
- Lütkemeyer, S. (2002): Untersuchung zur Reaktivität von enzymatisch aktiviertem Lignin und Stärke; Masterarbeit; Fakultät für Forstwissenschaften und Waldökologie; Georg-August-Universität; Göttingen

-
- Maheras, J. C.; Hopkins, J. B. Jr.; Tetzlaff, H. (1996): Polymer Blend composed of Cellulose Acetat and Starch Acetat used to form Fibres, Films and Plastic Materials and a Process to prepare Said Blend; United States Patent: 5,507,304
- Mai, C. (1998): Synthese von Polyacrylaten mit höherer Ökokompatibilität und Untersuchung des Abbaus durch Weißfäulepilze; Dissertation; Fakultät für Chemie; Universität Göttingen
- Mai, C.; Kües, U.; Militz, H. (2004): Biotechnology in the wood Industrie; Applied Microbiology and Biotechnology 63: 477-494; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Mai, C.; Milstein, O.; Hüttermann, A. (1999): Fungal laccase grafts acrylamide onto lignin in presence of peroxides; Applied Microbiology and Biotechnology 51: 527-531; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Mai, C.; Milstein, O.; Hüttermann, A. (2000b): Chemoenzymatical grafting of acrylamide onto lignin; Journal of Biotechnology 79: 173-183; Elsevier Science; Amsterdam
- Mai, C.; Schormann, W.; Hüttermann, A.; Kappl, R.; Hüttermann, J. (2002): The influence of laccase on the chemo-enzymatic synthesis of lignin graft-copolymers; Enzyme and Microbial technology 30: 66-72; Elsevier Science; Amsterdam
- Mai, C.; Schormann, W.; Hüttermann, A. (2001): Chemo-enzymatically induced copolymerization of phenolics with acrylate compounds; Applied Microbiology and Biotechnology 55: 177-186; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Majcherczyk, A.; Hüttermann, A. (1997): Size-exclusion chromatography of lignin as ion-pair complex; Journal of Chromatography A 764: 183-191; Elsevier Science; Amsterdam

- Majcherczyk, A.; Johannes, C.; Hüttermann, A. (1999): Oxidation of aromatic alcohols by Laccase from *Trametes versicolor* mediated by the ABTS Cation Radical and Dication; *Applied Microbiology and Biotechnology* 51(2): 267-276; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Majcherczyk, A.; Johannes, C. (2000): Radical mediated indirect oxidation of a PEG-coupled polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) model compound by fungal laccase; *Biochimica et Biophysica Acta- General Subjects* 1474 (2): 157-162; Elsevier Science; Amsterdam
- Martin, J. P.; Haider, K. (1969): Phenolic polymers of *Stachybotrys atra*, *Stachybotrys chartarum* and *Epicoccum nigrum* in relation to humic acid formation; *Soil Science* 107: 260-270; Lippincott Williams & Wilkins; Baltimore
- Martin, J. P.; Haider, K. (1980): A comparison of the use of phenolase and peroxidase for the synthesis of model humic acid-type polymers; *Soil Science Society of America Journal* 44: 983-988; The Soil Science Society of America; Stanford University; Palo Alto
- Martin, J. P.; Haider, K.; Linares, L. F. (1979): Decomposition and stabilization of ring-¹⁴C-labeled catechol in soil; *Soil Science Society of America Journal* 43: 100-104; The Soil Science Society of America; Stanford University; Palo Alto
- Martin, J. P.; Haider, K.; Wolf, D. (1972): Synthesis of phenols and phenolic polymers by *Hendersonula toruloida* in relation to humic acid formation; *Soil Science Society of America Journal* 36: 311-315; The Soil Science Society of America; Stanford University; Palo Alto
- Martin, J. P.; Richards, S. R.; Haider, K. (1967): Properties and decomposition and binding action in soil of "humic acid" synthesized by *Epicoccum nigrum*; *Soil Science Society of America Journal* 31: 657-662; The Soil Science Society of America; Stanford University; Palo Alto

