

Einsatz von Mediatoren bei der enzymatischen Aktivierung der
fasereigenen Bindekräfte zur Herstellung von enzymgebundenen,
bindemittelfreien Holzwerkstoffen

Dissertation

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

vorgelegt von
Markus Euring
geboren in Bad Hersfeld / Hessen

D 7

1. Gutachter: Prof. Dr. Alireza Kharazipour
2. Gutachter: Prof. Dr. Edmone Roffael

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2008

<http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2008/euring/euring.pdf>

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Büsgen-Institut der Georg-August-Universität Göttingen in Zusammenarbeit mit der Fa. PFLEIDERER Holzwerkstoffe GmbH & Co. KG, Neumarkt unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Alireza Kharazipour angefertigt. Gefördert wurde diese Arbeit durch das BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (BMVEL) über die FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE (FNR) in Gülzow.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Alireza Kharazipour für die Vergabe des Dissertationsthemas. Die qualifizierte Betreuung, die anregenden Fachgespräche und vielen motivierenden Worte während des Forschungsprozesses haben einen entscheidenden Beitrag zur Anfertigung dieser Arbeit geleistet.

Frau Dr. Cora Müller danke ich aufrichtig für ihre qualifizierte Unterstützung und ihre motivierende, immer positive Einstellung.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kharazipour möchte ich mich für die tatkräftige Hilfe, die fachliche Unterstützung und das ausgezeichnete Arbeitsklima herzlich bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Frau Nina Ritter, Frau Marina Horstmann, Herrn Michael Bartholme, Herrn Dr. Christian Schöpfer, Herrn Dr. Lars Kloeser, Herrn Michael Reichel, sowie Herrn Prof. Dr. Jerzy Trojanowski.

Frau Dr. Claudia Stückl und Herrn Dr. Reinhard Kappl danke ich für die Anfertigung der ESR-Spektroskopischen Messungen. Frau Brigitta Angerstein danke ich für die Aufnahmen der NMR-Spektren.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Holzbiotechnologie und Technische Mykologie für das freundliche Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei den analytischen Arbeiten bedanken. Besonders erwähnen möchte ich hier Frau Karin Lange, Herrn Martin Rühl, Herrn Mojtaba Zomorodi und Herrn Dr. Andrzej Majcherczyk.

Bei Herrn Prof. Dr. Edmone Roffael möchte ich mich herzlich bedanken, der sich bereit erklärt hat, die Arbeit als Zweitgutachter zu beurteilen.

Schließlich möchte ich mich noch besonders bei meinen Eltern für die langjährige Unterstützung bedanken, die es mir ermöglichten diesen Weg einzuschlagen.

I Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Holzwerkstoffe	1
1.2	Holzwerkstoffe und ihr wirtschaftlicher Aspekt	2
1.3	Lignin als Bindemittel	4
1.4	Enzyme und Mediatoren bei der Herstellung von Holzwerkstoffen, insbesondere Mitteldichter Faserplatten (MDF)	5
2	Ziele des Projektes	7
3	Theoretische Grundlagen	9
3.1	Chemischer Aufbau des Holzes	9
3.1.2	Aufbau der verholzten Zellwand	10
3.1.2.1	Polysaccharide	13
3.1.2.2	Lignin	15
3.1.3	Nebenbestandteile oder Extraktstoffe	17
3.2	Bindungskräfte in Klebungen	17
3.2.1	Adhäsion	18
3.2.2	Kohäsion	19
3.3	Enzyme	19
3.3.1	Phenoxidase (Laccase E.C 1.10.3.2)	21
3.3.2	Polymerisation technischer Lignine durch Phenoloxydase (Laccase)	23
3.4	Mediatoren und das Laccase-Mediator-System (LMS)	24
3.5	Faserstoff	27
3.5.1.	Masonite- oder Dampfexplosionsverfahren	27
3.5.2	ASPLUND- oder Defibratorverfahren	28
3.6	Herstellung von Mitteldichten Faserplatten	29
3.6.1	Trockenverfahren	30
3.6.2	Nassverfahren	31
3.7	Herstellung von Dämmstoffplatten	32
3.8	Inkubationsverfahren bei der Herstellung enzymgebundener Faserplatten	33
3.8.1	Sprühinkubation	34
3.8.2	Nassinkubation	34
4	Material und Methoden	36
4.1	Material	36
4.1.1	Holzfasern	36
4.1.2	Technische Lignine	36
4.1.2.1	Kraftlignin aus dem Sulfataufschluss	36
4.1.2.2	Ca-Ligninsulfonat (Wafex)	36
4.1.2.3	Na-Ligninsulfonat	37
4.1.3	Mediatoren	37

4.1.3.1	ABTS.....	37
4.1.3.2	4 Hydroxybenzoesäure (HBA)	37
4.1.3.3	Acetosyringon.....	38
4.1.3.4	Methylsyringat	38
4.1.3.5	Syringaaldehyd	38
4.1.3.6	TEMPO	38
4.1.4	Laccase	39
4.1.4.1	Eigene Herstellung von Laccase	39
4.1.4.2	Laccase von der Firma <i>Novozymes</i>	39
4.1.5	Nährmedien	40
4.1.5.1	BSM (Bifidus Selective Medium) Medium.....	40
4.1.5.2	L ₁ -Agar Medium	40
4.1.6	Induktoren	41
4.1.6.1	Indulin (siehe Kapitel 4.1.2.1).....	42
4.1.6.2	Vanillin	42
4.1.6.3	2,5 Xylidin (2,5 Dimethylanilin)	42
4.1.7	Pufferlösungen	42
4.1.7.1	Na-Acetat Puffer	42
4.1.7.2	McIlvaine Puffer.....	43
4.1.8	Analytische Geräte	43
4.1.9	Technische Geräte zur Herstellung von Dämmstoff- und Mitteldichten Faserplatten (MDF)	45
4.1.9.1	Technische Geräte zur Herstellung von Dämmstoffplatten	45
4.1.9.2	Anlage und Geräte zur Herstellung der MDF-Platten	47
4.1.10	EN-Vorgaben für die Prüfung der MDF-Platten	50
4.1.10.1	EN 310 (1993) Bestimmung der Biegefestigkeit	50
4.1.10.2	EN 317 (2003) Bestimmung der Dickenquellung nach 24 h Wasserlagerung	50
4.1.10.3	EN 319 (1993) Bestimmung der Querkzugfestigkeit	51
4.1.11	Technische Geräte zur Überprüfung der mechanisch-technologischen Eigenschaften	52
4.2	Methoden	53
4.2.1	Laccase-Aktivitätstest	53
4.2.2	Schüttelkulturen von Weißfäulepilzen	54
4.2.3	Fermentation von <i>Trametes versicolor</i> im 5 l Fermenter	55
4.2.4	Analyse der Industrielaccase	56
4.2.5	Untersuchung von Ligninproben mittels GPC (Gel-Permeations-Chromatographie)	56
4.2.6	Chemische Analyse der Holzfasern	58
4.2.6.1	Hemicellulosegehalt mittels Pentosanbestimmung.....	59
4.2.6.2	Bestimmung des Ligningehalts.....	60
4.2.6.3	Bestimmung des Extraktstoffgehalts.....	61
4.2.7	Untersuchung der Holzfasern mittels Rasterelektronenmikroskop (REM)	62
4.2.8	Phenolische Hydroxyl-Gruppen Laccase inkubierter Holzfasern	63
4.2.9	Bestimmung freier Radikale auf der Oberfläche der Holzfasern mittels Elektronenspin Resonanz Spektroskopie (ESR)	64
4.2.10	Strukturaufklärung der inkubierten Holzfasern mittels Nuclear-Magnetic-Resonance Spektroskopie (NMR)	64
4.2.11	Fourier-Transform-Infrared Spektroskopie (FTIR)	65
4.2.12	Herstellung Laccase und Laccase-Mediator gebundener Holzfasern-Dämmplatten	66

4.2.13	Herstellung Laccase und Laccase-Mediator gebundener MDF – Platten	67
5	Ergebnisse und Diskussion	72
5.1	Schüttelkulturen verschiedener Weißfäulepilze.....	72
5.3	Analyse der <i>Novozym</i> Laccase	81
5.3.1	Laccase-Aktivitätstest.....	81
5.3.2	pH-Optimum und pH-Stabilität der <i>Novozym</i> Laccase.....	81
5.3.3	Temperaturoptimum und Temperaturstabilität der <i>Novozym</i> Laccase	84
5.4	Untersuchung der Ligninproben mittels GPC	85
5.4.1	GPC Untersuchung von Ca-Ligninsulfonat (Wafex)	86
5.4.1.1	GPC Untersuchung von Ca-Ligninsulfonat (Wafex) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.....	87
5.4.1.2	GPC Untersuchung von Ca-Ligninsulfonat (Wafex) mit unterschiedlichen Mediatoren.....	89
5.4.2	GPC Untersuchung von Na-Ligninsulfonat	91
5.4.3	GPC Untersuchung von Kraftlignin (Indulin)	93
5.5	Chemische Analysen der Holzfasern	96
5.5.1	Bestimmung des Hemicellulosegehaltes.....	96
5.5.2	Bestimmung des Ligningehaltes	97
5.5.3	Bestimmung der Extraktstoffgehalte.....	98
5.5.4	Zusammenfassung der chemischen Analysen.....	99
5.6	Untersuchung der Holzfasern mittels Rasterelektronenmikroskop (REM)	101
5.7	Phenolische Hydroxyl-Gruppen Laccase inkubierter Holzfasern.....	107
5.7.1	Bildung von phenolischen Hydroxyl-Gruppen in Abhängigkeit von der Laccase- und Mediatorkonzentration	107
5.7.2	Einfluss des pH-Wertes der Inkubationslösung auf den Gehalt an phenolischen Hydroxyl-Gruppen	110
5.8	Bestimmung freier Radikale auf der Oberfläche der Holzfasern mittels Elektronenspin Resonanz-Spektroskopie (ESR)	112
5.9	Strukturaufklärung mittels NMR	117
5.10	Fourier-Transform-Infrared (FTIR)-Spektroskopie.....	122
5.11	Mechanisch-technologische Eigenschaften enzymgebundener Holzfaserdämmplatten	131
5.12	Mechanisch-technologische Eigenschaften Laccase gebundener MDF - Platten.....	137
5.12.1	Allgemeines.....	137
5.12.2	Voraussetzungen für die Herstellung Laccase und Laccase-Mediator gebundener MDF-Platten.....	138
5.12.3	Auswahl optimaler Herstellungsparameter für die MDF-Platten Produktion	139
5.12.3.1	Ermittlung einer optimalen Presstemperatur	139
5.12.3.2	Ermittlung einer optimalen Pressdauer	144
5.12.3.3	Vergleich von 8 mm und 10 mm starken MDF-Platten	148
5.12.3.4	Ermittlung einer optimalen Rohdichte.....	151
5.12.3.5	Fazit zur Auswahl optimaler Herstellungsparameter für die MDF-Platten Produktion	153
5.12.3.6	Überprüfung der Kontrollproben zum Ausschluss der Einwirkung des Mediators HBA auf die mechanisch-technologischen Eigenschaften ohne das Vorhandensein vom Enzym Laccase	153

5.12.4	Ergebnisse der Laccase und Laccase – Mediator gebundenen MDF-Platten unter optimierten Herstellungsparametern	155
5.12.4.1	Mechanisch-technologische Eigenschaften Laccase oder Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten nach 2 h Inkubationszeit (50 % : 50 % Besprühung)	156
5.12.4.2	Vergleich von mechanisch-technologischen Eigenschaften bei unterschiedlichen Besprühungsarten .	159
5.12.4.3	Mechanisch-technologische Eigenschaften Laccase oder Laccase-Mediator gebundener MDF-Platten nach 2 h Inkubationszeit (100 % Besprühung)	162
5.12.4.4	Mechanisch-technologische Eigenschaften Laccase oder Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten nach 30 Min. Inkubationszeit (100 %ige Besprühung)	165
5.12.4.5	Mechanisch-technologische Eigenschaften Laccase oder Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten nach kurzer (< 2 Min.) Inkubationszeit (100 % Besprühung)	169
5.12.5	Fazit der Herstellung enzymgebundener, bindemittelfreier MDF-Platten	173
6	Zusammenfassung	177
6.1	Holzwerkstoffe und Bindemittel	177
6.2	Zielsetzung	178
6.3	Eigene Laccaseherstellung und Industrielaccase	179
6.4	Laboranalytische Untersuchungen zum Laccase-Mediator-System	179
6.5	Herstellung von enzymgebundenen Dämmstoffplatten	181
6.6	Herstellung von enzymgebundenen, bindemittelfreien Mitteldichten Faserplatten (MDF)	181
6.7	Schlussfolgerung	183
7	Ausblick	184
8	Literaturverzeichnis	185
9.	Anhang	200
9.1	Vergleich der mechanisch-technologischen Eigenschaften von Kontrollplatten und Laccase gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Rohdichten	200
9.2	Weitere Querkzugfestigkeiten in Abhängigkeit von der Presszeit	201
9.3	Weitere Dickenquellwerte nach 24 h Wasserlagerung in Abhängigkeit von der Presszeit	204
9.4	Weitere Biegefestigkeiten in Abhängigkeit von der Presszeit	207

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Holzwerkstoffproduktion in Deutschland 2006 (VHI, 2008)	2
Abb. 2:	Entwicklung der europäischen MDF-Produktion von 1994-2005 (EPF, 2007)	3
Abb. 3:	Schematischer Aufbau einer Holzzelle nach KERR & BAILEY (1934)	10
Abb. 4:	Cellulose – Ausschnitt (KHARAZIPOUR, 1996)	13
Abb. 5:	Hemicellulosenbausteine Hexosen und Pentosen (FENGEL & WEGENER 1984)	14
Abb. 6:	Ligninbausteine (FENGEL & WEGENER 1984)	15
Abb. 7:	Ein-Elektroneneliminierung durch das Enzym Laccase (RÜHL et al., 2007 b)	22
Abb. 8:	Gleichgewichtskaskade der Delignifizierung im Laccase-Mediator-System nach PAICE et al. (1999) .	26
Abb. 9:	Herstellungsablauf in der industriellen MDF-Fertigung in Anlehnung an MÜLLER (2005)	30
Abb. 10:	Darstellung eines Ein-Achs-Mischers der Fa. <i>BINOS</i> , Springe	31
Abb. 11:	Schematische Darstellung der Herstellung von enzymgebundenen MDF-Platten im Sprüh- und Nassverfahren und enzymgebundenen Dämmstoffplatten im Nassverfahren (in Anlehnung an KHARAZIPOUR, 1996 und 2002; BERGMANN, 1998)	33
Abb. 12:	Gießformkasten: 1. Unterteil, 2. heb- und senkbares Oberteil, 3. perforierte Kunststoffplatte mit Siebbespannung, 4. Flanschen mit Gummileisten, 5. Anschluss für Wassereinfüllung und Vakuumsauger (geändert nach Lampert 1967)	46
Abb. 13:	Schemazeichnung der Fa. <i>BINOS</i> – Pilotanlage zur Produktion von MDF-Platten	48
Abb. 14:	Berechnung der Laccase und Mediatorkonzentrationen zur Herstellung von Laccase und Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten	69
Abb. 15:	Extrazelluläre Laccaseaktivitäten von <i>Trametes versicolor</i> und <i>Trametes villosa</i>	72
Abb. 16:	Extrazelluläre Laccaseaktivitäten von <i>Trametes versicolor</i> und <i>Trametes villosa</i> induziert mit Vanillin und Xylidin	74
Abb. 17:	Extrazelluläre Laccaseaktivitäten von <i>Trametes hirsuta</i> und <i>Phlebia radiata</i> , induziert mit Indulin ..	75
Abb. 18:	Extrazelluläre Laccaseaktivitäten von <i>Trametes hirsuta</i> und <i>Phlebia radiata</i> , induziert mit Vanillin und Xylidin	75
Abb. 19:	Extrazelluläre Laccaseaktivität von <i>Trametes versicolor</i> und <i>Trametes villosa</i> in Abhängigkeit der Indulinkonzentration	77
Abb. 20:	Laccaseaktivität von <i>Trametes versicolor</i> während des Fermenterlaufes	78
Abb. 21:	Myceltrockenmasse von <i>Trametes versicolor</i> während des Fermenterlaufes	79
Abb. 22:	pH-Wert des Mediums von <i>Trametes versicolor</i> während des Fermenterlaufes	80
Abb. 23:	pH-Optimum und pH-Stabilität der <i>Novozym</i> Laccase im McIlvain Puffer	82
Abb. 24:	Temperaturoptimum und Temperaturstabilität der Laccase nach 2 Stunden in McIlvain Puffer	84
Abb. 25:	Mittleres Molekulargewicht (MW) von Ca-Ligninsulfonat (<i>Wafex</i>) nach 2 h Inkubation	86
Abb. 26:	Mittleres Molekulargewicht (Mw) von Ca-Ligninsulfonat (<i>WAFEX</i>) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	88
Abb. 27:	Mittleres Molekulargewicht (Mw) von Ca-Ligninsulfonat (<i>Wafex</i>) mit verschiedenen Mediatoren (Laccasekonzentration 200 U/ml, Mediatorkonzentration 10 mM in Mc-Ilvainpuffer, pH 6,0)	89
Abb. 28:	Mittleres Molekulargewicht (Mw) von Na-Ligninsulfonat nach 2 h Inkubation	91
Abb. 29:	Mittleres Molekulargewicht (Mw) von Na-Ligninsulfonat in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ..	92
Abb. 30:	Mittleres Molekulargewicht (Mw) von Kraftlignin (Indulin) nach 2 h Inkubation	93
Abb. 31:	Mittleres Molekulargewicht (Mw) von Kraftlignin (Indulin) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	95
Abb. 32:	Prozentualer Anteil der Hemicellulosen in verschieden behandelten Holzfasern	97
Abb. 33:	Ligningehalt verschieden behandelter Holzfasern	98
Abb. 34:	Extraktstoffgehalte verschieden behandelter Holzfasern	98
Abb. 35:	Kumulative Darstellung der Holzbestandteile für die Baumart Kiefer	99
Abb. 36:	REM-Aufnahme einer nativen Holzfaser im Puffer (TMP- Kiefernholz, Fa. Steico), 2410-fache Vergrößerung, Anregungsspannung 5,0 kV	102

Abb. 37:	REM-Aufnahme einer mit 100 U/ml Laccase inkubierten Holzfasern, 3430-fache Vergrößerung, Anregungsspannung 5,0 kV.....	103
Abb. 38:	REM-Aufnahme einer mit 200 U/ml Laccase inkubierten Holzfasern, 3090-fache Vergrößerung, Anregungsspannung 5,0 kV.....	103
Abb. 39:	REM-Aufnahme einer mit 100 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierten Holzfasern, 2460-fache Vergrößerung, Anregungsspannung 5,0 kV.....	104
Abb. 40:	REM-Aufnahme einiger mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierten Holzfasern, 2170-fache Vergrößerung, Anregungsspannung 5,0 kV.....	105
Abb. 41:	REM-Aufnahme einer mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierten Holzfasern, 5200-fache Vergrößerung, Anregungsspannung 5,0 kV.....	105
Abb. 42:	Photometrische Messung der Hydroxyl-Gruppen in der Fasersuspension in Abhängigkeit von der Laccase- und Mediatorkonzentration	108
Abb. 43:	Photometrische Messung der Hydroxyl-Gruppen in der Fasersuspension in Abhängigkeit des pH-Wertes (Laccasekonzentration 200 U/ml, Mediatorkonzentration 10 mM)	111
Abb. 44:	ESR-Spektrum einer Holzfaserkontrolle und Laccase-Mediator inkubierter Holzfasern	113
Abb. 45:	Typisches „solid-state“ – Spektrum Laccase-Mediator inkubierter Holzfasern.....	114
Abb. 46:	ESR-Spektren der Laccase (L 200) und Laccase-Mediator (L 200 + HBA 10) inkubierter Holzfasern.....	115
Abb. 47:	ESR-Spektren Laccase-Mediator inkubierter Holzfasern mit unterschiedlichen Laccasekonzentrationen.....	116
Abb. 48:	¹³ C NMR-Spektrum der Kiefernholzfasern	118
Abb. 49:	¹³ C NMR-Spektren der Kontrollprobe und der mit 200 U/ml Laccase inkubierten Holzfasern	119
Abb. 50:	¹³ C NMR-Spektrum von Laccase und Laccase-Mediator inkubierten Holzfasern	120
Abb. 51:	FTIR-Spektren der Proben K (Kontrollprobe, durchgezogene Linie), L 100 (mit 100 U/ml Laccase inkubierte Holzfasern, gestrichelte Linie) und L 100 + HBA 10 (mit 100 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierte Holzfasern, gepunktete Linie)	124
Abb. 52:	FTIR-Spektren der Proben K (Kontrollprobe, durchgezogene Linie), L 200 (mit 200 U/ml Laccase inkubierte Holzfasern, gestrichelte Linie) und L 200 + HBA 10 (mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierte Holzfasern, gepunktete Linie)	126
Abb. 53:	FTIR-Spektren der Proben K (Kontrollprobe, durchgezogene Linie), L 200 (mit 200 U/ml Laccase inkubierte Holzfasern, gestrichelte Linie) und L 100 (mit 200 U/ml Laccase Holzfasern, gepunktete Linie)	127
Abb. 54:	FTIR-Spektren der Proben K (Kontrollprobe, durchgezogene Linie), L 100 + HBA 10 (mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierte Holzfasern, gestrichelte Linie) und L 200 + HBA 10 (mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierte Holzfasern, gepunktete Linie)	128
Abb. 55:	FTIR-Spektren der Proben K (Kontrollprobe, durchgezogene Linie), L 200 + HBA 10 (mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierte Holzfasern, gestrichelte Linie) und L 200 + HBA 20 (mit 200 U/ml Laccase und 20 mM HBA inkubierte Holzfasern, gepunktete Linie)	129
Abb. 56:	Roddichten der Holzfaserdämmplatten (Kontrolle = Holzfasern im Puffergemisch, Lac. = Laccase inkubierte Holzfasern, Lac. + HBA = Laccase und HBA inkubierte Holzfasern, Stärke = stärkegebunden)	132
Abb. 57:	Ausgleichsfeuchte u_g bezogen auf das Normklima (Kontrolle = Holzfasern im Puffergemisch, Lac. = Laccase inkubierte Holzfasern, Lac. + HBA = Laccase und HBA inkubierte Holzfasern, Stärke = stärkegebunden)	133
Abb. 58:	Wasseraufnahme nach zwei- und 24-stündiger Quellung (Kontrolle = Holzfasern im Puffergemisch, Lacc = Laccase inkubierte Holzfasern, Lacc + HBA = Laccase und HBA inkubierte Holzfasern, Stärke = stärkegebunden).....	133
Abb. 59:	Dickenquellung nach zwei- und 24-stündiger Quellung (Kontrolle = Holzfasern im Puffergemisch, Lac. = Laccase inkubierte Holzfasern, Lac. + HBA = Laccase und HBA inkubierte Holzfasern, Stärke = stärkegebunden)	134
Abb. 60:	Querzugfestigkeit mit Normvorgabe aus EN 1607	135
Abb. 61:	Temperaturverlauf in der Plattenmitte einer 8 mm starken mit Laccase und Mediator gebundenen MDF-Platte während des Heißpressvorgangs bei 200 °C	143
Abb. 62:	Querzugfestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten in s/mm Plattendicke (22,5 s. entsprechen einer Gesamtpresszeit von 3 Min., 30 s. entsprechen 4 Min., 37,5 s. entsprechen 5 Min. und 45 s. entsprechen 6 Min.).....	144
Abb. 63:	Dickenquellwerte nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten in s/mm Plattendicke	146