-
- Meister, J. J.; Lathia, A.; Chang, F. F. (1991): Solvent effects, species and extraction method effects, and coiniciator effects in the grafting of lignin; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 29: 1465-1473; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Meister, J. J.; Patil, D. R.; Field, L. R. (1984): Synthesis and characterization of graft copolymers from lignin and 2-propenamamide; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 22: 1963-1980; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Milstein, O.; Gersonde, R.; Hüttermann, A.; Chen, M. J.; Meisert, J. J. (1992): Fungal biodegradation of lignopolystyrene graft copolymers; *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 3225-3232; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Milstein, O.; Hüttermann, A.; Majcherczyk, A.; Schulze, K.; Fründ, R.; Lüdemann, H. D. (1993): Transformation of lignin-related compounds with laccase in organic solvents; *Journal of Biotechnology* 30: 37-48; Elsevier Science; Amsterdam
- Milstein, O.; Mai, C.; Hüttermann, A. (1996): Enzymatic copolymerization of lignin with low molecular weight compounds: Srebotnik, E., Messner, K. (eds.); *Biotechnology in the pulp and paper industry- recent advances in applied and fundamental Research; Proceedings of the Sixth International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: 645-648; Facultas-Universitätsverlag; Wien*
- Milstein, O.; Nicklas, B.; Hüttermann, A. (1989): Oxidation of aromatic compounds in organic solvents with laccase from *Trametes versicolor*; *Applied Microbiology and Biotechnology* 29: 70-74; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Nair, K. C. M.; Thomas, S.; Groeninckx, G. (2001): Thermal and dynamic mechanical analysis of polystyrene composites reinforced with short sisal fibres; *Composites, Science and Technology* 61 (16): 2519-2529; Elsevier Science; Amsterdam

-
- Nimz, H.; Razvi, A.; Marquharab, I.; Clad W. (1972): Bindemittel bzw. Klebemittel zur Herstellung von Holzwerkstoffen sowie zur Verklebung von Werkstoffen verschiedener Art; German Patent: 2221353
- Pankratov, A. N.; Tsivileva, O. M.; Nikitina, V. E. (2000): Laccase of *Lentinus edodes* Catalyzed Oxidation of Amines and Phenolic Compounds: A Semiempirical Quantum Chemical Consideration; *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 33 (1): 37-42; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Paul, E. A.; Clark, F. E. (1989): *Soil Microbiology and Biochemistry*: 275; Academic Press; San Diego
- Pfaender, F. K. (1988): Generation in controlled model ecosystems: Frimmel, F. H.; Christman, R. F. (eds.); *Humic Substances and their Role in the Environment, Report of the Dahlem Workshop*: 92-104; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Philipps, R. B.; Brown, W.; Stannett, V. T. (1972): The graft copolymerization of styrene and lignin, 2. Kraft softwood lignin, *Journal of Applied Polymer Science* 116: 1-14; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Rehm, H. J.; Präge, P. (1994): *Biotechnologie- Geschichte, Verfahren und Produkte*: Präge, P.; Faust, U.; Sittig, W.; Sukatsch, D. A. (eds.); *Handbuch der Biotechnologie*: 1-11; Oldenbourg-Akademie Verlag; München, Wien
- Rochefort, D.; Bourbonnais, R.; Leech, D.; Renaud, S.; Paice, M. (2002): Electrochemical oxidation of transition metal-based mediators for pulp delignification; *Journal of the Electrochemical Society* 149 (1): 15-20; American Institute of Physics (AIP); Maryland
- Roffael, E. (1979): Fortschritte in der Verwendung von Sulfitablauge als Binde- und Zusatzmittel bei der Herstellung von Holzspanplatten; *Adhäsion* 11: 368-370; GWV Fachverlage GmbH; Wiesbaden