Abb. 64:	Biegefestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten in s/mm Plattendicke.....	147
Abb. 65:	Querzugfestigkeiten und Dickenquellungen nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 50 % : 50 % und 5 Min. Presszeit bei 200 °C, Rohdichte 800 kg/m ³ (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)	156
Abb. 66:	Biegefestigkeiten von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 50:50 % und 5 Min. Presszeit bei 200 °C (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)	158
Abb. 67:	Querzugfestigkeiten und Dickenquellungen nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 100 % und 5 Min. Presszeit bei 200 °C, Rohdichte 800 kg/m ³ (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)	162
Abb. 68:	Biegefestigkeiten von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 100 % und 5 Min. Presszeit bei 200 °C (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)	164
Abb. 69:	Querzugfestigkeiten und Dickenquellungen nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 100 % und 5 Min. Presszeit bei 200 °C, Rohdichte 800 kg/m ³ (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)	166
Abb. 70:	Biegefestigkeiten von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 100 % und 5 Min. Presszeit bei 200 °C (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)	167
Abb. 71:	Querzugfestigkeiten und Dickenquellungen nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 100 % und 5 Min. Presszeit bei 200 °C, Rohdichte 800 kg/m ³ (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)	170
Abb. 72:	Biegefestigkeiten von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 100 % und 5 Min. Presszeit bei 200 °C (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)	171

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Bestandteile in Nadel- und Laubholz (FENGEL & WEGENER 1984).....	9
Tab. 2:	Anteile der drei Ligninbausteine im Nadel- und Laubholzlignin (Holzlexikon, 2003), Guaiacyleinheiten beinhalten Coniferylalkohol, Syringyleinheiten beinhalten Sinapylalkohol	15
Tab. 3:	BSM Medium.....	40
Tab. 4:	L ₁ -Agar Medium	41
Tab. 5:	Molekulargewichte der Polysterene Standards	58
Tab. 6:	Herstellungsparameter und Zusammensetzung der MDF-Platten.....	70
Tab. 7:	Aktivität bei alternierenden Substraten in 120 mM Na-Acetat Puffer.....	81
Tab. 8:	pH-Optimum sowie pH-Stabilität der Laccase im McIlvaine Puffer.....	82
Tab. 9:	Temperaturoptimum der Laccase (vor der Inkubation) und Temperaturtabilität nach 2 Stunden Inkubation in McILvain Puffer.....	84
Tab. 10:	Charakteristische Schwingungsbereiche für Holzbestandteile	123
Tab. 11:	Anforderungen an MDF-Platten für allgemeine Zwecke zur Verwendung im Trockenbereich (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG e. V., 2005).....	137
Tab. 12:	Mechanisch–technologische Eigenschaften verschiedener MDF-Platten bei unterschiedlichen Presstemperaturen.....	140
Tab. 13:	Vergleich Mechanisch-technologischer Eigenschaften zwischen 8 mm und 10 mm starken MDF Platten	148
Tab. 14:	Vergleich der mechanisch-technologischen Eigenschaften 10 mm starker MDF Platten bei unterschiedlicher Presstemperatur	150
Tab. 15:	Vergleich mechanisch-technologischer Eigenschaften 10 mm starker MDF-Platten bei einer Presstemperatur von 210 °C zu unterschiedlichen Presszeiten	151
Tab. 16:	Mechanisch-technologische Eigenschaften 8 mm starker MDF-Platten mit unterschiedlicher Rohdichte	152
Tab. 17:	Mechanisch-technologische Eigenschaften der Kontrollproben mit und ohne HBA	154
Tab. 18:	Probenbezeichnung und Probenzusammensetzung der hergestellten MDF-Platten.....	155
Tab. 19:	Faserfeuchten bei unterschiedlichen Besprühungsarten	159
Tab. 20:	Vergleich mechanisch-technologischer Eigenschaften 8 mm starker MDF-Platten bei unterschiedlichen Besprühungsarten	160

IV Formeln

Formel 1:	Berechnung der Biegefestigkeit nach EN 310	50
Formel 2:	Berechnung der Dickenquellung nach Wasserlagerung	51
Formel 3:	Berechnung der Querkzugfestigkeit nach EN 319.....	51
Formel 4:	Lambert-Beer´sches Gesetz und dessen Anwendung für die Bestimmung der Enzymaktivität.....	53
Formel 5:	Berechnung des Pentosangehaltes.....	60
Formel 6:	Berechnung des Ligningehalts nach DENCE (1992).....	61
Formel 7:	Berechnung des Extraktgehalts.....	61

V Anhang

Anhang 1: Mechanisch-technologische Eigenschaften von 8mm starken Kontroll MDF-Platten, 5 Minuten Presszeit, 30 Min. Inkubation	200
Anhang 2: Mechanisch-technologische Eigenschaften von 8mm starken Laccase gebundenen MDF-Platten (200 U/ml Laccase), 5 Minuten Presszeit, 30 Min. Inkubation.....	200
Anhang 3: Probe Kontrolle, Querzugfestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten.....	201
Anhang 4: Probe L100, Querzugfestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten.....	201
Anhang 5: Probe L100 + HBA 10, Querzugfestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten	202
Anhang 6: Probe L100 + HBA 20, Querzugfestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten	202
Anhang 7: Probe L200, Querzugfestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten.....	203
Anhang 8: Probe Kontrolle, Dickenquellung nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten	204
Anhang 9: Probe L 100, Dickenquellung nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten	204
Anhang 10: Probe L 100 + HBA 10, Dickenquellung nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten	205
Anhang 11: Probe L 100 + HBA 20, Dickenquellung nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten	205
Anhang 12: Probe L 200, Dickenquellung nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten	206
Anhang 13: Probe Kontrolle, Biegefestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten.....	207
Anhang 14: Probe L 100, Biegefestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten.....	207
Anhang 15: Probe L 100 + HBA 10, Biegefestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten	208
Anhang 16: Probe L 100 + HBA 20, Biegefestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten	208
Anhang 17: Probe L 200, Biegefestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten.....	209

1 Einleitung

1.1 Holzwerkstoffe

Bei Holzwerkstoffen handelt es sich um ein Produkt, bei der die Struktur des natürlich gewachsenen Holzes aufgelöst wurde und ein neues Gefüge mit neuer Dimension aufgebaut wird, bei dem zumeist spezifische Bindemittel verwendet werden. Die Entwicklung von Holzwerkstoffen liegt etwa 160 Jahre zurück. Im Zeitalter der Industrialisierung wurde es aus Bedarfsgründen erforderlich, Resthölzer aus der Sägeindustrie und schwache Holzsortimente, für die man vorher keine Verwendung hatte, durch Zerkleinerung oder Zerkleinerung und anschließendem Wiederausammenfügen nutzbar zu machen.

Die erste industrielle Fertigung von Holzfasernplatten fand in etwa um 1900 statt, als in England halbharte Faserplatten und in Amerika Faserplatten als Isoliermatten für Bauzwecke hergestellt wurden. Im Jahre 1914 wurde erfolgreich die erste Versuchsanlage zur Produktion poröser Faserplatten aus Holzabfällen errichtet (LAMPERT, 1967). Mitteldichte Faserplatten existieren als Ergebnis neuer technologischer Entwicklungen seit 1965, als in Amerika die erste Anlage zur MDF-Plattenproduktion entstand (DEPPE & ERNST, 1996). Mittlerweile haben sich auch zwei bis heute verwendete Holzfaseraufschlussverfahren etabliert, das Dampfexplosionsverfahren nach MASON im Jahre 1926 und das Defibrator-Verfahren nach ASSPLUND im Jahre 1931 (KLOESER et al., 2007). Neben den Holzfasernplatten entwickelten sich weitere Holzwerkstoffarten. So lief beispielsweise die industrielle Produktion von Spanplatten Mitte der 40er Jahre des 20. Jahrhunderts an. Als weitere Holzwerkstoffe sind noch OSB-Platten (oriented strand board), Sperrhölzer und Wood Plastic Composites (WPC) zu nennen.

Dabei erfolgt die Einteilung der verschiedenen Holzwerkstoffe nach verschiedenen Kriterien, dem Ausgangsmaterial, dem Bindemittel, der Herstellungsparameter und der Dichteverhältnisse. Die Auswahl der Ausgangsmaterialien ist der entscheidende Faktor bei dieser Einteilung, da die weiteren Kriterien sich aus dieser ergeben (MÜLLER, 2005).

Zu den Vorteilen der Holzwerkstoffe zählt, dass die positiven Eigenschaften des Holzes wie z. B. leichte Bearbeitbarkeit, Dauerhaftigkeit und ein geringes Gewicht im Vergleich zur Festigkeit bestehen bleiben. Weiterhin zu erwähnen ist, dass durch die gezielte Anordnung der Holzbestandteile (Spanrichtung, Faserrichtung) eine Optimierung der Festigkeitseigenschaften und der Dimensionsstabilität möglich ist, die vom Vollholz in diesem Maße nicht erfüllt werden können.

1.2 Holzwerkstoffe und ihr wirtschaftlicher Aspekt

Holzwerkstoffe sind in Deutschland heute nach der Sägeholzindustrie das zweitwichtigste Segment der Rohholznutzung (MARUTZKY, 2004). Der jährliche Rohholzbedarf der deutschen Holzwerkstoffindustrie liegt laut dem Verband der Holzwerkstoffindustrie (VHI) derzeit bei rund 20 Mio. Festmetern, was etwa 35 % des hiesigen Holzeinschlages entspricht (VHI, 2008). In Deutschland wurden im Jahr 2006 etwa 27 % von insgesamt 60,5 % der in Europa hergestellten Holzwerkstoffe produziert (VHI, 2008, siehe Abbildung 1). Bei der Betrachtung der Produktionsmenge der Holzwerkstoffe in Deutschland fällt auf, dass die Spanplattenindustrie mit ca. 8,2 Mio. m³ (57 %) und die Faserplattenindustrie mit ca. 5 Mio. m³ (34,4 %) produzierten Holzwerkstoffen das größte Produktionsvolumen auf dem Gebiet der Holzwerkstoffe besitzen. Die vielfältigen Einsatzgebiete von Span- und Faserplatten im Baugewerbe und der Möbelindustrie deuten auf eine weitere Produktionssteigerung in den kommenden Jahren hin (VHI, 2008).

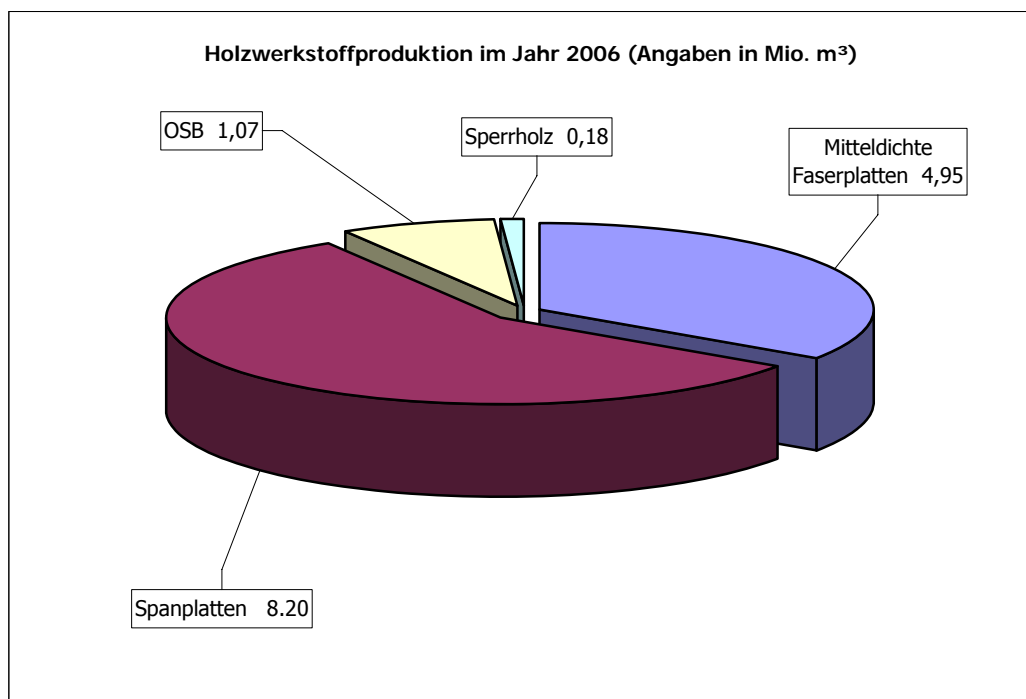


Abb. 1: Holzwerkstoffproduktion in Deutschland 2006 (VHI, 2008)

Die europäische MDF-Produktion überschritt laut European Panelboard Federation (EPF) im Jahre 2002 (EPF, 2004) erstmals die Marke von 10 Mio. m³ um 9 % über dem Vorjahreswert (siehe Abbildung 2). Im Jahre 2005 lag die MDF-Produktion bei etwa 13,5 Mio. m³. Entsprechend der Entwicklung am amerikanischen Markt ist auch für Europa eine weitere Substitution der Spanplatte und Massivholz durch die Mitteldichte Faserplatte zu erwarten.

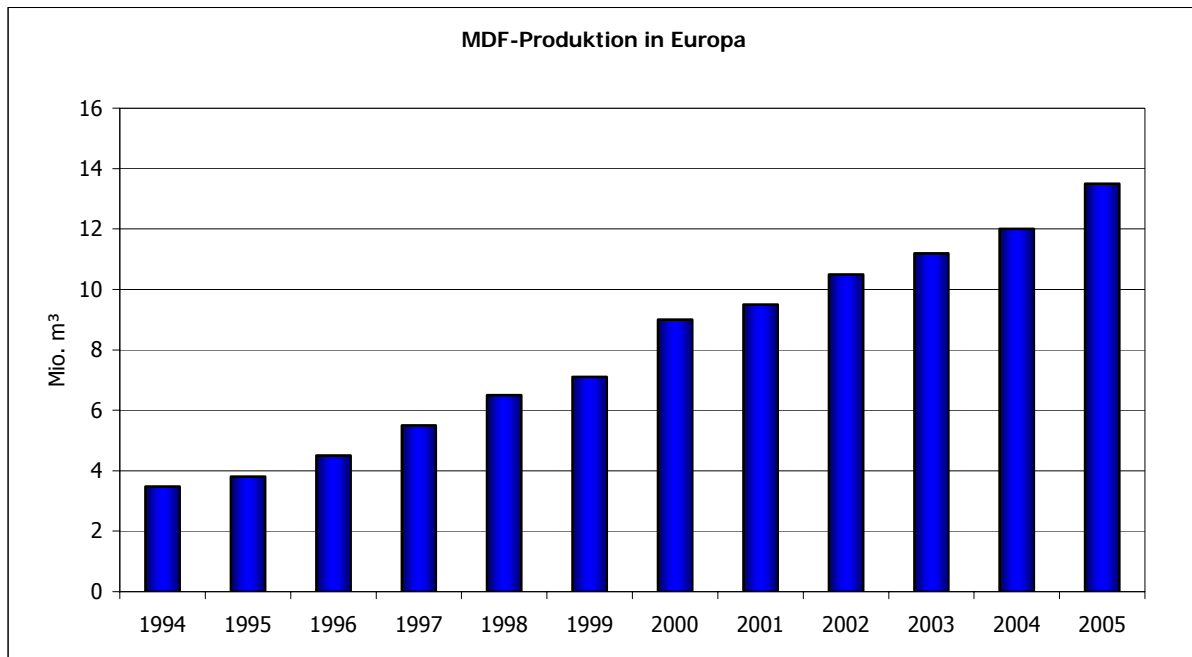


Abb. 2: Entwicklung der europäischen MDF-Produktion von 1994-2005 (EPF, 2007)

Die Holzwerkstoffindustrie ist aufgrund ihrer Produktionsmengen weltweit einer der größten Abnehmer für Bindemittel. Diese sind zur Zeit vor allem konventionelle Bindemittel auf petrochemischer Basis. Hierzu gehören überwiegend die Harnstoff-Formaldehyd-Harze (UF), Melamin verstärkte Harnstoff-Formaldehyd-Harze (MUF), Phenol-Formaldehyd-Harze (PF) und polymere Diisocyanate (PMDI). Auf die Bindemittel entfallen beispielsweise bei der MDF-Plattenproduktion etwa 20 % der Endherstellungskosten (KHARAZIPOUR, 2004). Durch die ständig steigenden Rohölpreise, sowie die Abhängigkeit der Holzwerkstoffindustrie von diesen petrochemischen Bindemitteln, verteuerten sich die hergestellten Holzwerkstoffe seit den letzten Jahren deutlich (SCHÖPPER, 2006).

Als problematisch wird zudem der Gehalt an Formaldehyd in den oben genannten konventionellen Bindemitteln gesehen. Neben dem natürlichen Vorkommen von Formaldehyd während der Trocknung von Holz, z. B. in Form von Spänen und Fasern werden auch bei der Herstellung, Lagerung und Verwendung konventionell hergestellter Holzwerkstoffe, geringe Mengen an Formaldehyd freigesetzt (ROFFAEL, 1982; SUNDIN und ROFFAEL, 1989; ROFFAEL et al., 1993). In Verbindung mit Holzwerkstoffen ist Formaldehyd vor allem als Inhalationsstoff

von Bedeutung. Aufgrund seiner Reaktivität wird er sehr schnell umgesetzt und kann bei entsprechender Konzentration zu Reizungen der Schleimhäute, der Augen und der Haut führen (SCHÖPPER, 2006). Akute lebensgefährliche Konzentrationen sind im Zusammenhang mit Holzwerkstoffen nicht dokumentiert worden (WAGNER, 1997). Im Jahre 2004 wurde Formaldehyd aufgrund einiger durchgeführter Untersuchungen in den USA von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als karzinogen eingestuft (IARC, 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Reklassifizierung des Formaldehyds von „krebsverdächtig“ zu „krebserregend“ durch das IARC empfohlen (THOLE et al., 2006). Bei den durchgeführten Untersuchungen in amerikanischen Betrieben der Holzwerkstoffindustrie wurde eine selten auftretende Form von Nasenkrebs attestiert, die nach dem aktuellen Stand der Untersuchungen auf sehr hohe Formaldehydkonzentrationen in den Produktionsstätten zurückzuführen ist (MARUTZKY, 2005).

So kann als wichtiges Kriterium für die Holz be- und verarbeitenden Betriebe, insbesondere die Holzwerkstoffindustrie, eine Entwicklung von naturnahen Bindemitteln gesehen werden (SCHÖPPER, 2006, MÜLLER et al., 2007). Es wird damit gerechnet, dass die Diskussion über die Art der Bindemittel in den kommenden Jahren auch über die Wettbewerbsfähigkeit der einzelnen Unternehmen entscheiden wird. So bietet die Verwendung naturnaher Bindemittel den Holzwerkstoffunternehmen Chancen, umweltpolitisch akzeptierte Produktionsverfahren zu etablieren, eine größere Unabhängigkeit vom steigenden Rohölpreis zu erreichen und durch den Verkauf ihrer gesundheitlich unbedenklichen, formaldehydfreien Produkte eine breite Akzeptanz in der Bevölkerung zu gewinnen.

1.3 Lignin als Bindemittel

Von den nachwachsenden Rohstoffen (Zellulose, Hemicellulose, Lignin, Stärke, Protein, etc.) ist das Lignin der entscheidende Faktor für innere Festigkeit des Holzes. Das ansonsten kaum zugängliche Lignin kann in der Natur durch Enzyme bestimmter Pilze abgebaut werden. Diese nicht-chemische Reaktion soll als Grundprinzip dienen, das Lignin auf natürlichem Wege als „Klebstoff“ für den Herstellungsprozess von bindemittelfreien Holzwerkstoffen zu reaktivieren.

Versuche haben gezeigt, dass die enzymatische Aktivierung von Lignin grundsätzlich zur Bindung von Holzwerkstoffen geeignet ist. NIMZ et al. (1972) waren dabei die ersten, die Lignin als natürlich vorkommendes Polyphenol zusammen mit einem chemischen Redoxsystem (u. a. mit H_2O_2) als Bindemittel einsetzten. Die Verwendung von Lignin galt dabei als besondere Innovation, Holzwerkstoffe auf der Basis von Nebenprodukten

herzustellen. Lignin fällt als Nebenprodukt der Celluloseherstellung weltweit in Mengen von ca. 50 Millionen Tonnen pro Jahr an (GLASSER et al., 1987, BARISKA et al., 2001), wovon nach einer Schätzung von LITTLE (1991) weltweit nur etwa 6 % industrielle Anwendung finden. Da das Verfahren nach NIMZ u. a. aufgrund des Einsatzes von H_2O_2 in großen Mengen zu gefährlich erschien, war eine großtechnische Produktion von Holzwerkstoffen undenkbar. Im Jahre 1980 ersetzten HÜTTERMANN und 1983 KHARAZIPOUR das chemische Redoxsystem nach NIMZ et al. (1972) durch biologische Radikalbildner. Es handelt sich um die Enzymklasse der Laccasen aus Weißfäulepilzen (HÜTTERMANN und HAARS, 1981; KHARAZIPOUR, 1983; KHARAZIPOUR 1996; KHARAZIPOUR und HÜTTERMANN, 1998). Die Laccase übernimmt dabei die Aufgabe, das Lignin zu polymerisieren, so dass am Ende eine holzartige Struktur entsteht. Als HÜTTERMANN und HAARS (1981) feststellten, dass durch dieses Verfahren verklebte Holzbrettchen gute Klebefestigkeiten erreichen können, optimierte KHARAZIPOUR (1983) den neuartigen „Zweikomponentenkleber“ bis hin zur industriellen Applikation. Die Aktivierung verläuft dabei um so besser, je „naturbelassener“ das Lignin ist, also je weniger Änderungen an seiner chemischen Struktur vorgenommen worden sind.

Eine Alternative zum „Zweikomponentenkleber“ stellt die direkte enzymatische Transformation der holzfasereigenen Ligninkruste in ein aktives Bindemittel dar. Eine Ligninkruste entsteht auf der Holzfaseroberfläche, wenn das Holz im sogenannten Defibrator- oder ASSPLUND-Verfahren aufgeschlossen wird. Bei diesem Aufschlussverfahren ist das in der Mittellamelle enthaltene Lignin durch die thermisch-mechanische Behandlung glasig geworden und liegt als inaktive Kruste auf der Faser (Kharazipour, 1996).

Es handelt sich um das sogenannte „Einkomponenten-System“, bei dem ein geeignetes Enzym auf der Holzfaseroberfläche Reaktionen hervorrufen muss (KÜES et al., 2007), um die Holzfasern untereinander zu „verkleben“. Der Reaktionsmechanismus liegt in der Autoadhäsion der Holzfasern begründet. Das „Einkomponenten-System“ eignet sich für die Herstellung von Mitteldichten Faserplatten (MDF) (KÜES et al., 2007).

1.4 Enzyme und Mediatoren bei der Herstellung von Holzwerkstoffen, insbesondere Mitteldichter Faserplatten (MDF)

In zahlreichen Untersuchungen (KHARAZIPOUR und HÜTTERMANN, 1993; KHARAZIPOUR et al., 1993, 1994 und 1997; KHARAZIPOUR, 1996 und 1998; HÜTTERMANN et al., 2001; FELBY et al., 1997 und 2002; WIDSTEN, 2002; KÜES et al., 2007) wurde gezeigt, dass es durch die Inkubation von Holzfasern mit Phenoloxidasen (Laccasen) möglich ist, die Ligninkruste auf der Holzfaseroberfläche zu modifizieren und das Lignin so zu aktivieren, dass bei der

folgenden konventionellen Verpressung zu Faserplatten relativ gute und auch wasserbeständige Verbindungen zwischen den Fasern erreicht werden konnten. Dabei zeigte sich jedoch, dass man im derzeitigen Entwicklungsstadium dieses Verfahrens mit den hergestellten Holzwerkstoffen nicht alle Anforderungen der Normen erfüllen konnte.

Laccasen (Polyphenoloxidasen; E.C. 1.10.3.2.) gehören neben den Ligninperoxydasen (E.C. 1.11.1.7.) und Manganperoxydasen (E.C. 1.11.1.13.), zu den wichtigsten ligninabbauenden und –polymerisierenden Enzymen (LEONTIEVSKY et al., 1997). Laccasen finden bereits in vielen technischen Prozessen wie z. B. beim „Biobleaching“ in der Papierherstellung (CALL und MÜCKE, 1997; MESSNER et al., 1993, MESSNER, 1993 und MESSNER und SREBOTNIK, 1994) und der Textilindustrie (GALANTE und FORMANTICI, 2003) Anwendungen.

Hinsichtlich biotechnologischer Zwecke hat Laccase den Vorteil, dass es Sauerstoff als Oxidationsmittel verwendet, während die Peroxidasen dafür Wasserstoffperoxid benötigen, was angesichts der hohen Aggressivität und geringen Stabilität dieser Chemikalie, in biotechnologischen Verfahren erhebliche Probleme bereitet (MAI et al., 2004). Ein Nachteil beim Einsatz von Laccasen ist deren geringes Redoxpotential. Aufgrund dieses geringen Redox-Potentials benötigen Laccasen daher in der Regel auch eine freie Phenol-Gruppe am aromatischen Ring zur Oxidation, was ihren Einsatz in der Ligninbiotechnologie naturgemäß hemmt, da im natürlichen Lignin aufgrund der bei der Synthese des Makromoleküls ablaufenden Radikalreaktionen die meisten Phenolgruppen substituiert vorliegen (LEONOWICZ et al., 2001; ROCHEFORT et al., 2004).

BOURBONNAIS und PAICE (1990) konnten jedoch als Erste zeigen, dass nach der Zugabe von niedermolekularen Redox-Verbindungen (sog. Mediatoren = Mittler) Laccase in der Lage ist, auch nichtphenolische Verbindungen anzugreifen.

Somit spielen Mediatoren bei der Biochemie des Ligninabbaus eine sehr wichtige Rolle (CALL und MÜCKE, 1997; GOODELL et al., 1997; CRESTINI et al. 2003). Mediatoren sind bereits in der biochemischen Bleiche mit Laccasen eingesetzt worden (CALL und STRITTMATTER, 1992; LUND und FELBY, 2001; CAMERERO et al. 2004; CHAKER und RAGAUSKAS, 2004; ROCHEFORT et al. 2004). In all diesen Fällen geht es um eine Depolymerisierung des Lignins.

Bei der Herstellung von enzymatisch gebundenen Holzwerkstoffen sind Mediatoren hingegen noch nicht eingesetzt worden.

2 Ziele des Projektes

Das Hauptziel dieser Dissertation ist die Entwicklung enzymgebundener, bindemittelfreier Holzwerkstoffe, insbesondere Mitteldichter Faserplatten (MDF), die ohne eine weitere Zugabe von konventionellen Bindemitteln die Vorgaben aller relevanten Normen erfüllen können und somit für eine industrielle Applikation geeignet sind. Dabei ist eine Substitution der konventionellen Bindemittel auf der Basis von Petrochemikalien vor allem aus ökologischer, aber auch ökonomischer Sicht für die Holzwerkstoffindustrie von hoher Bedeutung. So kann die Herstellung emissionsfreier, vor allem formaldehydfreier, Plattenprodukte ermöglicht werden, die eine hohe Akzeptanz in der Öffentlichkeit erwarten lassen.

Zu diesem Zweck sollen verschiedene Enzym-Mediator-Systeme untersucht und optimiert werden, um eine höhere Reaktivität bei der Aktivierung der fasereigenen Bindekräfte zu erreichen. Als Enzym soll die Phenoloxidase (Laccase) angewandt werden.

Während das Laccase-Mediator-System zum Beispiel schon für einige biochemische Prozesse eingesetzt wird (vgl. Kapitel 1.4), ist die Verwendung von Mediatoren bei der Herstellung enzymgebundener MDF-Platten völlig neu. Daher ist es wichtig, die Wirkung von Mediatoren in der Kombination von Holzfasern und Laccase zu untersuchen.

Für die Herstellung enzymgebundener MDF-Platten sollen grundsätzlich die besten Voraussetzungen für eine effektive Aktivierung der fasereigenen Bindekräfte ermittelt werden. Diese sind das Ermitteln einer hochwirksamen Laccase- und Mediatorkonzentration, sowie das Bestimmen eines optimalen pH-Wertes für die Inkubation der Holzfasern. Weiterhin müssen ideale Bedingungen für die Inkubation der Holzfasern geschaffen werden. Von großer Bedeutung ist dabei die Inkubationszeit. Die Untersuchungen für diese Voraussetzungen können im Vorfeld der MDF-Plattenproduktion in Laborversuchen durchgeführt werden. Eine Überprüfung der gewonnenen Ergebnisse ist bei der Anwendung im technischem Maßstab dennoch erforderlich.

In analytischen Laboruntersuchungen soll zunächst auf die Grundlagen der biotechnologischen Laccaseproduktion eingegangen werden. Dazu wird nach Vorversuchen mit Weißfäuleorganismen ein bestimmter Weißfäulepilz im Labormaßstab fermentiert, um seine Entwicklung anhand seiner Laccaseproduktion zu dokumentieren.

Anschließend erfolgt die Analyse der technischen Laccase, die für die Untersuchungen des Laccase-Mediator-Systems bei der Inkubation mit Ligninen und Holzfasern und die Produktion der MDF-Platten eingesetzt wird.

Mittels der Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) wird das Laccase-Mediator-System in Ligninversuchen modellhaft beschrieben.

Eine chemische Charakterisierung der in dieser Dissertation verwendeten Holzfasern erfolgt vor und nach der Inkubation mit Laccase bzw. mit einem Laccase-Mediator-System.

Aussagen zu den morphologischen Eigenschaften Laccase und Mediator behandelte Holzfasern werden durch die Aufnahmen mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) getroffen.

In einer weiteren Analyse werden spectrophotometrische Bestimmungen des Gehaltes phenolischer Hydroxyl-Gruppen Laccase und Mediator inkubierter Holzfasern durchgeführt.

Zur Bestimmung der durch das Laccase-Mediator-System gebildeten freien Radikale auf der Holzfaseroberfläche werden Spektren mittels Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) angefertigt.

Die Strukturaufklärung der Holzfaserbestandteile erfolgt mittels Nuclear-Magnetic-Resonance (NMR) Spektroskopie und der Fourier-Transform-Infrared (FTIR) Spektroskopie.

Neben dem eigentlichen Hauptziel, der Produktion enzymgebundener, bindemittelfreier MDF-Platten, werden im Labormaßstab Holzfaserdämmplatten hergestellt, deren Holzfasern ebenfalls mit dem Laccase-Mediator-System inkubiert werden. Anschließend werden die Dämmstoffplatten mechanisch-technologischen Eigenschaftstests unterzogen. Die Intention der Dämmplattenherstellung ist, ein weiteres Anwendungsgebiet für enzymatische Verfahren zu erschließen.

Letzlich werden unter Berücksichtigung der Ergebnisse aller laboranalytischen Untersuchungen zum Laccase-Mediator-System enzymgebundene, bindemittelfreie MDF-Platten im Pilotmaßstab hergestellt. Zur Optimierung des Herstellungsverfahrens werden sämtliche Parameter überprüft, um die bestmöglichen mechanisch-technologischen Eigenschaften der MDF-Platten zu erhalten. Dies sind neben der Laccasekonzentration, Mediatorkonzentration, der Inkubationszeit und weitere Parameter, wie das Besprühungsverfahren, die Faserfeuchtigkeiten, die Plattenstärke, die Rohdichte, die Presszeit und die Presstemperatur. Abschließend erfolgt die Überprüfung der mechanisch-technologischen Eigenschaften nach den relevanten Normen.

Ist die Herstellung enzymgebundener, bindemittelfreier MDF-Platten hinsichtlich der Normen erfolgreich verlaufen, liegt ein Transfer vom Pilot- in den Industriemaßstab unter Anwendung der Produktionsparameter nahe.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Chemischer Aufbau des Holzes

Holz besteht als heterogenes, organisches Material überwiegend aus den chemischen Elementen Kohlenstoff (50 %), Sauerstoff (43 %), Wasserstoff (6 %) und Stickstoff (< 1 %). Die Zusammensetzung schwankt zwischen den Holzarten und innerhalb eines Baumstammes geringfügig. Dabei ist es nicht der Prozentsatz der chemischen Elemente, sondern deren chemische Verbindungen, die die Unterschiede der Eigenschaften bei der Holzverwendung bewirken. Die aus den oben genannten Elementen zusammengesetzten Hauptbestandteile des Holzes sind die makromolekularen Substanzen Polysaccharide (Cellulose, Hemicellulosen) und Lignin. Neben diesen Makromolekülen gibt es niedermolekulare Substanzen, die als Extraktstoffe (organisch) und Asche (anorganisch) bestimmt werden. Alle Substanzen kommen in der Zellwand und darüber hinaus im Zellinhalt, sowie in den zellulären Hohlräumen vor (FENGEL & WEGENER 1984).

Für die Hölzer der gemäßigten Klimate ergeben sich folgende Anteile:

Cellulose 40 % bis 50 %, Hemicellulosen 20 % bis 35 %, Lignin 20 % bis 35 %, Extraktstoffe 0,5 % bis 10 % und Asche 0,1 % bis 0,5 %. Im Allgemeinen liegt der Ligninanteil bei Nadelhölzern höher als bei Laubhölzern, der Hemicellulosenanteil ist dagegen geringer (FENGEL & WEGENER 1984). Zur Verdeutlichung gibt die folgende Tabelle (1) eine Übersicht über die Bestandteile im Nadel- und Laubholz.

Tab. 1: Bestandteile in Nadel- und Laubholz (FENGEL & WEGENER 1984)

Holzbestandteile	Nadelholz [%]	Laubholz [%]
Cellulose	40 - 50	40 - 50
Hemicellulosen	20 - 30	25 - 35
Lignin	25 - 35	20 - 30
Extraktstoffe	0,5 - 10	0,5 - 10
Asche	0,1 - 0,5	0,1 - 0,5

Je nach Zusammensetzung der Holzbestandteile haben alle Holzarten verschiedene physikalisch-chemische und technologische Eigenschaften.

3.1.2 Aufbau der verholzten Zellwand

Um ihr Überleben an Land zu sichern, haben die Pflanzen im Laufe ihrer Evolution ein System geschaffen, das sie vor permanenten Störfaktoren, wie zum Beispiel der Verdunstung von Wasser schützen. Es entwickelten sich Leitsysteme und Zellwände, dabei insbesondere die verholzten Zellwände, die für viele technische Entwicklungen Vorbildfunktionen haben (BERGMANN, 1998). Auch halten Zellwände im Verband, wie beispielsweise bei Bäumen oder Getreidehalmen, Höhen-Durchmesser-Verhältnissen stand, die gegenwärtig noch mit keinem menschlich konstruierten Werkstoff erreicht werden konnten (HÜTTERMANN & KHARAZIPOUR, 1993).

Wie alle Zellwände umhüllt auch die verholzte Zellwand die pflanzliche Zelle. Sie entsteht bei der Zellteilung. Während des Dickenwachstums werden im wesentlichen die folgenden drei Wandschichten auf die Primordialwand, die spätere Mittellamelle, aufgelagert: die Primärwand, die mehrschichtige Sekundärwand und die Tertiärwand.

Die einzelnen Zellwandschichten unterscheiden sich in ihrer chemischen Zusammensetzung und bei den Schichten der Sekundärwand in der Orientierung der Cellulose-Mikrofibrillen. Die Zellwand setzt sich aus der Matrix (Grundsubstanz), der Gerüstsubstanz und den In- und Adkrusten zusammen. Inkrusten ist ein veralteter Begriff für das Lignin. Die wichtigsten Adkrusten sind die hydrophoben Stoffe Cutin und Suberin (BARISKA et al., 2001).

Die wichtigsten chemischen Komponenten, die für die optimale Stabilität des Zellverbundes und somit für maximale Elastizität, Zug- und Druckfestigkeiten verantwortlich sind, sind die Cellulose und Hemicellulosen, sowie das Lignin. Die Cellulose ist dabei für die Zugfestigkeit verantwortlich, das Lignin für die Druckfestigkeit. Die Hemicellulosen sorgen für eine Verbindung zwischen der Cellulose und dem Lignin (siehe Kapitel 3.1.2.1 und 3.1.2.2).

In der folgenden Abbildung (3) ist eine verholzte Zellwand schematisch dargestellt.

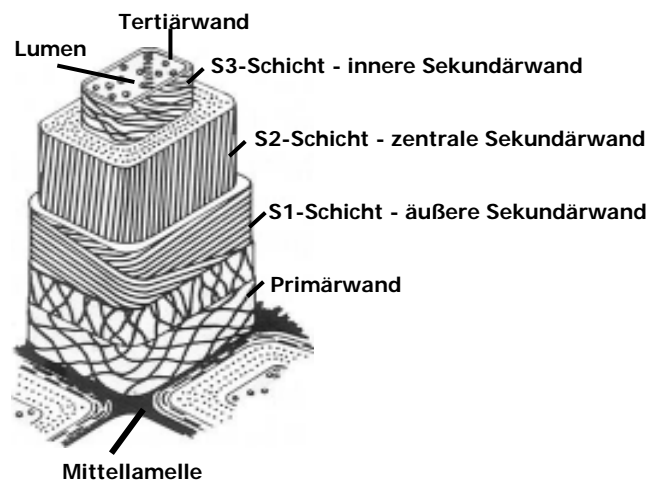


Abb. 3: Schematischer Aufbau einer Holzzelle nach KERR & BAILEY (1934)

Die einzelnen Zellwandbestandteile werden im folgenden beschrieben.

Mittellamelle

Die Mittellamelle wird während der Zellteilung gebildet. Ihre Größe beträgt bis zu 2 μm . Sie verbindet benachbarte Zellen fest miteinander (RAVEN et al., 1988) So besitzen zwei aneinandergrenzende Zellen eine gemeinsame Mittellamelle. Auf diese Mittellamelle werden alle anderen Zellwandschichten aufgelagert (siehe Abbildung 3). Die Mittellamelle besteht aus einer amorphen Grundmasse, die sich hauptsächlich aus Pektinen und Lignin zusammensetzt. Bei Pektinen handelt es sich um hochpolymere Substanzen, die Bausteine aus Galacturonsäuremolekülen mit teilweise durch Methanol veresterten Carboxylgruppen enthalten. Pektine übernehmen während des Zellwachstums die Aufgabe, als Kittsubstanz benachbarte Zellen miteinander zu verbinden.

Am Ende des Zellwachstums beginnt die Lignifizierung von der Mittellamelle aus und weitet sich auf die anderen Zellschichten aus. Nach der Verholzung weist die Mittellamelle den mit bis zu 70 % prozentual größten Ligninanteil in den Holzzellen auf (ROFFAEL et al., 2004). Aus dem hohen Ligninanteil ergibt sich folglich eine hohe Druckfestigkeit.

Primärwand

Während der Zellteilung wird an die Mittellamelle die Primärwand angelagert (siehe Abbildung 3). Da Mittellamelle und Primärwand mikroskopisch schlecht zu unterscheiden sind, werden sie auch als Mittelschicht bezeichnet. In der Primärwand befindet sich außer der Matrix eine Gerüstsubstanz aus submikroskopischen Cellulose-Mikrofibrillen. Dabei liegen die Cellulosefibrillen verstreut in der Matrix, was als Streuungstextur bezeichnet wird. Bedingt durch diese Streuungstextur sind die Räume zwischen den Cellulosefibrillen sehr groß, wodurch der Anteil der Cellulose in der Primärwand mit 2,5 % am Gesamtanteil gering bleibt (BARISKA et al., 2001). Weiterhin befinden sich in der Primärwand Hemicellulosen und Glykoproteine, so genannte Makromoleküle bestehend aus Kohlehydraten und Eiweiß (SCHÖPPER, 2006). Darüber hinaus sind in der Primärwand Pektine eingelagert, wodurch die Wand während des Streckenwachstums ständig gedehnt und vergrößert werden kann. Mit der Einlagerung von Lignin wird sie jedoch starr. Die Dicke der Primärwand beträgt etwa 0,1 μm (BARISKA et al., 2001).

Sekundärwand

Die Sekundärwand nimmt den größten Anteil an der Zellwand ein. Sie wird der Primärwand aufgelagert, wenn das Streckungs- und Weitenwachstum der Zelle beendet ist. In der Sekundärwand ist die Cellulose mit einem relativen Anteil bis zu 94 % enthalten (BARISKA et al., 2001).

Die Sekundärwand ist dreischichtig in die so genannte S1-, S2- und S3-Schicht aufgeteilt. Die einzelnen Schichten unterscheiden sich sowohl in ihrer Dicke, dem Cellulosegehalt als auch in der Orientierung der Cellulosefibrillen zueinander. Da keine Pektine oder Glykoproteine in diesen Zellschichten vorhanden sind, handelt es sich bei Sekundärwänden um starre und schwer dehnbare Zellwände (BERGMANN, 1998).

Die S1-Schicht (äußere Sekundärwand) liegt direkt auf der Primärwand (siehe Abbildung 3). Ihre Cellulosefibrillen weisen eine schwache Paralleltextrur auf, wobei sie sich annähernd quer zur Längsachse der Zelle orientieren. Die Dicke liegt bei etwa 0,2 μm . Die S1-Schicht wird während der Differenzierungsphase der Zelle gebildet.

Die S2-Schicht (zentrale Sekundärwand) ist die stärkste Zellwandschicht (siehe Abbildung 3). Sie bildet den Hauptteil der Zellwand, ist zwischen 1 μm und 5 μm dick und macht im Mittel 80 % der Gesamtzellwand aus. Die Fibrillen sind eng aneinander anliegend und verlaufen parallel zueinander in einer flachen Spirale (parallele Schraubentextrur) nahezu in Richtung der Zellachse. Es ist davon auszugehen, dass einzelne Lamellen, die aus Cellulose, Lignin und Hemicellulose aufgebaut sind, aufeinander folgen und in ihrer Gesamtheit die S2-Schicht bilden (BARISKA et al., 2001).