-
- Schachtschabel, P.; Blume, H. P.; Brümmer, G.; Hartge, K. H.; Schwertmann, U. (1989): Lehrbuch der Bodenkunde: 491; Enke Verlag; Stuttgart
- Scheffer, F.; Ulrich, B. (1960): Humus und Humusdüngung-Morphologie; Biologie, Chemie und Dynamik des Humus: 266; Enke Verlag; Stuttgart
- Schindel, K. (1999): Die Röntgenmikroanalyse von Lignin als Untersuchungsmethode für Holz und Holzwerkstoffe; Dissertation; Fakultät für Forstwissenschaften und Waldökologie; Universität Göttingen
- Schnitzer, M.; Barr, M.; Hartenstein, R. (1984): Kinetics and properties of humic acids produced from simple phenols; *Soil Biology & Biochemistry* 16: 371-376; Elsevier Science; Amsterdam
- Schröter, M. (1998): Umsetzung von enzymatisch aktiviertem Lignin mit Zellstoff als Grundlage für die Herstellung von Nassfestmitteln für Papiere und Pappen: 1-35; Diplomarbeit; Fakultät für Forstwissenschaften und Waldökologie; Universität Göttingen
- Senesi, N.; Loffredo, E. (2001): Soil Humic Substances: Hofrichter, M.; Steinbüchel, A. (eds.); Lignin, Humic Substances and Coal; *Biopolymers* 1: 247-299; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Sharma, P.; Rathore, M. (2001): Wood composites by Enzymatic Methods; Financial Technical Report of three month Training; Forstbotanisches Institut; Universität Göttingen
- Shindo, H.; Huang, P. M. (1984): Catalytic effects of Manganese (IV), Iron (III), Aluminium, and Silicon oxides on the formation of phenolic polymers; *Soil Science Society of America Journal* 48: 927-934; The Soil Science Society of America; Stanford University; Palo Alto

-
- Shogren, R. L.; Biswas, A. (2006): Preparation of water-soluble and water-swelling acetates using microwave heating; *Carbohydrate Polymers* 64 (1): 16-21; Elsevier Science; Amsterdam
- Simmons, K. E.; Minard, R. D.; Bollag, J. M. (1988): Oxidative coupling and polymerization of guaiacol, a lignin derivate; *Soil Science Society of America Journal* 52: 1356-1360; The Soil Science Society of America; Stanford University; Palo Alto
- Sreekala, M. S.; Kumaran, M. G.; Joseph, S.; Jacob, M.; Thomas, S. (2000): Oil palm fibre reinforced phenol formaldehyde composites: Influence of fibre surface modifications on the mechanical performance; *Applied Composite Materials* 7 (5-6): 295-329; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Stevenson, F. J. (1994) : *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions*: 2; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Suflita, J. M.; Bollag, J. M. (1981): Polymerization of phenolic compounds by a soil-enzyme complex; *Soil Science Society of America Journal* 45: 297-302; The Soil Science Society of America; Stanford University; Palo Alto
- Trojanowski, J.; Haider, K.; Hüttermann, A. (1984): Decomposition of ¹⁴C labelled lignin, holocellulose, and lignocellulose by mycorrhiza fungi; *Archives of Microbiology* 139: 202-206; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Ulrich, B. (1981): Theoretische Betrachtungen des Ionenkreislaufs in Waldökosystemen; *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 144: 647-659; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Viikari, L.; Katelinen, A.; Sundquist, J.; Linko, M. (1994): Xylanases in bleaching: From an idea to the industry; *FEMS Microbiology Reviews* 13 (2-3): 335-350; Elsevier Science; Amsterdam