Die S3-Schicht (innere Sekundärwand) kommt nur bei Parenchymzellen vor und ist im Verhältnis zu den anderen Sekundärwandschichten dünn (ca. 0,1 μm) (siehe Abbildung 3). Sie besteht nur aus einer Lamelle und ähnelt in der Zusammensetzung und der Fibrillentextrur eher der Primärwand (BARISKA et al., 2001).

Tertärwand

Die Tertiärwand wird als letzte Wandschicht zum Lumen, dem Hohlraum der Zellen, hin gebildet, welche mit der S3-Schicht verwechselt werden kann (siehe Abbildung 3). Die Fibrillen liegen in leicht spiraliger Form vor. Darüber hinaus zeichnet sich die Tertiärwand durch eine hohe Konzentration von Lignin aus, wodurch sie widerstandsfähiger gegen enzymatische und chemische Einwirkungen ist (BARISKA et al., 2001).

3.1.2.1 Polysaccharide

Cellulose

Die Cellulose ist der häufigste Naturstoff der Erde. Als wichtigster Holzbestandteil bildet sie die Gerüstsubstanz der verholzten Zellwand und ist in erster Linie für die Zugfestigkeit des Holzes verantwortlich. Chemisch handelt es sich um ein hochpolymeres Polysaccharid mit unverzweigter, kettenförmiger Molekülstruktur. Ein Cellulosemolekül besteht aus vielen Glucoseeinheiten, die linearpolymer durch 1,4 β -glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Für den Aufbau eines Cellulose-Kettenmoleküls werden im Durchschnitt 8000 Celluloseeinheiten benötigt (Durchschnittspolymerisationsgrad) (FENGEL & WEGENER 1984).

Die langen, dünnen Celluloseketten sind zu Mikrofibrillen (Elementarfibrillen) vereinigt. In diesen Mikrofibrillen liegen die fadenförmigen Cellulosemoleküle in einer Form vor, dass sich streng geordnete kristalline Bereiche, die Micellen, mit weniger geordneten Bereichen abwechseln. Je 50-100 Mikrofibrillen bilden die Makrofibrillen, welche einen Durchmesser von etwa 0,5 μm und eine Länge von etwa 4 μm haben. So angeordnet verleiht die Cellulose der Makrofibrille eine Zugfestigkeit, wie sie ein gleich dicker Stahldraht haben würde (BARISKA et al., 2001).

Abbildung 4 zeigt einen Ausschnitt aus einem Cellulosemolekül.

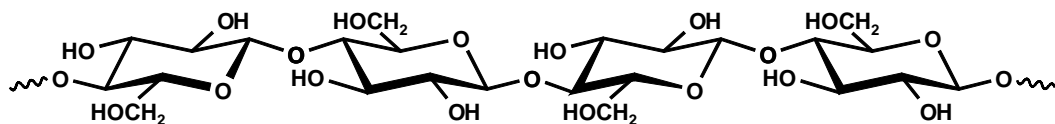


Abb. 4: Cellulose – Ausschnitt (KHARAZIPOUR, 1996)

Hemicellulosen

Die Hemicellulosen sind auch als Polyosen bekannt. Wie die Cellulose sind sie aus Zuckerbausteinen aufgebaut und in den Zellwänden teilweise eng mit ihr benachbart. Jedoch unterscheiden sich die Hemicellulosen von der Cellulose im Molekülaufbau. Sie bestehen im wesentlichen aus fünf unterschiedlichen Zuckerbausteinen und haben eine deutlich kürzere Kettenlänge mit etwa 50 bis 250 Einheiten. Wie in Abbildung 5 dargestellt treten in erster Linie die Xylose und Mannose, daneben die Arabinose, Galactose und Glucose als wichtigste Bausteine der Hemicellulosen auf (FENGEL, WEGENER 1984, siehe Abbildung 5). Die Zuckerbausteine können in Hexosen und Pentosen unterschieden werden, die jeweils nur in der räumlichen Anordnung der -OH und -CH₂OH Gruppen, nicht aber in ihrer chemischen Zusammensetzung abweichen. Darüber hinaus besitzen Hemicellulosen spezifische Seitengruppen und Verzweigungen. Über die Funktion der Hemicellulosen kann nach heutigem Kenntnisstand sicher gesagt werden, dass sie in der Holzzellwand als Bindeglied zwischen den Cellulosen und dem Lignin fungieren (FENGEL & WEGENER 1984). Die Hemicellulosen sind in allen Wandschichten in unterschiedlicher Konzentration anzutreffen. Nadel- und Laubholz unterscheiden sich nicht nur im Gehalt von Hemicellulosen, sondern auch im Anteil von individuellen Hemicellulose-Bestandteilen. So besitzt Nadelholz mehr Mannose und Galactoseeinheiten als Laubholz. Laubholz hingegen beinhaltet mehr Xylose (in Form von Xylan) und mehr Acetylgruppen.

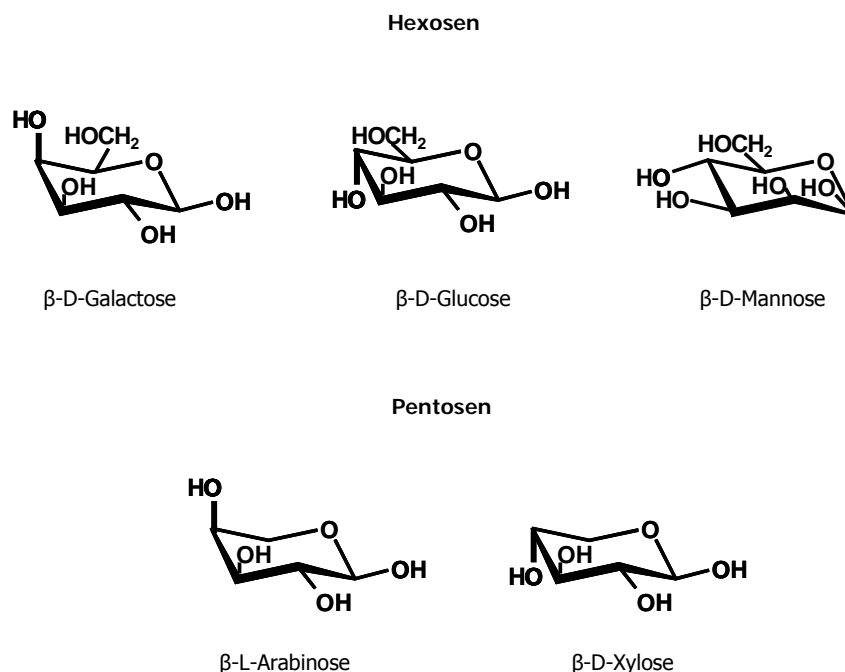


Abb. 5: Hemicellulosenbausteine Hexosen und Pentosen (FENGEL & WEGENER 1984)

3.1.2.2 Lignin

Nach der Cellulose ist das Lignin der zweitwichtigste Bestandteil der pflanzlichen Biomasse und damit auch die zweithäufigste organische Verbindung der Natur (HÜTTERMANN, 1989 a). Es verleiht der Zellwand Druckfestigkeit und ist meist in Wänden von verholzten Pflanzenzellen mit Stütz- und Festigungsfunktion vorhanden. So ist das Lignin der eigentliche Verholzungsstoff. Es ist die Zellwandkomponente, die aus pflanzlichen Geweben Holz entstehen lässt. Lignin ist ein dreidimensional verzweigtes Polymer und besteht in erster Linie aus aromatischen Bausteinen in Form von Phenylpropaneinheiten. Auf natürlichem Wege entsteht Lignin durch die oxidative Polymerisation der Phenylpropaneinheiten, die meistens durch C-C-Bindungen und Etherbindungen miteinander verbunden sind. Bei Nadelhölzern sind es hauptsächlich Coniferylalkoholeinheiten, bei Laubhölzern Coniferyl- und Sinapylalkoholeinheiten mit etwa gleichen Anteilen (siehe Abbildung 6). Sowohl im Nadel- als auch im Laubholz kommen darüber hinaus in geringen Mengen p-Cumarylalkoholeinheiten vor. Das chemische Verhalten des Lignins wird in erster Linie durch verschiedene funktionelle Gruppen bestimmt, wie zum Beispiel den Anteil an phenolischen OH-Gruppen. Durch den dreidimensionalen, netzartigen Aufbau in der Zellwand und das gleichzeitige Umhüllen der Cellulose und der Hemicellulosen entstehen hohe Druckfestigkeiten, wodurch ein Baum stabil und aufrecht stehen kann (FENGEL & WEGENER, 1984).

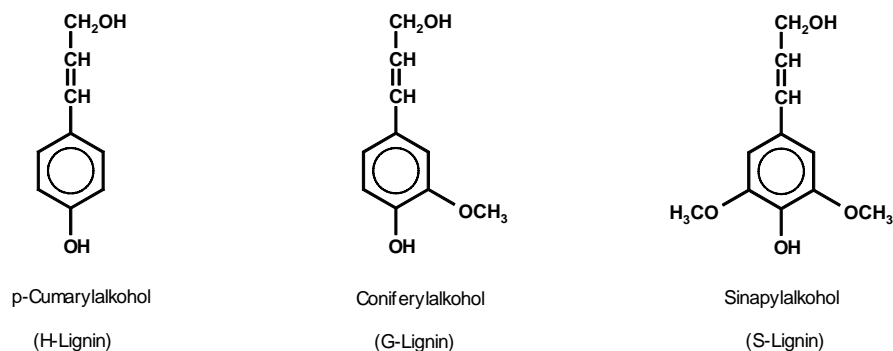


Abb. 6: Ligninbausteine (FENGEL & WEGENER 1984)

Tab. 2: Anteile der drei Ligninbausteine im Nadel- und Laubholzlignin (Holzlexikon, 2003), Guaiacyleinheiten beinhalten Coniferylalcohol, Syringyleinheiten beinhalten Sinapylalcohol

Art des Lignins	p-Cumaryleinheiten [%]	Guaiacyleinheiten [%]	Syringyleinheiten [%]
Nadelholzlignin	14	80	6
Laubholzlignin	4	53	43

Bei der Betrachtung der Tabelle 2 fällt auf, dass bei Nadelhölzern die Guaiacyleinheiten (beinhalten Coniferylalkohol) überwiegen, während Laubholz in etwa je zur Hälfte aus Guaiacyleinheiten und Syringyleinheiten (beinhalten Sinapylalkohol) besteht. Während die p-Cumaryleinheiten beim Nadelholzlignin bei 14 % liegen, spielen sie bei Laubholzlignin mit 4 % eine untergeordnete Rolle.

Die Bildung und Einlagerung des Lignins in das Polysaccharidgerüst (Lignifizierung oder Verholzung) setzt gegen Ende des Zellwachstums ein. Durch die Verholzung wird die Dehnbarkeit der Zellwände stark verringert, deren Zug- und Druckfestigkeit jedoch erhöht. Die Lignifizierung beginnt in den Ecken der Zellwände, sobald das Flächenwachstum der Zelle beendet ist und kurz bevor die Auflagerung der Lamellen der S2-Schicht (zentrale Sekundärwand) beginnt. Die Verholzung geht weiter über die Mittellamelle zur Primärwand. Die Lignineinlagerung in den Sekundärwänden geht im ersten Schritt langsam vor sich, sie wird jedoch schneller, sobald die Bildung der Tertiärwand vollständig abgeschlossen ist (BARISKA et al., 2001).

Für die industrielle Verwendung von Holz wurde lange Zeit der Holzbestandteil Lignin als Abfallstoff betrachtet (LITTLE, 1991). Mittlerweile hat man jedoch erkannt, dass im "Nebenprodukt" Lignin sowohl ein energetisches als auch ein synthetisches Potential liegt. So werden schätzungsweise 20 Milliarden Tonnen Lignin der mit 300 Milliarden Tonnen Lignin enthaltenen Erdbiosphäre neu synthetisiert (GLASSER et al., 1987).

Der momentane und zukünftige Einsatz von Lignin ist ein umfangreiches und zunehmend wichtiges Feld. Dennoch ist Lignin als ein Rohstoff immer noch weit davon entfernt, intensiv genutzt zu werden. Am wirtschaftlichsten ist meist noch immer die Verbrennung, die in Verbindung mit einer Chemikalienrückgewinnung bei der Zellstoffherstellung wesentlicher Bestandteil des Sulfatverfahrens ist, was mit zunehmenden Anteil auch beim Sulfitverfahren angewendet wird (BARISKA et al., 2001).

Verfahren zur anderweitigen Nutzung des Lignins gibt es häufig, doch sind diese meist noch unökonomisch. Bekannte Verfahren sind die Verwertung des Lignins in technischer Form als Klebstoffkomponente bei der Herstellung von Holzwerkstoffen (siehe Kapitel 1.3), die Aufspaltung in niedermolekulare (monomere) Verbindungen, zum Beispiel zur Gewinnung von Vanillin aus Nadelholz-Ligninsulfonaten oder die Herstellung von Dimethylsulfoxid, einem wichtigen Lösungsmittel und der vollständige Abbau des Lignins zu gasförmigen Produkten durch Pyrolyse (BARISKA et al., 2001).

3.1.3 Nebenbestandteile oder Extraktstoffe

Bei den Extraktstoffen handelt es sich um diejenigen Stoffe im Holz, die nicht zu den Strukturelementen der verholzten Zellwände gehören. Extraktstoffe sind ein Gemisch aus einer Vielzahl von niedermolekularen Verbindungen, die aus dem Holz mit Lösungsmittel extrahierbar sind. Typische Extraktstoffe sind zum Beispiel Terpene, Kohlenhydrate, Proteine, Fette, Wachse, Steroide, Chinone und verschiedene aromatische Verbindungen wie Lignane, Stilbene, Flavonoide und Tannine. Extraktstoffe sind holzartenspezifisch für die Farbe, den Geruch, den Geschmack und mit für die Dauerhaftigkeit bzw. die Schädlingsresistenz des Holzes verantwortlich (RUDMAN, 1965; FENGEL, WEGENER 1984). Im Allgemeinen weist Splintholz weniger Extraktstoffe aus als dauerhafteres Kernholz. Die Extraktstoffe werden in primäre und sekundäre Extraktstoffe unterteilt. Die primären Extraktstoffe, zu denen z. B. Eiweiße, Fette und Kohlenhydrate gehören, kommen in jedem Baum vor, da sie zum pflanzlichen Stoffwechsel beitragen. Dagegen ist das Vorkommen sekundärer Extraktstoffe aufgrund ihrer Art und Zusammensetzung auf einige bestimmte Holzarten beschränkt (ROFFAEL und SCHÄFER, 2002).

3.2 Bindungskräfte in Klebungen

Nach KHARAZIPOUR (1996) handelt es sich bei Klebungen um Verbundsysteme, deren Festigkeit, neben der geometrischen Gestaltung der Beanspruchung, von den folgenden Einzelfestigigkeiten bestimmt wird. Diese sind die Festigkeit der Gefügeteile, der Grenzschichten und der Klebschicht. Bei jedem Verbundsystem mit verschiedenen Komponenten, wird bei der Klebung die Gesamtfestigkeit durch die schwächste Komponente vorgegeben. Aus diesem Grund wird bei der Definition der Klebefestigkeit nicht in Einzelfestigigkeiten unterschieden, sondern ausschlaggebend ist die Gesamtfestigkeit, d.h. diejenige Kraft, bei der der Bruch eintritt. Dieser kann in einem der Gefügeteile, z.B. Metall, Kunststoff oder Holz, in einer Grenzschicht oder in einer Klebschicht erfolgen (KHARAZIPOUR, 1996). Gegenüber der Gefügeteilfestigkeit stellen die Festigkeiten in den Grenz- und Klebschichten die schwächsten Komponenten dar. So sollen in der weiteren Ausführung die Bindungskräfte in der Grenzschicht und in der Klebschicht erörtert werden. Bei den Festigkeiten in der Grenzschicht wird von den Haftungs- oder Adhäsionskräften gesprochen, bei den Klebschichten von inneren Festigkeiten oder Kohäsionskräften (KHARAZIPOUR, 1996).

3.2.1 Adhäsion

Unter Adhäsion wird das Aneinanderhaften zwischen einer festen Phase und einer zweiten festen, flüssigen oder gasförmigen Phase verstanden. Sie entsteht durch zwischenmolekulare Wechselwirkungen (Adhäsionskräfte), wie elektrostatische Kräfte, Van-der-Waals-Kräfte oder chemische Bindungen. Sie ist die Ursache für die Adsorption an Grenzflächen und die Absorption in Grenzflächenschichten. Beispiele für die Adhäsion sind das Haften von Wassertropfen an einer Glasoberflächen und das Haften von Klebstoff auf glatter Fläche (SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG, 2008).

Bei der Adhäsion wird in folgende Adhäsionsarten unterschieden:

1. Spezifische Adhäsion

Unter spezifischer Adhäsion werden alle chemischen und physikalischen auf Haupt- und Nebervalenzkräfte beruhenden Adhäsionserscheinungen verstanden. Diese stellen die Hauptursache für Adhäsionskräfte in Metallklebungen dar (HABENICHT, 1986).

2. Mechanische Adhäsion

Bei der mechanischen Adhäsion handelt es sich hauptsächlich um mechanische Verankerungen der verfestigten Klebschicht von ursprünglich flüssigen Klebstoffen in Poren, Kapillaren und Hinterschneidungen der Gefügeoberteile. Zusätzlich können auch auf spezifische Adhäsion beruhende Adhäsionskräfte wirken (HABENICHT, 1986). Diese Adhäsionsart hat besonders bei Holzverklebungen eine Bedeutung (KHARAZIPOUR, 1996).

3. Autoadhäsion

Die Autoadhäsion tritt fast ausschließlich bei der Verklebung kautschukelastischer Polymerschichten innerhalb des gleichen Materials auf. Die Voraussetzung dafür ist eine hohe Beweglichkeit der Makromoleküle, die unter Druckanwendung zu einer gegenseitigen Diffusion mit nachfolgender Verklammerung von Kettensegmenten fähig sind (HABENICHT, 1986). Die Autoadhäsion ist im besonderen Maße für die Herstellung von Faserplatten interessant, da es möglich ist, Holzfasern aufgrund ihrer eigenen Adhäsionskräfte ohne Zugabe von Bindemitteln im Nass- oder Trockenverfahren zu „verkleben“. Ein Grund liegt in der erneuten Überschreitung der Glasübergangstemperatur des Lignins (123 °C) beim Heißverpressen der TMP-Fasern bei Temperaturen zwischen 180 °C und 240 °C (vergleiche

Kapitel 3.5.2 und 3.6.1). Die auf der Holzfaseroberfläche befindliche Ligninkruste kann sich demnach von den cellulotischen Bestandteilen lösen und nach der Verdichtung durch den Pressdruck, sowie dem Erkalten der Platte nach dem Verpressen für eine Verklebung der Holzfasern zueinander hervorrufen. Eine weitere wichtige Bedingung ist neben dem Heißverpressen (Druck) auch die Feuchte der Fasern, die die Faser-zu-Faser Bindung entscheidend beeinflusst. Doch zeichnen sich die auf diesem Weg hergestellten Faserplatten durch niedrige mechanisch-technologische Eigenschaften aus, sodass eine Verwendung von Bindemitteln chemischer oder natürlicher Art erforderlich ist.

3.2.2 Kohäsion

Als Kohäsion bezeichnet man den durch Atomar- bzw. Molekularkräfte bewirkten Zusammenhalt der Moleküle innerhalb ein und desselben Stoffes. Sie ist die Ursache der Oberflächenspannung (SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG, 2008). Dabei ist die Art der Bindungskräfte, die für die Kohäsionsfestigkeit eines Stoffes verantwortlich sind, identisch mit den bei der Adhäsion wirksamen Wechselwirkungen. So sind in Polymerschichten hauptsächlich Haupt- und Nebenvalenzbindungen ausgebildet. Darüber hinaus wird die Kohäsion bei den thermoplastischen Kettenmolekülen durch mechanische Verklammerung bzw. Verknäulung der fadenförmigen, linearen Moleküle erheblich gefördert (KHARAZIPOUR, 1996).

3.3 Enzyme

Nach einer Definition von MEYERS (2007) handelt es sich bei Enzymen, die früher auch Fermente genannt wurden, um in der Zelle gebildete hochmolekulare Proteine, die als Biokatalysatoren den Stoffwechsel der Organismen steuern. Zu den Aufgaben der Enzyme gehört, die Zellversorgung zu gewährleisten, toxische Stoffe zu entfernen oder abzubauen, andere Stoffe (Fett, Glykogen) aus den Depots zu mobilisieren, sowie die Prozesse auszulösen und zu beschleunigen (katalysieren), die zur Gewinnung der für den Organismus nötigen Energie erforderlich sind. So setzen Enzyme als Katalysatoren die Aktivierungsenergie für intra- und extrazelluläre biochemische Reaktionen herab. Sie werden aber durch die Reaktion selbst nicht umgesetzt oder verändert (RÖMPP, 1997).

Enzyme ermöglichen in einem Organismus einen raschen Ablauf biochemischer Reaktionen. Wie im Schlüssel-Schloss-Prinzip besteht eine strenge Spezifität des jeweiligen Enzyms zu seinem Substrat. In ihrem Aufbau unterscheiden sich die Enzyme nicht von anderen Proteinen.

Weiterhin ist anzumerken, dass die Enzyme mit ihrem Substrat an den aktiven Zentren Enzym-Substrat-Komplexe bilden, an welchen auch die Umwandlung oder Spaltung des Substrats erfolgt, worauf das Reaktionsprodukt wieder abgespalten wird und das Enzymmolekül für eine neue Umsetzung frei ist (MEYERS, 2007).

Gemäß der IUPAC/IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry / International Union of Biochemistry) wird zur Beschreibung der enzymatischen Tätigkeit die so genannte Enzymaktivität in Units (U oder IU) angegeben. Sie beschreibt die Enzymmenge, die pro Minute ein mmol Substrat umsetzt. Alternativ beschreibt die Einheit Katal (kat) die Enzymmenge, die ein mol Substrat pro Sekunde umsetzt ($1 \text{ kat} = 6 \cdot 10^7 \text{ U}$; $1 \text{ U} = 16,67 \text{ nkat}$). Die spezifische Aktivität bezieht die Aktivität auf die beteiligte Enzymproteinmenge am gesamten Protein eines Enzympräparates (RÖMPP, 1997).

Die Bezeichnung von Enzymen erfolgt nach den Regeln der IUPAC und der IUB aufgestellten Klassifizierung, der so genannten „Enzyme Nomenclature“ (NC-IUBMB, 1992). Sie ordnet jedem Enzym einen Trivialnamen und einen systematischen Namen zu. Vereinfachend zusammengefasst beinhaltet der systematische Name den Substratnamen (wobei Wasser nicht genannt wird), die jeweils katalysierte Reaktion (die der Enzymklasse bzw. einer Unterklasse entspricht) und endet auf „-ase“. Zum Beispiel lautet der systematische Name der Oxidoreduktase Laccase: Benzendiol:oxygen oxidoreductase (RÖMPP, 1997, HAGER, 2003).

Darüber hinaus teilt die von der IUPAC / IUB aufgestellte Klassifizierung alle Enzyme in sechs Hauptklassen auf: die Oxidoreduktasen, die Transferasen, die Hydrolasen, die Lyasen, die Isomerasen und die Ligasen. Die Laccase ist in die Hauptklasse 1 eingeordnet, in die Klasse der Oxidoreduktasen. Jedes Enzym erhält eine Schlüsselzahl (EC-Nr.), die mit „EC“ beginnt und sich aus vier getrennten Zahlen zusammensetzt. Die erste Zahl bezeichnet die Hauptklasse, die zweite und dritte Zahl die 1. u. 2. Unterklasse und die letzte Zahl eine laufende Nummer. Die EC-Nummer der Laccase lautet demnach EC 1.10.3.2. (RÖMPP, 1997).

Die technische Anwendung von Enzymen hat in den letzten Jahren stark zugenommen, hauptsächlich bedingt durch Methoden der Gentechnik, die eine Synthese zahlreicher Enzyme durch Mikroorganismen ermöglicht. Einsatzbereiche sind u. a. die Arzneimittelherstellung, Lebensmittelverarbeitung, Energiegewinnung, Waschmittelindustrie

sowie in der Zellstoff- und Werkstoffindustrie (HÖGGER et al., 2007; KÜES et al., 2007; OSTERATH et al., 2007).

3.3.1 Phenoloxidase (Laccase E.C 1.10.3.2)

Phenoloxidasen (Laccasen) gehören neben den Ligninperoxydasen (E.C 1.11.1.7) und Manganperoxydasen (E.C. 1.11.1.7) zu den wichtigsten ligninabbauenden und polymerisierenden Enzymen und sind vor allem weit verbreitet in Pilzen (LEONTIEVSKY et al., 1997). Zur Geschichte der Laccasen ist anzumerken, dass sie zu den wenigen Enzymen zählen, die schon sehr lange, seit Ende des 19. Jahrhunderts, Gegenstand der Forschung sind. YOSHIDA (1883) entdeckte das Enzym im Japanischen Lackbaum (*Rhus vernicifera*), dessen Saft als Ausgangsmaterial für chinesische Lackarbeiten dient. YOSHIDA (1883) stellte fest, dass der weiße Saft des Baumes (Latex) an der Luft sehr schnell aushärtet und postulierte die Anwesenheit der so genannten Diastase im Latex (POTTHAST, 1998). Kurz darauf reinigte und analysierte BERTRAND (1894) das Enzym und nannte es Laccase. BERTRAND fand in der Proteinlösung Mangan, worauf er Laccase für ein manganhaltiges Enzym hielt. Im Jahre 1896 wiesen BERTRAND und LABORDE Laccase auch in Pilzen nach. Etwa 50 Jahre später stellten KEILIN und MANN (1939) sowie TISSIERES (1948) fest, dass BERTRAND sich geirrt hatte. Jene fanden in der Laccase Kupfer als Enzymbestandteil, aber kein Mangan (POTTHAST, 1998).

Das Laccasemolekül besitzt ein komplex aufgebautes aktives Zentrum, das aus drei verschiedenen Proteinstrukturen besteht, die insgesamt vier Kupferatome enthalten (RÜHL et al., 2007 a). Während die Proteintypen I und II je ein Kupferatom besitzen, enthält Typ III zwei Kupferatome. Die Typen I und II mit je einem zentralen Kupferatom unterscheiden sich in ihren zugehörigen Liganden (REINHAMMAR & MALMSTRÖM, 1984), wobei das Kupferatom des Typs I eine zentrale Rolle spielt. Erhält es von einem Elektronendonator ein Elektron, wird es reduziert, so ist das Kupferatom vom Typ I der primäre Elektronenakzeptor (KHARAZIPOUR, 1996). Der Initialschritt der Katalyse durch die Laccase ist ein Ein-Elektronentransfer vom Kupferatom des Typs I zu den Kupferatomen des Typs III, wobei freie Radikale von organischen Substraten gebildet werden, welches aus Abbildung 7 ersichtlich ist.

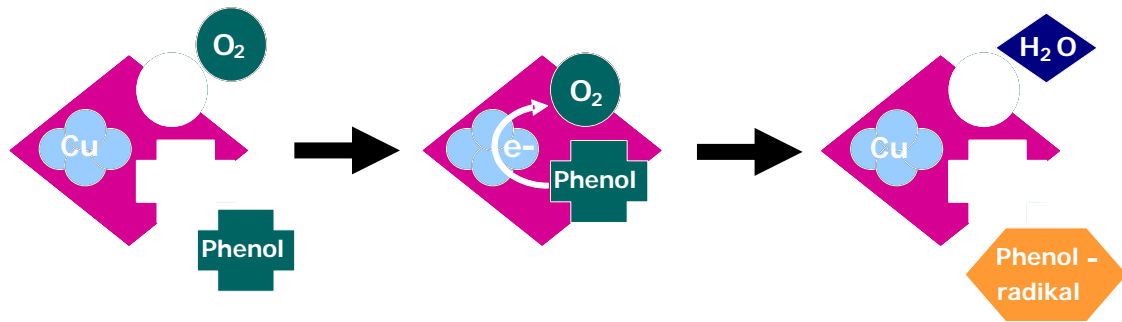


Abb. 7: Ein-Elektroneneliminierung durch das Enzym Laccase (RÜHL et al., 2007 b)

Bei der Anwesenheit von Substrat (Phenol) und Sauerstoff findet die Ein-Elektroneneliminierung durch das Enzym statt. Das Enzym wird negativ negativ geladen, während das Substrat unter H-Abstraktion in ein Radikal-Kation überführt wird, welches dann aufgrund seiner hohen Reaktivität als Phenolradikal meist unspezifisch nicht-enzymatisch weiter reagiert. Zum Beispiel bilden die durch diesen Vorgang entstandenen Phenolradikale niedermolekulare Abbauprodukte oder reagieren zu höhermolekularen Polymeren (GEIGER et al., 1986; KAWAI et al., 1987; HIGUCHI 1990). In einer anschließenden Reaktion wird die Laccase wieder rückoxidiert. Dabei wird das Elektron auf Sauerstoff übertragen, welcher dann zu Wasser reduziert wird (LEONOWICZ et al., 2001).

Es kommen verschiedene organische Substrate für Laccase in Frage. Dazu zählen Diphenole, Aminophenole, Polyphenole, methoxy-substituierte Phenole, Polyamine, Aryldiamine, phenolische Lignineinheiten und einige anorganische Ionen (THURSTON, 1994; YAROLOV et al., 1994). Nichtphenolische (veretherte) Lignineinheiten können von Laccase alleine nicht angegriffen werden.

Neben dem Vorkommen in Pilzen, sind Laccasen auch in Pflanzen, Insekten und Bakterien bekannt (MAYER & STAPLES 2002, CLAUS 2003, 2004, BALDRIAN 2006, HOEGGER et al. 2006), in welchen sie unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. In höheren Tieren kommt sie dagegen nicht vor. Die bakterielle Laccase von *Cryptococcus neoformans* unterstützt beispielsweise die Oxidation von Dihydroxyphenylalanin zu melaninähnlichen Pigmenten (SALAS et al., 1996). Laccasen von Insekten sind an der Chitinbiosynthese (ANDERSEN, 1985), pflanzliche Laccasen an der Ligninbiosynthese (O'MALLEY et al., 1993) beteiligt.

Pilzliche Laccasen finden sich in Asco- (LITVINTSEVA & HENSON, 2002; KURTZ & CHAMPE, 1982), Deutero- (ZOUARI et al., 1987) und vor allem Basidiomyceten (KHARAZIPOUR, 1996). Sie dienen zur Pigmentbildung durch Polymerisierung von Melaninvorstufen zu hochmolekularem

Melanin (LITVINTSEVA & HENSON, 2002; KURTZ & CHAMPE, 1982), zur Aushärtung des Zellverbandes von Fruchtkörpern (LEATHAM & STAHMANN, 1981), zur Bildung von Abwehrstoffen gegen Bakterien (EGGERT, 1997), zum Abbau von Huminsäuren (CHEFETZ et al., 1998; SCHEEL et al., 1999) oder zum Ligninabbau (Ander & ERIKSSON, 1976; KIRK & FARREL, 1987; KHARAZIPOUR, 1996).

Holzabbauende Weißfäulepilze (Basidiomyceten) beteiligen sich auch in Kombination mit anderen Enzymen am Ligninabbau von Holz (ANDER & ERIKSSON, 1976; KIRK & FARRELL, 1987; LEONOWICZ et al., 1999). Untersuchungen mit aus Weißfäulepilzen isolierten Laccasen zeigen, dass das Enzym phenolische Substrate in verschiedener Richtung verändert. Polymerisation und Depolymerisation werden beobachtet, wobei die Polymerisationsreaktion überwiegt (HÜTTERMANN et al., 1980; GEIGER et al., 1986; THURSTON, 1994).

Technische und wirtschaftliche Bedeutung haben Laccasen hauptsächlich auf verschiedenen Anwendungsgebieten erlangt. Darunter sind zu nennen, die Anwendung von Laccase zur Beseitigung bzw. Aufbereitung von Industrieabfällen (HÜTTERMANN et al., 1988; 1992, DURAN und ESPOSITO, 2000), das umweltschonende Biobleaching in der Papierherstellung (CALL & MÜCKE, 1997) und der Textilindustrie (GALANTE & FORMANTICI, 2003), die Biotransformation im Rahmen der Herstellung von pharmazeutischen Wirkstoffen (PARLAR, 2003) und die Herstellung von Holzwerkstoffen (KHARAZIPOUR & HÜTTERMANN, 1993, 1997 und 1998; FELBY et al. 1997, 2002).

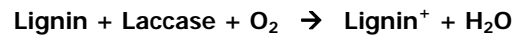
3.3.2 Polymerisation technischer Lignine durch Phenoloxydase (Laccase)

Nach der Definition nach MEYERS (2007) handelt es sich bei der Polymerisation um die Reaktion, bei der Monomere, meist ungesättigte organische Verbindungen, unter Einfluss von Katalysatoren und unter Auflösung der Mehrfachbindung zu Polymeren (Moleküle mit langen Ketten, bestehend aus miteinander verbundenen Monomeren) reagieren.

Das Zunutzemachen der Polymerisation technischer Lignine für Verklebungsprozesse geht u. a. auf das Jahr 1977 zurück, in welchem HÜTTERMANN et al. beim Wachstum des Rotfäulepilzes *Heterobasidium annosus* auf Ligninsulfonate enthaltenden Kulturmedien beobachteten, dass der Pilz das heterogene Lignin in ein homogenes Produkt polymerisiert hat. Da die Polymerisation eine Basis von Verklebungsprozessen darstellt, nutzten HÜTTERMANN und HAARS (1981) diese Reaktion erstmals zur Verklebung von Holzteilen. Nach

einiger Zeit kann auf die Polymerisation eine Depolymerisationsreaktion folgen (HAARS und HÜTTERMANN, 1980). Bei der Depolymerisation handelt es sich um Abbaureaktion von Makromolekülen, bei der ein Monomer nach dem anderen vom Kettenende her abgespalten wird (MEYERS, 2007). Demnach würde in diesem Schritt der Ligninabbau eintreten.

Eine Darstellung der Polymerisationsreaktion bietet die folgende Reaktionsgleichung in Anlehnung an HAARS et al. (1987):



Der grundlegende Mechanismus dieser Reaktion ist die Bildung von Phenoxyradikalen durch den Elektronen-Transfer des Lignins, die anschließend weiterreagieren, um das polymerisierte Lignin zu bilden.

Darüber hinaus katalysiert die Laccase eine weitere Reaktion im Ligninmolekül, die Hydroxylierung phenolischer Substrate. Hierbei werden phenolische Hydroxylgruppen frei, welche als reaktive Seitengruppen dienen.

In dieser Dissertation wird die Polymerisation von Ligninen als prinzipieller Bestandteil für die Aktivierung des holfasereigenen Lignins gesehen, welches mittels Laccase und Mediator aktiviert und radikalisiert werden soll, um bei der Herstellung von Faserplatten die im Holz ursprünglich vorhandenen Bindungskräfte wieder wirksam zu machen.

3.4 Mediatoren und das Laccase-Mediator-System (LMS)

Der Begriff Mediator (lat.: mediare = vermitteln) steht in der Biologie und der Medizin als zusammenfassende Bezeichnung für chemische Substanzen, die in geringen Mengen als hochspezifisch wirkende Cytokine, Transmitter oder Signalstoffe auftreten (RÖMPP, 1997). Aus chemischer Sicht versteht man unter Mediatoren meist Redoxmediatoren, wobei es sich um Verbindungen mit elektronenübertragenden Eigenschaften handelt (POTTHAST, 1998). Dabei ist die Wirkung des Mediators häufig nicht von der eines Katalysators zu unterscheiden.

Im Zusammenhang mit dem Laccase-Mediator-System (LMS) versteht man unter Mediatoren niedermolekulare Substanzen, die als Katalysator wirken. Sie ermöglichen also unter gegebenen Bedingungen Reaktionen, die ansonsten nicht ablaufen würden (POTTHAST, 1998). Das Laccase-Mediator-System wurde erstmals durch BOURBONNAIS und PAICE (1990) beschrieben. Sie zeigten als Erste, dass nach der Zugabe von niedermolekularen Redox-

Verbindungen, also Mediatoren, Laccase in der Lage ist, auch nicht phenolische Verbindungen anzugreifen und Reaktionen zu beschleunigen und zu intensivieren. Dies erfolgt einerseits dadurch, dass das relativ kleine Mediatormolekül Reaktionsorte erreichen kann, die dem größeren Laccasemolekül nicht zugänglich sind und andererseits dadurch, dass durch die chemischen Eigenschaften der Mediatoren neue Reaktionsmechanismen bei der enzymatischen Substratumsetzung genutzt werden können (HAGER, 2003). So stellt das Laccase-Mediator-System eine Verbesserung der nachteiligen Eigenschaft des geringen Redox-Potentials dar (vgl. Kapitel 1.4). Denn wegen ihres geringen Redox-Potentials benötigen Laccasen in der Regel eine freie Phenolgruppe zur Oxidation, was ihren Einsatz besonders in der Ligninbiotechnologie hemmen kann, da im natürlichen Lignin aufgrund der bei der Synthese des Makromoleküls ablaufenden Radikalreaktionen die meisten Phenolgruppen substituiert vorliegen (LEONOWICZ et al, 2001; ROCHEFORT et al., 2004).

Um weiter auf die Entwicklung des Laccase-Mediator-Systems einzugehen, konnten zunächst BOURBONNAIS und PAICE (1990) mit Hilfe von Laccase und ABTS die Oxidation nicht-phenolischer Ligninmodellbausteine nachweisen. Weiterführende Arbeiten (BOURBONNAIS und PAICE, 1992 und BOURBONNAIS et al., 1995; CALL und MÜCKE, 1994) zeigten, dass mit Hilfe der Kombination von Laccase, Sauerstoff und Mediator im so genannten „Laccase-Mediator-System“ Sulfatzellstoff effektiv delignifiziert werden kann, was bisher mit isolierter Laccase alleine nicht möglich war.

AMANN (1997) formuliert ein Eigenschaftsprofil, das Mediatoren aus anwendungsbezogenen Gesichtspunkten erfüllen sollen. Dies sind die Wasserlöslichkeit, das niedrige Molgewicht, die Akzeptanz des Mediators als Substrat für die Laccase, der Besitz eines ausreichend hohen Redoxpotenzials für den Substratabbau (im Falle von Ligninabbau, darf es z. B. nicht zusätzlich zum Abbau von Cellulose kommen), das Aufweisen eines reversiblen Redoxverhaltens, keine inhibierende Wirkung auf Laccase, eine gute biologische Abbaubarkeit und Umweltverträglichkeit, ein niedriger Preis und die Marktverfügbarkeit.

Der in der Literatur für das Laccase-Mediator-System allgemein akzeptierte Reaktionsmechanismus kann wie in Abbildung 8 in vereinfachter und idealisierter Form als Gleichgewichtskaskade dargestellt werden (PAICE et al., 1999).

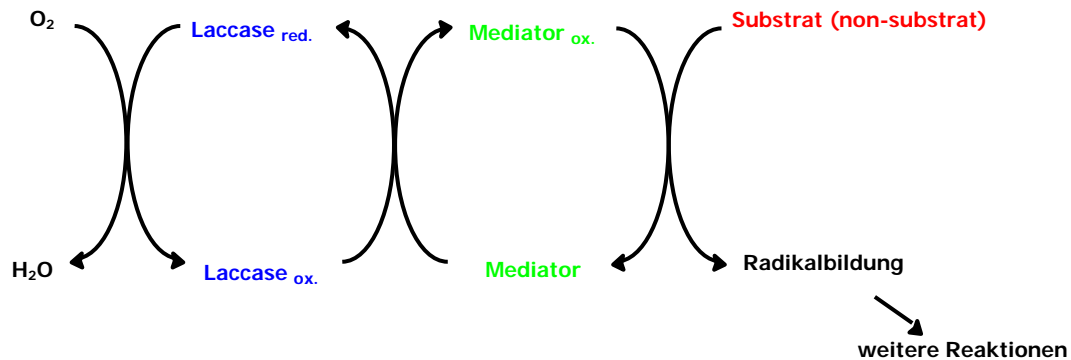


Abb. 8: Gleichgewichtskaskade der Delignifizierung im Laccase-Mediator-System nach PAICE et al. (1999)

Wie in der Abbildung (8) zu erkennen, wird Sauerstoff im aktiven Zentrum der Laccase in einer Vier-Elektronen-Reduktion zu Wasser reduziert. Die dazu notwendigen Elektronen stammen von Mediatormolekülen, die gleichzeitig vom Enzym durch Ein-Elektronen-Abstraktion oxidiert werden. Bei der Anwendung zur Delignifizierung muss der oxidierte Mediator solange stabil bleiben, dass er das Lignin aktivieren und oxidieren, d. h. depolymerisieren kann. Aus dem Substrat Lignin bilden sich Radikale, die weiter reagieren können.

Doch scheinen in diesem Modell nur die Komponenten Sauerstoff und Substrat verbraucht zu werden, wogegen die Laccase und der Mediator unverändert im Zyklus bleiben. Auch scheint nur ein bestimmter Reaktionsmechanismus zwischen Laccase, Mediator und Substrat abzulaufen. Dagegen ist anzumerken, dass zur Reaktionskinetik des Laccase-Mediator-Systems verschiedene Reaktionsmechanismen ablaufen, die vom oben dargestellten Modell abweichen können und vom gewählten Mediator sowie vom verwendeten Substrat abhängig sind (Hager, 2003). Häufig wird dabei ein Aktivitätsverlust der Laccase und ein Verbrauch des Mediators verursacht.

Zur Verwendung eines Mediators im Laccase-Mediator-System muss weiterhin beachtet werden, dass für eine Implementierung möglicher biotechnologischer Verfahren, an denen dieses System beteiligt ist, nicht nur die Ausbeuten bei den gewünschten Reaktionen wichtig sind, sondern auch die Zerfallsprodukte von Mediatoren berücksichtigt werden müssen. So entstehen zum Beispiel bei dem Mediator Hydroxybenzotriazol (HBT), der im industriellen Einsatz bei dem *Lignozym*-Prozess zur Bleiche vorgesehen ist (CALL & MÜCKE, 1997), erhebliche Abwasserprobleme, da HBT aus stickstoffhaltigen Verbindungen besteht, die kostenaufwändig entsorgt werden müssen. Aus diesem Grund wird nach alternativen

Mediatoren gesucht, die weniger Probleme bereiten (JOHANNES & MAJCHERCZYK, 1999; BALKASIN et al., 2001; POTTHAST et al., 2001; SOARES et al., 2001; FABBRINI et al., 2002; KANG et al., 2002; D'ACUNCZO & GALLI, 2003; D'ACUNCZO et al., 2003; CASTRO et al., 2003; BARRECA et al., 2004; ROCHEFORT et al., 2004). Bereits 1996 stellten GOODELL et al. bei der Untersuchung des ligniolytischen Systems des Pilzes *Geophyllum trabeum* fest, dass dieser ein weites Spektrum an phenolischen Verbindungen synthetisiert, die bei der ligniolytischen Aktivität als Mediatoren dienen. Solche Phenolderivate haben zum Vorteil, dass ihre Abbauprodukte keine oder nur eine sehr geringe Toxizität aufweisen. Beispiele für solche Mediatoren sind u. a. Phenolcarbonsäuren, wie z. B. die 4-Hydroxy-Benzoesäure (HBA), die auch im weiteren Verlauf dieser Dissertation Anwendung findet. Sämtliche in dieser Dissertation verwendete Mediatoren sind in Kapitel 4.1.3 aufgeführt.

3.5 Faserstoff

Als Faserstoff bezeichnet man das Material, welches man aus Holz oder anderen lignocellulosehaltigen Einjahres- oder Mehrjahrespflanzen durch mechanische oder chemisch-mechanische Verfahren gewinnt, um Faserplatten, Holzstoff, Holzschliff, sowie Papier und Pappe herzustellen. Die zwei bedeutendsten Verfahren sind das Dampfexplosionsverfahren nach MASON und das ASPLUND- oder Defibrator-Verfahren.