- Vilaseca, F.; Lopez, A.; Llauro, X.; Mutje, P. (2004): Hemp strands as reinforcement of polystyrene composites; *Chemical Engineering Research & Design* 82 (A11): 1425-1431; European Federation of Chemical Engineering; Frankfurt am Main
- Wagenführ, A. (1988): Praxisrelevante Untersuchungen zur Nutzung biotechnologischer Wirkprinzipien bei der Holzwerkstoffherstellung; *Dissertation*; Technische Universität; Dresden
- Waksman, S. A. (1932): *Humus*; Williams & Wilkins; Baltimore
- Wang, M. C.; Huang, P. M. (1987): Polycondensation of pyrogallol and glycine and the associated reactions as catalyzed by birnessite; *The Science of the total environment* 62: 435-442; Elsevier Science; Amsterdam
- Wang, M. C.; Huang, P. M. (1989): Abiotic cleavage of pyrogallol and the associated reactions as catalysed by a natural soil; *The Science of the total environment* 81/82: 501-510; Elsevier Science; Amsterdam
- Wang, T. S. C.; Li, S. W.; Huang, P. M. (1978): Catalytic polymerisation of phenolic compounds by a latosol; *Soil Science* 126: 81-86; Lippincott Williams & Wilkins; Baltimore
- Watt, J. C. Y.; Ford, B. B. (1991): *East Asian Lacquer*; The Florence and Herbert Irving Collection; The Metropolitan Museum of Art:15-149; New York
- Widsten, P.; Laine, J. E.; Tuominen, S.; Qvintus-Leino, P. (2003): Effect of high defibration temperature on the properties of medium-density fiberboard (MDF) made from laccase-treated hardwood fibres; *Journal of Adhesion Science and Technology* 17 (1): 67-78; Springer; Berlin, Heidelberg, New York
- Wunderlich, K.; Gloede, W. (1977): *Natur als Konstrukteur*: 13-14; Edition Leipzig; Seemann-Henschel Verlags GmbH & Co. KG; Leipzig

-
- Yamaguchi, H.; Maeda, Y.; Sakata, I. (1992): Application of phenol dehydrogenative polymerization by laccase to bonding among woody fibres; Mokuzaï Gakkaishi 38: 931-937; The Japan Wood Research Society; Tokyo
- Yamaguchi, H.; Maeda, Y.; Sakata, I. (1994): Bonding among woody fibres by use of enzymatic phenol dehydrogenative polymerisation; Mokuzaï Gakkaishi 40: 185-190; The Japan Wood Research Society; Tokyo
- Yamaguchi, H.; Nagamori, N.; Sakata, I. (1991): Application of the dehydrogenative polymerization of vanillic acid to bonding of woody fibres; Mokuzaï Gakkaishi 37: 220-226; The Japan Wood Research Society; Tokyo
- Ziechmann, W. (1988): Evolution of structural models from consideration of physical and chemical properties: Frimmel, F. H.; Christman, R. F. (eds.); Humic Substances and their Role in the Environment, Report of the Dahlem Workshop: 113-132; John Wiley & Sons GmbH; Weinheim
- Zimmermann, M. H. (1983): Xylem structure and the ascent of sap: 21-36; Springer; Berlin, Heidelberg, New York

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Sonja Lütkemeyer-Wagner
geboren am: 03. März 1977
Geburtsort: Paderborn
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

09/83 – 07/87 Katholische Grundschule Schwaney
09/87 – 06/96 Gymnasium St. Michael zu Paderborn
Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/96 – 03/03 Studium an der Fakultät für
Forstwissenschaften und Waldökologie der
Georg-August-Universität Göttingen

Schwerpunkt: Holzbiologie / Holztechnologie

Abschluss: Master of Science (M.Sc.)

Promotion

seit Mai 2003 Promotion am Institut für Forstbotanik der
Georg-August-Universität Göttingen

Hiermit versichere ich gemäß § 4 (2e) der Promotionsordnung des Fachbereichs für Forstwissenschaften und Waldökologie der Georg-August-Universität Göttingen vom 08.01.1986, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

(Sonja Lütkemeyer-Wagner)

Erfurt, den 5. Juli 2007