3.5.1. Masonite- oder Dampfexplosionsverfahren

Das Masonite- oder Dampfexplosionsverfahren zur Zerfaserung von Holzhackschnitzeln wurde durch MASON erstmals im Jahre 1926 erfolgreich angewandt. Durch dieses Verfahren werden die lignocellulosischen Bindungen des Holzes nahezu komplett aufgelöst und die entstehenden Fasern mit Hilfe des hohen Druckes teilweise hydrolysiert. In einem ersten Schritt werden die Hackschnitzel in Silos durch Wasserbenetzung auf einen Feuchtegehalt von 50 % bis 60 % gebracht (BERGMANN, 1998). Von dort aus werden die Hackschnitzel in eine MASON-Kanone überführt, bei welcher es sich um einen Hochdruck- oder Explosionszylinder handelt. Nach dem Befüllen des Zylinders wird dieser luftdicht verschlossen und unter einen Druck von 70 bar bis 80 bar gesetzt. Die Temperatur wird dabei auf etwa 284 °C bis 294 °C erhöht. Über ein Ventil wird kurze Zeit später der Druck schlagartig herabgesetzt (SCHÖPPER, 2006). Durch diesen explosionsartigen Vorgang und

dem Aufschlagen der Hackschnitzel auf ein Siebssystem am Boden der MASON-Kanone platzen die Hackschnitzel auseinander. Die Holzstruktur wird dabei komplett zerstört, zurück bleibt ein brauner, moosartiger Faserstoff. Der Faserstoff wird anschließend gewaschen, gereinigt und eventuell im Refiner nachgemahlen (MÜLLER, 2005). Als Vorteil des Masonite-Verfahrens wird das Beibehalten der Faserlänge nach dem Aufschluss gesehen. Doch ist es bei diesem Verfahren von Nachteil, dass die Ausbeute an Faserstoff lediglich bei 85 % liegt, da während des Aufschlusses Reaktionsprodukte (Essigsäure, Ameisensäure, und Kohlendioxid) entstehen und der im wasserlösliche Teil der Hemicellulosen beim Waschen verloren gehen. Das Masonite- oder Dampfaufschlussverfahren findet hauptsächlich in den USA und Australien Anwendung, doch auch teilweise in Europa (MÜLLER, 2005).

3.5.2 ASPLUND- oder Defibratorverfahren

Unmittelbar nach der Entwicklung des Dampfexplosionsverfahrens nach MASON wurde im Jahre 1931 durch den Schweden ASPLUND ein thermo-mechanischer Zerfaserungsprozess erfunden. Bei diesem Verfahren werden Holz hackschnitzel im 170 °C bis 180 °C heißen Wasser bei einem gegenüber dem Masonite-Verfahren wesentlich geringeren Druck mit 8 bar bis 12 bar aufgeschlossen. Die dadurch erreichte Plastifizierung gilt als notwendige Vorstufe für die Zerfaserung des Holzes auf mechanischem Weg in einem Defibrator (LAMPERT, 1967). Der Defibrator besteht aus einem System aus zwei sich gegeneinander drehenden Mahlscheiben, wo das plastifizierte Material mechanisch zerfasert wird. Im Defibrator herrscht ein konstanter Druck von 11 bar (SCHÖPPER, 2006). Das aus diesem Verfahren entstehende Fasermaterial trägt auch den Namen TMP-Fasern (TMP = thermo-mechanical pulp). Die Farbe des Materials ist relativ hell.

Neben dem geringeren Druck und der geringeren Temperatur beim Aufschluss des Holzes hat das ASPLUND-Verfahren gegenüber dem Masonite-Verfahren einen weiteren Vorteil, nämlich die höhere Ausbeute an Faserstoff, die bei 95 % liegt. Bei den milderen Aufschlussbedingungen unterliegt das Holz weniger chemischen Veränderungen.

Die wesentliche chemische Änderung ist, dass sich das in den Holzfasern befindliche Lignin nach der thermo-mechanischen Behandlung als Ligninkruste auf der Holzfaseroberfläche befindet. Durch das Überschreiten der Glasübergangstemperatur des Lignins (123 °C) bei Aufschlusstemperaturen zwischen 170 °C und 180 °C löst sich das Lignin hauptsächlich aus den Mittellamellen und erkaltet auf der Holzfaseroberfläche.

Als ökonomischer Vorteil ist der geringere Energiebedarf beim ASPLUND-Verfahren zu nennen.

Wird das Holz vor dem Aufschluss mit alkalischen Sulfiten vorbehandelt, verringert sich der Energiebedarf nochmals um teilweise fast die Hälfte (BLECHSCHMIDT et al., 1988; POLLER und KLETZIN, 1990; ROFFAEL et al., 2001). Die in dieser Form vorbehandelten Fasern tragen die Bezeichnung CTMP-Fasern (chemo-thermo-mechanisches Verfahren) und werden ebenfalls für die Faserplattenherstellung eingesetzt.

Anwendung findet das ASPLUND-Verfahren überwiegend in Europa und ist seit dessen Erfindung kontinuierlich verbessert worden.

3.6 Herstellung von Mitteldichten Faserplatten

Bei Mitteldichten Faserplatten (MDF) handelt es sich laut der Definition nach DEPPE und ERNST (1996) um folgenden Werkstoff: „ Ein trocken geformter Holzwerkstoff, hergestellt aus Lignocellulose-Fasermaterial, kombiniert mit synthetischem Klebstoff oder anderen geeigneten Bindemitteln. Die Platten werden in einem Dichtebereich von 550 kg/m^3 bis 800 kg/m^3 durch Heißpressung erzeugt, wobei die Faserbindung durch die zugesetzten Bindemittel erfolgt. Weitere Zuschlagstoffe zur Eigenschaftverbesserung können verwendet werden.“ Die Herstellung von MDF-Platten erfolgt hauptsächlich mit TMP- und CTMP-Fasern (siehe Kapitel 3.5.2). Die Stärken handelsüblicher MDF-Platten reichen in der Regel von 2 mm bis 45 mm (TU FREIBERG, 2006). In der nächsten Abbildung (9) ist der schematische Ablauf der industriellen MDF-Fertigung skizziert. In der Regel sind alle Herstellungsschritte in einem heutigen MDF-Werk vereint und gehen nahtlos ineinander über.

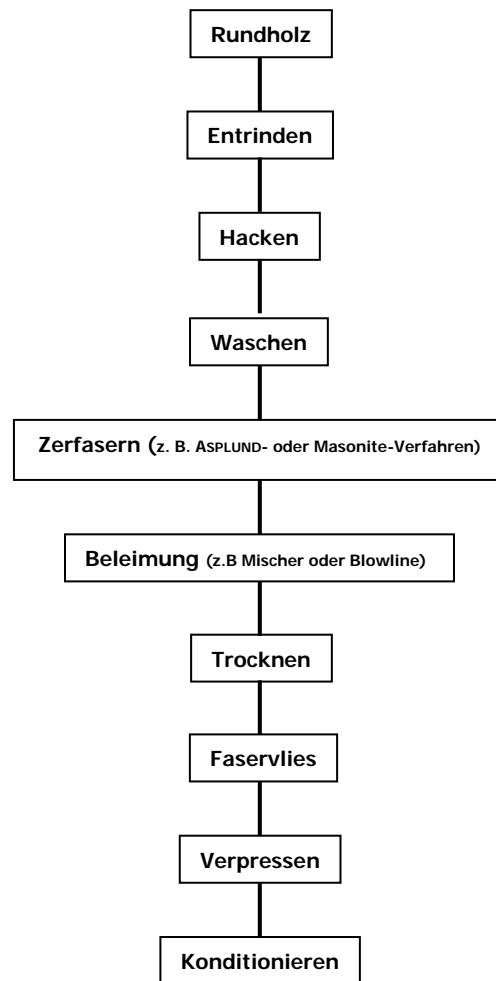


Abb. 9: Herstellungsablauf in der industriellen MDF-Fertigung in Anlehnung an MÜLLER (2005)

Das meist angewandte Verfahren zur Herstellung von industriellen MDF-Platten ist das Trockenverfahren. Auch die Herstellung von MDF-Platten im Nassverfahren ist möglich (TU FREIBERG, 2006). Beide Verfahren verlaufen nach gleichem Schema, wie es in Abbildung gezeigt ist. Der Unterschied zwischen beiden liegt in der Beleimung der Fasern, deren Eingangsfeuchte und der späteren Weiterverarbeitung bei der Vliesbildung, Trocknung und dem Verpressen.

3.6.1 Trockenverfahren

Bei dem Trockenverfahren werden die aufgeschlossenen Holzfasern direkt beleimt. Dies geschieht bei der MDF-Plattenproduktion entweder mittels Blowline-Beleimung, oder der Beleimung im Blenderverfahren, wo die Beleimung in einem Mischer stattfindet. Bei der Blowline-Beleimung werden die Fasern in einer Blasleitung zwischen Refiner und Trockner

beleimt. Durch die unmittelbare Trocknung erhalten die beleimten Fasern Feuchten zwischen 5 % bis 10 %, mit welcher sie bei 180 °C bis 240 °C verpresst werden (MÜLLER, 2005, SCHÖPPER, 2006). Die Blowline-Beleimung ist gegenwärtig die am häufigsten angewandte Beleimungsmethode. Gegenüber der Mischerbeleimung im Blenderverfahren hat die Blowline-Beleimung jedoch den Nachteil, dass etwa 20 % mehr Leim eingesetzt werden müssen. Bei der Beleimung im Blenderverfahren werden die Holzfasern durch ein Mischersystem geleitet, in dem die Fasern mit Leim in der Regel mit Unterstützung von Druckluft besprüht und durch die Rotationsbewegungen der Mischerachsen oder Mischerwalzen verwirbelt werden. Anschließend werden die Fasern getrocknet, zu Faservlies gestreut und zu MDF-Platten verpresst. Als geläufige Mischersysteme werden Stachelwalzenmischer oder Ein-Achs- bzw. Mehr-Achsmischer mit um die Achsen angeordnete Mischwerkzeuge verwendet. Abbildung 10 zeigt einen Ein-Achs-Mischer der Firma *BINOS*, Springe.

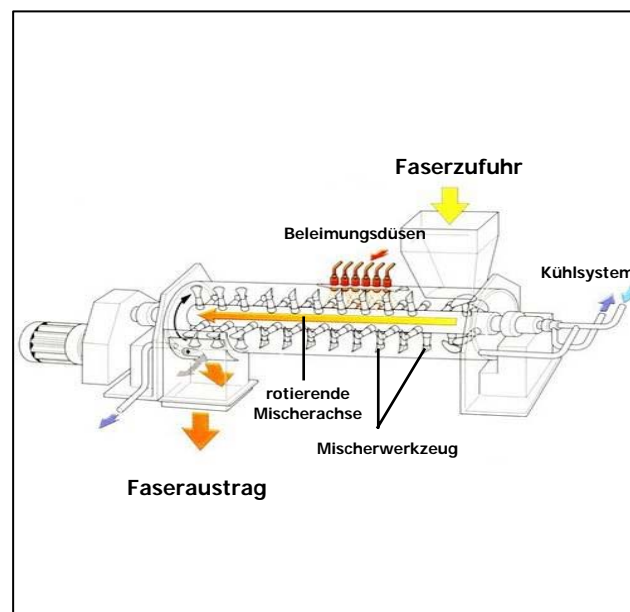


Abb. 10: Darstellung eines Ein-Achs-Mischers der Fa. *BINOS*, Springe.

3.6.2 Nassverfahren

Das Nassverfahren findet hauptsächlich Anwendung bei der Produktion von Harten Faserplatten (HDF-Platten) oder Faserdämmstoffplatten. Bei der industriellen MDF-Plattenproduktion ist die Anwendung dieses Verfahrens möglich, aber in der Regel unüblich (TU FREIBERG, 2006).

Im Nassverfahren werden die Holzfasern im Wasser bis zu einer Stoffkonzentration von 0,8 % bis 2,5 % aufgeschwemmt, sodass die Fasern relativ hohe Feuchtegehalte von 150 % bis 300 % haben. In diese Fasersuspension werden Bindemittel, Fällmittel oder je nach der jeweiligen Technologie Zusatzstoffe hinzugegeben. Nach der Beleimung wird die Fasersuspension kontrolliert entwässert, bei der Herstellung von Dämmstoffplatten erfolgt eine Vorverdichtung des Faservlieses durch Pressdruck (keine Heißverpressung) und eine anschließende Trocknung. HDF-Platten werden in der Regel bei 180 °C bis 225 °C verpresst, wobei eine Seite der Platten einen Siebabdruck aufweist, da das Sieb einen besseren Dampfzug bei der Heißpressung gewährleistet (BERGMANN, 1998). Gegenwärtig geht die Produktion von Harten Faserplatten nach diesem Verfahren zurück. Im Gegenzug konzentriert sich die Herstellung mehr auf Faserdämmstoffplatten mit geringerer Dichte, die zum Beispiel für die Dämmung im Dach- oder Fußbodenbereich Anwendung finden (MÜLLER, 2005).

3.7 Herstellung von Dämmstoffplatten

Die Herstellung von Dämmstoffplatten erfolgt typischerweise nach dem Nassverfahren in Kapitel 3.6.1. Holzfaserdämmstoffe unterliegen der Norm EN 13171 (2001): "Wärmedämmstoffe für Gebäude - werksmäßig hergestellte Produkte aus Holzfasern (WF)." Holzfaserdämmplatten werden etwa seit Anfang der 1990er Jahre großmaschinell gefertigt. Sie zeichnen sich durch eine relativ niedrige Dichte von 150 kg/m³ - 190 kg/m³ aus. Bei der industriellen Herstellung der Holzfaserdämmplatten wird das Faservlies entwässert, kalt gepresst und dann in Konvektionsöfen bei 170°C getrocknet. Für die Trocknung der Dämmplatten benötigt man jedoch eine relativ lange Zeit. So beträgt die Trocknungsdauer pro Zentimeter Dicke etwa eine Stunde.

Die Dämmplatten besitzen gute Wärmedämm- und Schalldämmeigenschaften und sind vielseitig einsetzbar. So eignen sich Holzfaserdämmplatten durch ihre hohe Wärmespeicherfähigkeit besonders für Leichtbaukonstruktionen und den Wärmeschutz. Die Vorteile dieser Dämmplatten sind, dass es sich um ein Produkt aus nachwachsenden Rohstoffen handelt, dass sie wieder verwendbar und, sofern sie nicht imprägniert sind, kompostierbar sind.

3.8 Inkubationsverfahren bei der Herstellung enzymgebundener Faserplatten

Die allgemeinen Vorgehensweisen bei der Herstellung enzymgebundener MDF- oder Dämmstoffplatten in dieser Dissertation sind in der folgenden Abbildung (11) skizziert.

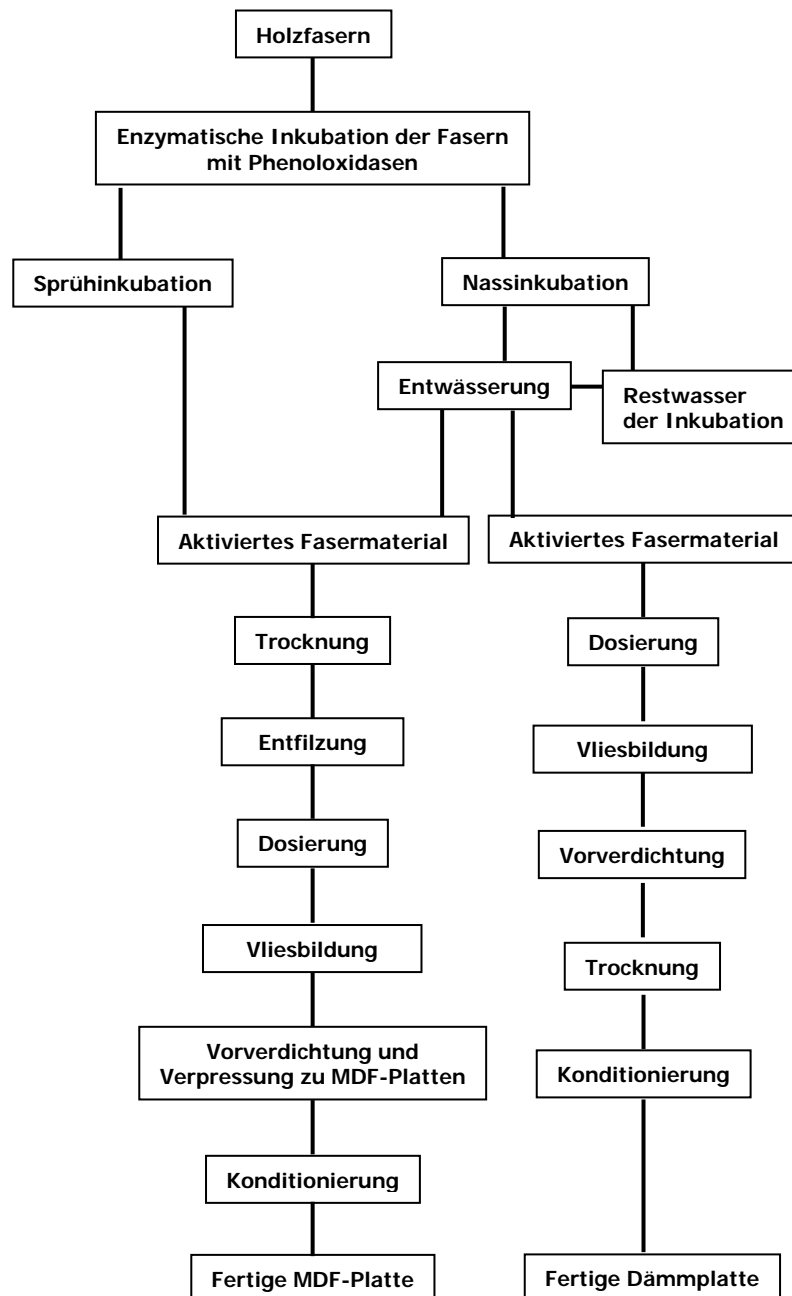


Abb. 11: Schematische Darstellung der Herstellung von enzymgebundenen MDF-Platten im Sprüh- und Nassverfahren und enzymgebundenen Dämmstoffplatten im Nassverfahren (in Anlehnung an KHARAZIPOUR, 1996 und 2002; BERGMANN, 1998)

Bei den Verfahren handelt es sich um die Sprühinkubation und Nassinkubation, die auch als Tauchinkubation bezeichnet werden kann. Dabei können die enzymgebundenen MDF-Platten sowohl nach dem Sprüh- als auch dem Nassverfahren hergestellt werden, letzteres ist jedoch eher für Harte Faserplatten geeigneter. Die Dämmstoffplatten werden nur nach dem Nassverfahren hergestellt. Das hier gezeigte Schema gleicht dem Herstellungsablauf zur industriellen MDF-Plattenproduktion in Abbildung 9 (Kapitel 3.6) in allen Schritten, bis auf die besondere Behandlung der Holzfasern mit Enzymen (und Mediatoren) im „Beleimungsschritt“. Verwendet werden Holzfasern, die nach thermo-mechanischem Prozess aufgeschlossen wurden (siehe Kapitel 3.5.2).

3.8.1 Sprühinkubation

Das Verfahren mittels Sprühinkubation kann prinzipiell mit dem Trockenverfahren (Kapitel 3.6.1) bei der herkömmlichen MDF-Plattenproduktion gleichgesetzt werden.

Wie die Bezeichnung Sprühinkubation besagt, werden die Holzfasern mit einer Enzymlösung besprüht (KHARAZIPOUR, 2002). Dieser Schritt kann mittels Blowline-Beleimung (Kapitel 3.6.2) oder im Blenderverfahren in einem Mischer erfolgen. Dabei werden die Fasern anstelle von herkömmlichen Bindemitteln mit einer Enzymlösung besprüht. Nach einer Inkubationszeit kann das durch das Enzym aktivierte Fasermaterial konventionell getrocknet und bis hin zur fertigen MDF-Platte weiterverarbeitet werden (KHARAZIPOUR, 2002). Anders als bei der herkömmlichen MDF-Plattenherstellung, bei der das Faservlies vor dem Verpressen eine Feuchte von 5 % bis 10 % aufweist (MÜLLER, 2005, SCHÖPPER, 2006), sind bei Laccase bzw. Laccase-Mediator inkubierten Holzfasern Faservliesfeuchten von 10 % bis 14 % notwendig, um eine ausreichende Verklebung der aktivierten Fasern zu erhalten (FELBY et al., 2002).

3.8.2 Nassinkubation

Wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, eignet sich die Beleimung von Holzfasern im Nassverfahren für die Herstellung von Holzfaserdämmstoffen und Harten Faserplatten (HDF). Dort werden die Holzfasern in einer Suspension mit 0,8 % bis 3 % Feststoffanteil aufgeschwemmt. Bei der Herstellung von enzymgebundenen Dämmstoffen oder HDF-Platten spricht man von einer „Nassinkubation“. Bei diesem wird anstelle des Wassers eine Pufferlösung und anstelle der herkömmlichen Bindemittel das Enzym in die Lösung gegeben. Für diese Methode eignet

sich ein Inkubationsbehältnis, welches mit einer Heizeinheit und einem Rührwerk ausgestattet ist, um darin das Faser-Enzym-Puffergemisch für eine bestimmte Zeit lang zu inkubieren. Dabei sollte es temperiert werden und zur Gewährleistung einer ausreichenden Luftsauerstoffzufuhr gerührt werden. Nach der Inkubationszeit muss das Fasergut entwässert werden. Dieser Vorgang kann durch Siebssysteme erfolgen, in denen die Enzym-Pufferlösung sogartig von dem Fasergut getrennt wird. Anschließend werden die Fasern getrocknet und weiterverarbeitet. Zwar ist die Inkubationslösung durch erneute Zugabe von Laccase bzw. Laccase und Mediator mehrfach verwendbar, doch kann als genereller Nachteil dieses Verfahrens der hohe Bedarf an Enzym-Pufferlösung zur Inkubation genannt werden, aus dem die aktivierten Fasern wieder entfernt werden müssen. Zudem kann die Entsorgung der Restlösung als aufwendig bezeichnet werden. Ein weiterer Aspekt ist, dass die Holzfasern durch die Nassinkubation eine sehr hohe Feuchte aufweisen, so dass deren Feuchtegehalt durch Vorverpressen oder / und durch eine intensivere und längere Trocknung reduziert werden muss. So benötigt man zur Trocknung von Holzfaserdämmplatten trotz Entwässerung und Kaltpressung mehrere Stunden (vgl. Kapitel 3.7). Zur Lösung dieses Problems findet parallel zu dieser Arbeit ein Projekt am Forstbotanischen Institut der Universität Göttingen statt, Holzfaserdämmstoffe mittels Mikrowellentrocknung zu trocknen, wodurch die Trocknungsdauer pro Millimeter Plattendicke erheblich gesenkt werden kann. Bei der Herstellung von Harten Faserplatten ist bei der Heißpressung ein Sieb für den besseren Dampfzug zu gebrauchen, welches in der Regel auf die Unterseite des Faservlieses platziert wird. Der Grund für diese Vorgehensweise ist, dass Faserplatten mit einer hohen Feuchte beim Heißpressen zerreißen können, da der durch das verdampfende Wasser verursachte hohe Druck in der Platte nicht gut entweichen kann.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Holzfasern

Die verwendeten Kiefernfasern wurden nach dem ASPLUND- oder Defibrator-Verfahren aufgeschlossen (siehe Kapitel 3.5.2). Es handelt sich somit um TMP Fasern (TMP = thermo mechanical pulping). Sie stammen von der Firma *Steico* aus dem Werk in Czarnkow, Polen. Laut der Firma *Steico* setzt sich der Industriefaserstoff ausschließlich aus Kiefernholz der Baumarten *Pinus sylvestris* und *Pinus radiata* in variierenden Mischungsverhältnissen zusammen. Bei allen im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten analytischen Untersuchungen mit Holzfasern und die Produktion von bindemittelfreien MDF- und Faserdämmstoffplatten ist ausschließlich dieser Faserstoff aus einer Produktionscharge der Fa. *Steico* verwendet worden.

4.1.2 Technische Lignine

Bei den verwendeten technischen Ligninen wurden Lignine verwendet, die aus dem Sulfat- und Sulfitaufschluss bei der Zellstoffherstellung stammen.

4.1.2.1 Kraftlignin aus dem Sulfataufschluss

Das hier verwendete Kraftlignin trägt den Namen Indulin (AT), welches der Handelsname der Firma *Westvaco Lignochemicals* in North Charleston, South Carolina, USA ist. Das dunkelbraune, süßlich riechende Indulin ist pulverförmig, hat einen Ligninanteil von etwa 99 % und einen Ascheanteil von 1 %. Indulin ist wasserunlöslich.

4.1.2.2 Ca-Ligninsulfonat (Wafex)

Das Calcium-Ligninsulfonat stammt von der Firma *Lignotech* in Borregaard, Norwegen. Der Handelsname lautet Wafex. Das feinpulvrige, bräuliche Wafex ist wasserlöslich und hat einen pH Wert von $4,5 \pm 0,5$ in 10 %iger Lösung. Der Trockenanteil beträgt ≥ 93 %.

4.1.2.3 Na-Ligninsulfonat

Das hier verwendete Natrium-Ligninsulfonat ist von dem Chamikalienanbieter *Carl Roth*, Karlsruhe bezogen worden. Das hellbraune, pulverförmige Na-Ligninsulfonat hat einen Trockengewichtsanteil von ≥ 93 %. Das Ligninsulfonat ist wasserlöslich und hat einen pH-Wert von 8,0 in 10 %iger Lösung.

4.1.3 Mediatoren

Mediatoren sind kleine Redoxmoleküle, die als Elektronencarrier zwischen Lignin und Laccase agieren (ROCHEFORT et al., 2004), wodurch die Reaktivität zwischen beiden Komponenten erhöht werden soll.

4.1.3.1 ABTS

ABTS ist die Abkürzung für 2,2'-Azino-bis-(3-ethylthiazolin-6-sulfonsäure). Von BOURBONNAIS und PAICE (1990) als erster wirkungsvoller Mediator entdeckt, war zuvor schon ein in der biochemischen Analytik häufig verwendetes Chromogen zum colorimetrischen Nachweis von Laccase (MATSUMURA et al., 1986), Peroxidase (CHILDS et al., 1975 und MÄKINEN et al., 1982), Monoamin-Oxidase (SZUTOWICZ et al., 1984), Glykogen (BRUSS et al., 1978) und Wasserstoffperoxid in Zuckerbestimmungen (GAWEHN et al., 1970 und WERNER et al., 1970). So kann es als Substrat für Enzyme verwendet werden, die am Metabolismus freier Radikale beteiligt sind. ABTS ist grün und gut wasserlöslich. Bei dem Einsatz als Mediator muss jedoch bedacht werden, dass durch die grüne Färbung des ABTS auch das Endprodukt (z.B. MDF-Platte) eine grünliche Färbung erhält. Für die Bestimmung der Laccaseaktivität in dieser Arbeit dient es jedoch als Radikalkation, das bei 420 nm photometrisch absorbiert werden kann.

4.1.3.2 4-Hydroxybenzoesäure (HBA)

Bei der hier verwendeten Hydroxybenzoesäure handelt es sich um 4-Hydroxybenzoesäure, oder auch *para*-Hydroxybenzoesäure, deren Ester die Parabene sind. Parabene verfügen über eine gute antimikrobielle und fungizide Wirkung und werden daher auch in Arzneimitteln, Kosmetika und in der Lebensmittelchemie eingesetzt. Die Hydroxybenzoesäuren sind organische aromatische Verbindungen und gehören zu der Gruppe der

Hydroxycarbonsäuren. Zu der Gruppe der Hydroxybezoensäuren zählen noch die 2-Hydroxybenzoensäure, bekannt als Salicylsäure, und die 3-Hydroxybenzoensäure. Das hier verwendete HBA wurde von der Firma *AppliChem* bezogen. Das weiße Pulver hat einen Reinheitsgehalt von 99 %. In Wasser ist es mit 9 g/l löslich.

4.1.3.3 Acetosyringon

Acetosyringon ist ein sekundärer Pflanzenstoff und somit eine natürlich vorkommende Verbindung. Erhältlich ist es als hellbraunes Pulver, das sich nur wenig in Wasser löst. Anwendung findet es zum Beispiel in der Pflanzenbiotechnologie. In dieser Arbeit wird Acetosyringon als Mediator ausgewählt, weil es die Aktivität von Oxidasen steigern kann. Das hier verwendete Acetosyringon wurde von der Firma *Fluka* bezogen und hat einen Trockensubstanzanteil von 97 %.

4.1.3.4 Methylsyringat

Das hier verwendete Methylsyringat stammt von der Firma *Novozymes* und trägt den Produktnamen *Novoprime F 258*. Es handelt sich um ein hellbraunes Pulver, welches mindestens 90 % Methylsyringat enthält. *Novoprime F 258* wird u. a. als Biokatalysator in industriellen Prozessen verwendet.

4.1.3.5 Syringaaldehyd

Laut KAWAI et al. (1989) spielt Syringaaldehyd eine wichtige Rolle bei der Oxidation der nicht-phenolischen Monomeren durch Laccase. So wird auch in dieser Arbeit das Syringaaldehyd herangezogen, um seine Wirkung als Mediator bei der Inkubation von Laccase mit Ligninen zu untersuchen (siehe Kapitel 4.2.5). Das verwendete Syringaaldehyd wurde von der Firma *Carl Roth* bezogen. Das hellgelbe Pulver hat einen Trockensubstanzanteil von 97 %. Es ist nicht wasserlöslich und hat keinerlei toxische Wirkung.

4.1.3.6 TEMPO

Bei dem Kurzbegriff TEMPO handelt es sich um 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl. Es ist ein stabilisierendes Radikal, und wird in der Organischen Chemie als Oxidationsmittel eingesetzt. So kommt es auch als Mediator bei der Oxidation des Lignins durch die Laccase in Frage

(siehe Kapitel 4.2.5). Das rote, feinkristalline Pulver wurde von der Firma *Merck* bezogen. Die Wasserlöslichkeit beträgt 9,7 g/l. Die Nachteile von TEMPO sind, der stechende Geruch, das Verursachen von Verätzungen bei Hautkontakt und die akute Toxizität.

4.1.4 Laccase

4.1.4.1 Eigene Herstellung von Laccase

Für die Versuche zur Herstellung und Optimierung von Laccase in Schüttelkulturen und im 5 Liter Fermenter dienten die Stammkulturen der Weißfäulepilze *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Trametes hirsuta* und *Phlebia radiata*. Die Stammkulturen waren am Büsgen-Institut, Abteilung Molekulare Holzbiotechnologie und Technische Mykologie, vorhanden. Bei dem 5 Liter Fermenter handelt es sich um einen *Bioflow II* Fermenter der Firma *New Brunswick Scientific*, Edison, New Jersey, USA.

4.1.4.2 Laccase von der Firma *Novozymes*

Die für alle Inkubationsversuche der Lignine und Holzfasern verwendete Laccase stammt von der Fa. *Novozymes* in Bagsvaerd, Dänemark. Die Handelsbezeichnung lautet *Novozym 51003*. Diese Laccase (E.C. 1.10.3.2) wird aus dem genetisch modifizierten Pilz *Aspergillus sp.* gewonnen und als braune Flüssigkeit geliefert. Nach der Beschreibung von *Novozymes* (NOVOZYMES, 2003) kann *Novozym 51003* für die Oxidation eines weiten Spektrums an aromatischen und Amino-Bestandteilen angewendet werden. Ein Einsatzbereich des Enzyms liegt in der Reaktion mit phenolischen Bestandteilen im Holz, dem Lignin. So kann es in der Faserplattenproduktion teilweise oder komplett als Ersatz für Formaldehyd oder Cyanid Leime verwendet werden. In einer weiteren Anwendung kann es für die Entfernung des Lignins bei der Papierherstellung eingesetzt werden. Die Laccaseaktivität der in dieser Dissertation verwendeten *Novozym* Laccase variiert je nach Produktionscharge zwischen 1200 U/ml und 2200 U/ml (ABTS Units). Geliefert wird die *Novozym* Laccase in 25 Liter oder für großanwendungen in 1000 Liter Gefäßen. Durch die Verwendung eines Stabilisators in der Laccase beträgt ihr pH-Wert etwa 7,5 (NOVOZYMES, 2003).

4.1.5 Nährmedien

4.1.5.1 BSM (Bifidus Selective Medium) Medium

Das BSM-Medium setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen (Tabelle 3):

Tab. 3: BSM Medium

Laccase-Medium (BSM) (Mengenangaben für 1000ml Medium)			
▪ L-Asparagin	0,65 g	▪ KH ₂ PO ₄	1,00 g
▪ KCl	0,5 g	▪ MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50 g
▪ Agar	15,00 g	▪ Stammlösung 1 für BSM-Medium	50,00 ml
▪ Glucose	5,00 g	▪ Stammlösung 2 für BSM-Medium	50,00 ml
▪ Hefeextrakt	0,50 g		
Zusammensetzung der Stammlösungen für Laccase-Medium (BSM) (Mengenangaben für 1000 ml Stammlösung)			
Stammlösung 1 (mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen)		Stammlösung 2 (mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen)	
▪ Fe (II) SO ₄ x 7 H ₂ O	0,20 g	▪ ZnNO ₃ x 4 H ₂ O	0,04 g
		▪ CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,06 g
		▪ Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	1,00 g
		▪ Mn (CHCOO) ₂ x 4 H ₂ O	0,16 g

Als Lösungsmittel dient bidestilliertes Wasser, mit dem auch am Ende das Medium auf 1000 ml aufgefüllt wird. Wird mehr Nährmedium benötigt, müssen die Einwaagen der Bestandteile für das gewünschte Volumen hochgerechnet werden.

4.1.5.2 L₁-Agar Medium

Sowohl als festes Nährmedium als auch als Flüssigmedium wurde die synthetische Nährlösung nach HÜTTERMANN und VOLGER (1973) modifiziert hergestellt (Tabelle 4). Für das Flüssigmedium darf kein Agar in das Medium gegeben werden, da es sonst fest wird.

Tab. 4: L₁-Agar Medium

Laccase-Medium (L ₁ -Agar) (Mengenangaben für 1000ml Medium)			
▪ L-Asparagin	2,50 g	▪ Hefeextrakt	0,50 g
▪ DL-Phenylalanin	0,15 g	▪ KH ₂ PO ₄	0,50 g
▪ Agar	15,00 g	▪ MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50 g
▪ Glucose	10,00 g	▪ Stammlösung für L ₁ -Medium	10,00 ml
Zusammensetzung der Stammlösung für Laccase-Medium (L ₁) (Mengenangaben für 1000 ml Stammlösung)			
▪ CaCl ₂	1,00 g	▪ ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g
▪ FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,00 g	▪ CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,10 g
▪ MnSO ₄ x 4 H ₂ O	0,10 g		

Als Lösungsmittel dient bidestilliertes Wasser, mit dem auch am Ende das Medium auf 1000 ml aufgefüllt wird. Wird mehr Nährmedium benötigt, müssen die Einwaagen der Bestandteile für das gewünschte Volumen hochgerechnet werden.

4.1.6 Induktoren

Bei der Kultivierung von den in Kapitel 4.1.4.1 genannten Pilzorganismen (*Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Trametes hirsuta* und *Phlebia radiata*) sollen Induktoren eingesetzt werden, da durch die Enzyminduktion die genetische Expression des Enzyms gesteigert werden kann. So wurde zum Beispiel durch FAHRAEUS und REINHAMMER (1967) sowie MALMSTRÖM (1982) festgestellt, dass die Laccaseaktivität in *Trametes versicolor*-Kulturen durch Induktion mit 2,5 Xylidin erfolgreich gesteigert werden konnte. Da 2,5 Xylidin jedoch in der Gefahrenstoffklassifizierung als „giftig“ eingestuft ist, wurde angestrebt, natürliche Phenole als Induktoren zu verwenden (KHARAZIPOUR, 1996). Bei *Trametes villosa* wurden erhöhte Laccaseaktivitäten durch die Induktion von Kraftlignin (Indulin) festgestellt, die an die Werte der mit Xylidin induzierten Kulturen heranreichten (KHARAZIPOUR, 1991; SHEKHOLESAMI, 1991 und KRUSENBAUM, 1991). Neben dem Kraftlignin ist auch Vanillin als Induktor geeignet, da es als sehr reaktionsfreudig gilt und ebenfalls eine Erhöhung der Laccaseaktivität bewirken kann (Kharazipour, 1996).

Im Folgenden werden die Induktoren kurz charakterisiert:

4.1.6.1 Indulin (siehe Kapitel 4.1.2.1)

4.1.6.2 Vanillin

Vanillin ist der Hauptaromastoff der Vanille. Als naturidentischer Aromastoff kommt Vanillin in der Gewürzvanille (*Vanilla planifolia*) vor, aber auch in zahlreichen anderen Pflanzen. Neben der Verwendung als Aromastoff in Lebensmitteln wird er auch als Duftstoff für die Parfümindustrie und als Ausgangsstoff für Medikamente genutzt.

Vanillin kann auch synthetisch hergestellt werden, so wird ein Großteil des Vanillins aus den bei der Papierherstellung anfallenden Sulfitabfälle gewonnen. Die hierin enthaltene Ligninsulfonsäure wird bei erhöhter Temperatur und erhöhtem Druck mit Oxidantien und Alkalien behandelt, wobei unter anderem Vanillin entsteht, das anschließend durch Extraktion, Destillation und Kristallisation gereinigt wird. Das in dieser Arbeit verwendete Vanillin entstammt aus dem Papierherstellungsprozess und wird als Induktor zur Steigerung der Laccaseaktivität der Pilzorganismen eingesetzt.

4.1.6.3 2,5 Xylidin (2,5 Dimethylanilin)

Im allgemeinen werden die Xylidine zur Produktion von Farbstoffen, Pestiziden und anderen Chemikalien verwendet. Bei Xylidinen handelt es sich um aromatische Amine mit der allgemeinen Formel $C_6H_3(CH_3)_2NH_2$, von denen es 6 Konstitutionsisomere gibt. Das hier verwendete 2,5 Xylidin ist der Gefahrenstoffkennzeichnung nach als „giftig“ und „umweltgefährlich“ eingestuft. Es ist eine rötlich braune Flüssigkeit mit aminartigem Geruch (*GESTIS* Stoffdatenbank, 2008). Dennoch sollen aufgrund der guten Induktionsergebnisse mit 2,5 Xylidin (Kharazipour, 1996) Versuche damit durchgeführt werden.

4.1.7 Pufferlösungen

4.1.7.1 Na-Acetat Puffer

Für die Bestimmung der Laccaseaktivitäten mittels ABTS Test wird grundsätzlich Na-Acetat Puffer mit einem pH-Wert von 5,0 verwendet. Die Konzentration des Puffers beträgt 120 mM. Entsprechend wird das pulverförmige Na-Acetat in bidestilliertem Wasser aufgelöst.

Der pH-Wert von 5,0 wird erreicht, indem bei dem Ansetzen der Pufferlösung Eisessig hinzugegeben wird.

4.1.7.2 McIlvaine Puffer

Für alle Inkubationen von Ligninen und Holzfasern mit Laccase oder Laccase und Mediator wird der McIlvaine Puffer verwendet. Dieser dient zum Einstellen und zur Stabilisierung des gewünschten pH-Wertes in der Inkubationslösung. Die gewünschte Konzentration von Laccase oder Laccase und Mediator wird unmittelbar vor der Inkubation in den Puffer gegeben. Aber auch für die jeweiligen Kontrollproben, die ohne Laccase oder Mediator behandelt werden, wird der McIlvaine Puffer eingesetzt, um so eine bessere Vergleichbarkeit der Substrate nach Abschluss der Versuche zu gewährleisten. Der McIlvaine Puffer setzt sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

0,2 M di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) von *AppliChem*

0,1 M Citronensäure Monohydrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) von *AppliChem*

H_2O_{bidest} als Lösungsmittel der beiden Reagenzien

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt, indem so viel gelöste 0,1 M Citronensäure in 0,2 M di-Kaliumhydrogenphosphatlösung gegeben wird, bis der gewünschte Wert (z. B. pH 6,0) erreicht ist.

4.1.8 Analytische Geräte

I. Photometer zur ABTS Bestimmung

Zur Bestimmung der Laccaseaktivität mittels ABTS-Test nach MATSUMURA et al. (1986) dient das Spectrophotometer *SpectraMax 340 PC³⁸⁴* von *Molecular Devices*, Sunnyvale, Californien, USA. Mit diesem sind Messungen im Wellenlängenbereich von 340 nm bis 850 nm durchführbar. Die ABTS Bestimmung findet bei 420 nm statt.

II. Photometer zur Bestimmung der Freisetzung von Aromaten und der Ermittlung des Lignin- und Pentosangehaltes bei 280 nm

Bei dem Photometer zur Bestimmung phenolischer Hydroxyl-Gruppen in der Fasersuspension und zur chemischen Bestimmung des Lignin- und Pentosangehaltes handelt es sich um ein Spectrophotometer *DU 800* von *Beckmann Coulter*, Miami, Florida, USA. Der messbare

Wellenlängenbereich bei diesem Gerät beträgt 190 nm bis 1100 nm. Für alle Versuche in dieser Arbeit werden Messungen grundsätzlich bei der Wellenlänge 280 nm durchgeführt.

III. Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) an einem HPLC-Analysengerät

Die Untersuchungen zur Molekulargewichtsbestimmung verschiedener Lignine erfolgen an einem HPLC-Gerät der Firma *Waters* und *Millipore*. HPLC ist die Bezeichnung für High Performance Liquid Chromatography. Durch die Verwendung von Gelsäulen in der HPLC Anlage wird die hier angewandte HPLC-Methode auch Gel-Permeations-Chromatographie genannt. Es handelt sich hierbei um eine spezielle Art der Säulenchromatographie, die sich besonders für die Trennung von Molekülen und somit für die Analyse von Molekulargewichten eignet.

Folgende Komponenten bauen die HPLC-Anlage auf:

Pumpe: *Waters 510*

Pumpensteuerung: *Waters Interface Module*

Autosampler: *Waters 717 plus*

Thermoschrank: *Peltier* Kolonnenthermostat

GPC-Säulen: TSK-GEL Säulen *HXL 4000*, *HXL 3000* und *HXL 1000* von *TosoHaas*, Stuttgart

Detektor: *Waters 486 Tunable Absorbance Detector*

Computer für die Aufnahme und Auswertung der Daten

IV. Rasterelektronenmikroskop (REM)

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen werden mit ein Rasterelektronenmikroskop, Typ EM 515, der Firma *Philips*, Hamburg, angefertigt. Zur Goldbedampfung dient ein Sputtergerät *Emscope SC 500* von *Emscope Laboratories LTD*, Ashford, England.

V. Fourier-Transform-Infrared (FTIR) Spektrometer

Die FTIR-Spektren werden mit dem FTIR Spektrometer *Equinox 55* in Kombination mit dem IR Mikroskop *Hyperion 3000* von der Firma *Bruker Optics*, Ettlingen aufgenommen.

VI. Electron-Spin-Resonance (ESR) Spektroskop

Für die Bestimmung der Menge freier phenolischer Radikale auf der Faseroberfläche eignet sich die Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie. Erste Messungen werden vom Institut für Biophysik des Uniklinikums-Saarland durchgeführt. Weitere Messungen erfolgen am Institut für Anorganische Chemie der Universität Göttingen.

VII. Nuclar-Magnetic-Resonance (NMR) Spektroskop

Zur Strukturaufklärung verschiedener Holzbestandteile in Holzfasern kann die Nuklear-Magnetische-Resonanz-Spektroskopie (NMR) angewandt werden. Die Messungen erfolgen an dem Gerät *Bruker Avance 400 MHz WB* der Firma *Bruker*, Ettlingen. Die Messungen der Spektren werden von dem Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie, Festkörper NMR in Göttingen durchgeführt.

4.1.9 Technische Geräte zur Herstellung von Dämmstoff- und Mitteldichten Faserplatten (MDF)

4.1.9.1 Technische Geräte zur Herstellung von Dämmstoffplatten

I. Inkubationsreaktor

Bei dem Inkubationsreaktor handelt es sich um einen umfunktionierten Fermenter der Arbeitsgruppe Chemie und Verfahrenstechnik von Verbundwerkstoffen, Büsgen-Institut der Universität Göttingen. Es ist ein runder, etwa 100 l fassender Edelstahlbehälter, dessen Boden mit einem Ablaufhahn ausgerüstet ist. Im unteren Teil des Reaktors befindet sich ein Heizstab, der um etwa $\frac{3}{4}$ des Reaktordurchmessers in den Behälter hineinragt. Dieser Heizstab ist mit einem Temperaturregler versehen, mit dem die gewünschte Inkubationstemperatur eingestellt werden kann. Von oben lässt sich der Reaktor mit einem Edelstahldeckel verschließen, welcher mit runden Öffnungen versehen ist. Durch die Öffnungen können zum Beispiel Temperaturfühler oder andere Messsonden (z. B. O₂-Sonde) eingeführt werden. Eine im Deckel zentrierte Öffnung ist für die Anbringung eines Rührwerks vorgesehen, durch welches die Inkubationslösung (in diesem Fall Holzfasern im Laccase bzw. Laccase-Mediator Puffergemisch) gerührt werden kann. Nach der Inkubationszeit kann die gesamte Inkubationslösung zur Weiterverarbeitung durch den Ablaufhahn abgelassen werden.

II. Gießformkasten

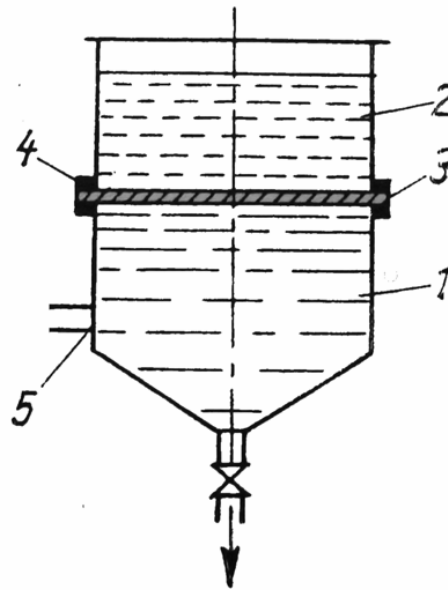


Abb. 12: Gießformkasten: 1. Unterteil, 2. heb- und senkbares Oberteil, 3. perforierte Kunststoffplatte mit Siebspannung, 4. Flanschen mit Gummileisten, 5. Anschluss für Wassereinfüllung und Vakuumsauger (geändert nach Lampert 1967)

Mithilfe eines Gießformkastens (Abbildung 12) können die nassinkubierten Fasern für die Herstellung von Dämmstoffplatten durch Sogwirkung entwässert werden. In diesem Kasten können Plattenmaße von 500 mm x 300 mm (L x B) hergestellt werden, die Plattenhöhe richtet sich nach der Fasermenge. In dieser Dissertation liegt die Höhe bei 20 mm. In das Oberteil des Kastens wird die gesamte und inkubierte Fasersuspension geschüttet. Das in der Mitte befindliche Sieb nimmt die Fasern auf, während im unteren Teil die Suspension entlassen wird. Zuerst wird ein Vakuumsauger an die Auslassöffnung angeschlossen, um eine Vorentwässerung durchzuführen. Durch mechanische Entwässerung und dem Druck durch eine Abdeckplatte bildet sich infolge der Sedimentation der Fasern auf dem Sieb ein Vlies (LAMPERT 1967). Wichtig ist, dass die Entwässerung nicht zu schnell erfolgt, da sonst Strömungen entstehen, die eine heterogene Flächendichte hervorrufen. Da das Faservlies nach der Entnahme aus dem Gießformkasten noch eine hohe Feuchte hat (weit über 200 %) muss das Vlies für die Weiterverarbeitung nochmals entwässert werden, was durch Ausübung eines Pressdruckes auf die Fasern mechanisch geschieht.

III. Kaltpresse

Durch das Verpressen des geformten Faservlieses zur Herstellung von Dämmstoffplatten soll eine weitere Entwässerung der Holzfasern gewährleistet sein, da das Vlies für eine direkte Trocknung zu feucht ist. Darüber hinaus wird das Faservlies durch den Pressvorgang nochmals verdichtet, was bei der Plattenherstellung nach Aktivierung der holfasereigenen Bindekräfte durch die Laccase von hoher Bedeutung ist.

Bei der dazu verwendeten Presse handelt es sich um eine hydraulische Einetagen-Unterkolbenpresse der Firma *Becker & van Hüllen*, Krefeld mit einer Pressfläche von 600 mm x 400 mm. Die Presse verfügt über eine Ölpumpe von *OTC*, Serie PQ 60, aus Owatonna, Minnesota, USA, wodurch die Hydraulik gesteuert wird. Die Pressflächen im Ober- und Untertisch sind thermoöl-beheizbar, was durch ein gesondertes Heizaggregat geregelt werden kann.

IV. Mikrowellentrocknung

Zur Trocknung der kalt gepressten Dämmstoffplatten dient die Mikrowelle vom Typ *MWDA 6 x 1,1 kW*. Diese stammt vom Hersteller *Fricke und Mallah Microwave Technology GmbH* in Peine. Das Innenraummaß beträgt 120 cm x 65 cm x 50 cm (L x B x H), die Frequenz 2,45 GHz. Die Anlage ist mit einem oszillierendem Förderband ausgestattet (Steuerungsmittels Lichtschranken). Die Einkopplung der Mikrowellen erfolgt über 6 Magnetrons mit jeweils 1,1 kW oben im Innenraum.

Eine andere Möglichkeit zur Trocknung der Dämmplatten ist die Konvektionstrocknung. Doch weist die Mikrowellentrocknung einige Vorteile gegenüber der Konvektionstrocknung auf, welche unter anderem sind: die hohen Trocknungsgeschwindigkeiten, die volumetrische Erwärmung direkt im Trocknungsgut, die fast gleichmäßige Feuchtigkeitsabnahme im gesamten Trockengut, ein niedriger spezifischer Energieverbrauch und ein geringer Platzbedarf der Mikrowellenanlage (MEREDITH, 1998).

4.1.9.2 Anlage und Geräte zur Herstellung der MDF-Platten

I. MDF-Pilotanlage der Firma *BINOS*

Die MDF-Platten werden in der Pilot-Anlage der Fa. *BINOS*, Springe hergestellt (Abbildung 13). Mit dieser Anlage werden alle Schritte, die für die Produktion von MDF-Platten vor dem Verpressen relevant sind, durchgeführt. Diese sind das Auflockern, die Beleimung (bei Verwendung des Enzyms „Besprühung“), die Trocknung und für diese Arbeit auch die Inkubation der Fasern.

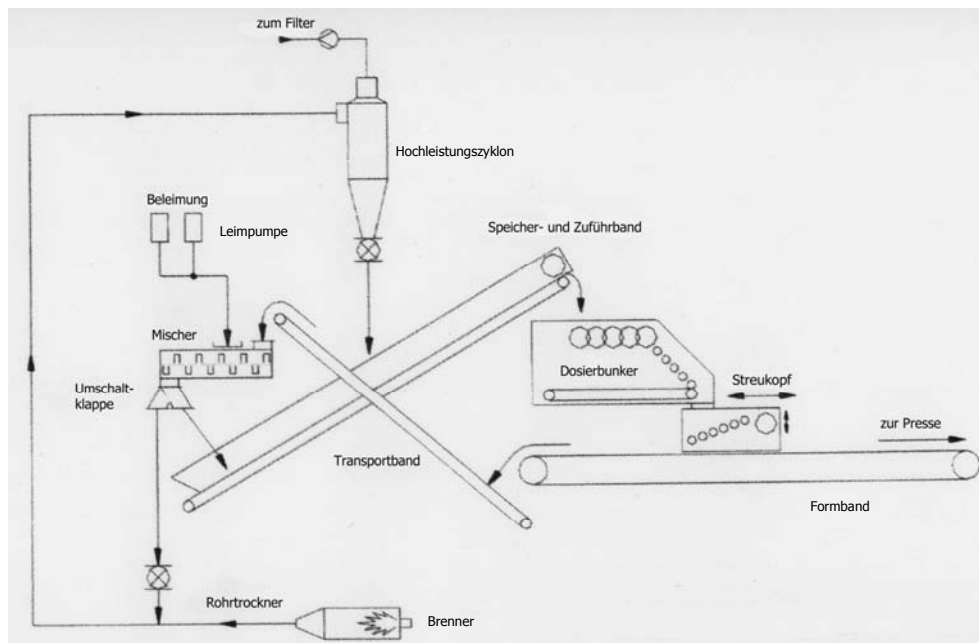


Abb. 13: Schemazeichnung der Fa. *BINOS* – Pilotanlage zur Produktion von MDF-Platten

Für das Auflockern der Fasern müssen die Fasern wie beim vollständigen Herstellungsprozess für MDF-Platten einmal komplett durch die Pilotanlage transportiert werden. Sind die Fasern aufgelockert, werden sie über das Transportband oder Muldengurtförderer zum Mischer transportiert, bei welchem es sich um einen Ein-Achs-Mischer handelt. An diesem sind Leimdüsen angebracht, welche mit einer Leimpumpe verbunden sind. Während die Fasern in den Mischer einfallen, werden diese durch die Beleimungsdüsen unter Hochdruck mit Leim besprüht und durch die Rotationsbewegung der Mischerachse verwirbelt, um anschließend in eine Ausfallschleuse in die Rohrtrocknerleitung zu fallen, die durch einen Gasbrenner erhitzt wird. Danach werden die Fasern über einen Hochleistungszyklon auf das Zuführband gestreut und zum Faserbunker geleitet. Der Faserbunker ist für diese Arbeit auch die Stelle, wo die Inkubation der Fasern stattfindet. (Näheres dazu im Methodenkapitel 4.2.13.) Sind alle beleimten Fasern in den Bunker gefallen, kann mit der Streuung des Faservlieses fort- gefahren werden, welches über einen Faserstreukopf, bestehend aus Stachelwalzen und Rückstreifrechen, gleichmäßig in Höhe und Breite auf das Formband aufgetragen wird. Bevor das Faservlies in die Heißpresse überführt wird, wird es mehrfach auf eine Länge von 60 cm und einer Breite von 45 cm vorgeformt und vorgepresst. Die MDF-Platten können somit in gewünschter Stärke und Rohdichte in der Heißpresse hergestellt werden.

II. Heißpresse und Konditionierung

Bei der Heißpresse handelt es sich um eine hydraulische Einetagen-Unterkolbenpresse der Firma *Simpelkamp*, Krefeld. Die Pressfläche beträgt 600 mm x 800 mm. Die Presse verfügt über ein Ölpumpen- und Steuerungsaggregat. Die Pressflächen im Ober- und Untertisch können bis maximal 300 °C elektrisch erhitzt werden. Der Kolben leistet einen hydraulischen Arbeitsdruck von etwa 280 bar bei einer Gesamtpresskraft von 200 kN. Auf die Plattenfläche berechnet ergibt sich demnach ein spezifischer Druck von maximal 417 N/cm². Die Presse öffnet sich automatisch, wenn die voreingestellte Presszeit abgelaufen ist (SCHÖPPER, 2006).

Zum Verpressen zu Faserplatten wird das vorgeformte und vorverdichtete Faservlies auf ein mit einem Presspapier belegtes Aluminiumblech gelegt und oben ebenfalls mit einem Presspapier und einem Aluminiumblech bedeckt, um in der Heißpresse verpresst zu werden.

Nach dem Pressvorgang werden die MDF-Platten zur Konditionierung mindestens 4 Stunden gelagert, bevor sie weiterverarbeitet werden können.

III. Langbandschleifmaschine und Kreissäge

Bevor die hergestellten MDF-Platten zugeschnitten werden können, müssen diese von der Langbandschleifmaschine abgeschliffen werden, da sich beim Verpressen auf der Plattenober- und Plattenunterseite eine so genannte „Presshaut“ gebildet hat (SCHÖPPER, 2006). Sind beidseitig etwa 0,5 mm abgeschliffen, können die Platten zugeschnitten und die mechanisch-technologischen Eigenschaften überprüft werden.

Zum Besäumen und Zuschneiden der hergestellten MDF-Platten wird die Tischformatkreissäge TK 1685 D von der Firma *Metabo* verwendet. Jede Platte wird an ihren Rändern etwa 6 cm besäumt, da der Pressdruck beim Verpressen vom Platteninneren bis hin zum Rand abnimmt. Am Rand liegen wesentlich schlechtere mechanisch-technologische Eigenschaften vor (SCHÖPPER, 2006). Die genauen Schneidmaße der MDF-Platten für das Herstellen von Prüfkörpern sind von der Prüfnorm abhängig und werden im Kapitel 4.1.10 beschrieben.

4.1.10 EN-Vorgaben für die Prüfung der MDF-Platten

Die in dieser Dissertation hergestellten MDF-Platten müssen die im Ergebnisteil (Kapitel 5.12) in der Übersichtstabelle des DEUTSCHEN INSTITUTS FÜR NORMUNG e.V. (2005) (siehe Kapitel 5.12.1, Tabelle 11) dargestellten Minimal- bzw. Maximalwerte zum Erfüllen der jeweiligen EN-Normen erreichen. Folgende EN-Normen sind für eine Charakterisierung der mechanisch-technologischen Eigenschaften relevant:

4.1.10.1 EN 310 (1993) Bestimmung der Biegefestigkeit

Die Biegefestigkeitsprüfung erfolgt nach der EN 310 (1993). Mit der Biegefestigkeit wird die Formbeständigkeit der MDF-Platten ermittelt und stellt somit eine wichtige Festigkeitseigenschaft für eine konstruktive Verwendung dar. Zur Prüfkörperherstellung werden 50 mm breite rechteckige Probenkörper geschnitten. Die Länge der Proben sind identisch mit der Breite der hergestellten MDF-Platten. Die Biegefestigkeit wird an der *Zwick-Roell*-Prüfmaschine (siehe Kapitel 4.1.11) bei mittigem Kraftangriff ermittelt. Sie wird in N/mm² (Newton/Quadratmillimeter) angegeben und nach der folgenden Gleichung berechnet (Formel 1).

Formel 1: Berechnung der Biegefestigkeit nach EN 310

$$\text{Biegefestigkeit [N/mm}^2\text{]} = \frac{3 * \text{Bruchkraft [N]} * \text{Auflagerabstand [mm]}}{2 * \text{Prüfkörperbreite [mm]} * (\text{Prüfkörperdicke [mm]})^2}$$

4.1.10.2 EN 317 (2003) Bestimmung der Dickenquellung nach 24 h Wasserlagerung

Die Dickenquellung gibt Aufschluss über das Wasseraufnahmevermögen und die Qualität der Verklebung des geprüften Holzwerkstoffs und ist somit eine wichtige mechanisch-technologische Eigenschaft. Nach der EN 317 (2003) sind Proben mit den Abmessungen 50 mm x 50 mm (± 1 mm) anzufertigen und bei einer mittleren Luftfeuchte von 65 °C (± 5 %) und einer Temperatur von 20 °C (± 2 °C) zu klimatisieren. Die Dicke der Prüfkörper wird jeweils vor der Wasserlagerung und nach der Lagerung bestimmt. Die Proben werden senkrecht im Wasser mit einem pH-Wert um 7,0 ($\pm 1,0$) bei einer Temperatur von 20 °C

(± 1 °C) aufbewahrt. Nach einer 24-stündigen Prüfdauer werden die Proben aus dem Wasser entnommen und die Dickenquellwerte nach folgender Formel (2) errechnet:

Formel 2: Berechnung der Dickenquellung nach Wasserlagerung

$$\text{Dickenquellung [\%]} = \frac{\text{Probendicke (nach 24 h) [mm]} - \text{Probendicke (klimatisiert) [mm]}}{\text{Probendicke (klimatisiert) [mm]}} * 100$$

4.1.10.3 EN 319 (1993) Bestimmung der Querzugfestigkeit

Die Querzugfestigkeit ist die Zugfestigkeit senkrecht zur Plattenebene und beschreibt das Verhältnis der Bruchkraft zur Querschnittsfläche des Prüfkörpers (SCHÖPPER, 2006). Die Prüfkörper werden aus der geschliffenen und besäumten MDF-Platten nach der EN 326-1 (1994) zugeschnitten. Demnach müssen die Prüfkörper genau 50 mm x 50 mm (± 1 mm) messen, rechtwinklig sein und gerade Kanten aufweisen. Vor dem Prüfvorgang werden die Proben wie bei der EN 317 (vgl. Kapitel 4.1.10.2) bei einer mittleren Luftfeuchte von 65 °C (± 5 %) und einer Temperatur von 20 °C (± 2 °C) klimatisiert. Anschließend erfolgt das Verkleben der Proben zwischen zwei Alu-Prüfjochen. Nach dem vollständigen Aushärten des Klebers werden die Proben mit der *Zwick-Roell*-Prüfmaschine getestet. Zur Erfüllung dieser Norm sind für MDF-Platten bestimmte Festigkeitswerte vorgegeben, die je nach Plattenstärke variieren (siehe Kapitel 5.12.1, Tabelle 11).

Die Berechnungsformel (3) für die Querzugfestigkeit lautet:

Formel 3: Berechnung der Querzugfestigkeit nach EN 319

$$\text{Querzugfestigkeit [N/mm}^2\text{]} = \frac{\text{Bruchkraft [N]}}{\text{Prüfkörperlänge [mm]} * \text{Prüfkörperbreite [mm]}}$$

4.1.11 Technische Geräte zur Überprüfung der mechanisch-technologischen Eigenschaften

Zwick-Roell-Prüfmaschine

Bei der zur Ermittlung der mechanisch-technologischen Eigenschaften der hergestellten MDF-Platten verwendeten Prüfmaschine handelt es sich um eine Material-Tischprüfmaschine der Firma *Zwick-Roell*, Ulm. Ihre Typenbezeichnung lautet T1-FR010TH.A50. Die maximale Prüfkraft beträgt 10 kN. Der Lastrahmen und die elektronische Mess-, Steuer- und Regeleinheit bilden die Grundeinheit dieser Prüfmaschine. Am Rahmen befindet sich eine mittlere elektrisch angetriebene Traverse und eine untere fest am Rahmen montierte Traverse. An beide wird das Prüfwerkzeug oder der Kraftaufnehmer befestigt. Mit der *Zwick-Roell* Prüfmaschine werden Biege-, Zug- und Druckversuche nach DIN- bzw. EN-Normen durchgeführt. Die Prüfdaten werden über ein Computersystem erfasst und können statistisch ausgewertet werden.

Roddichteprofilmessgerät DA-X von GreCon

Mit Hilfe des Labor-Rohdichteprofilmessgerät DA-X der Firma *GreCon*, Alfeld, kann eine schnelle und präzise Messung des Rohdichteprofiles durchgeführt werden. In Anlehnung an die EN 323 (1993) werden hier ebenfalls Prüfkörper mit den Abmessungen 50 mm x 50 mm zugeschnitten und vor der Rohdichtemessung bei einer mittleren Luftfeuchte von 65 °C (± 5 %) und einer Temperatur von 20 °C (± 2 °C) klimatisiert.

Das Labor-Dichtemeßgerät arbeitet mit einem auf Röntgentechnik basierenden, berührungslosen Messverfahren. Zur Aufnahme der Dichteverteilung über den Dickenquerschnitt wird der Linearschlitten mit dem Probenmagazin kontinuierlich durch das Meßsystem geführt. Je nach Dichteverteilung des Materials, durchdringt dabei mehr oder weniger Röntgenstrahlung die Proben. Diese wird vom Meßwertaufnehmer erfasst, ausgewertet und zum Computer weitergeleitet (*GreCon*, 2008).

Für jede MDF-Platte werden die Rohdichten mehrerer Prüfkörper gemessen und gemittelt, so dass zum einen die Einhaltung der vorgegebenen Rohdichten bei der Produktion der MDF-Platten kontrolliert werden kann und zum anderen Aussagen über den Zusammenhang von Rohdichten und Festigkeiten bei der mechanisch-technologischen Eigenschaftsprüfung getroffen werden können.

4.2 Methoden

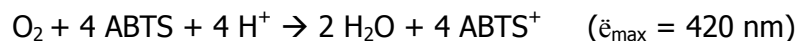
4.2.1 Laccase-Aktivitätstest

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Laccase Aktivitätsbestimmungen wird grundsätzlich der ABTS-Test nach MATSUMURA et al. (1986) angewandt. Bei diesem Test oxidiert die Laccase das Substrat ABTS, wodurch ein grünlich gefärbtes, stabiles Radikal entsteht, dessen Extinktion mit dem Spectrophotometer *SpectraMax 340 PC³⁸⁴* von *Molecular Devices* (siehe Kapitel 4.1.8) bei 420 nm gemessen wird. Bei den Messungen werden folgende Mengen in die Mikrotiterplatten des Spectrophotometers einpipettiert:

1. 20 µl Laccase, verdünnt oder unverdünnt
2. 160 µl 120 mM Na-Acetat Puffer, pH 5,0
3. 20 µl ABTS, gelöst in bidestilliertem Wasser in einer Konzentration von 50 mM

Nachdem zuletzt das ABTS in die Mikrotiterplatten einpipettiert wird, muss unmittelbar danach die Laccaseaktivität bestimmt werden, da die Reaktionen zwischen Laccase und ABTS sehr schnell ablaufen.

Die Oxidation von ABTS zum ABTS-Kationradikal mittels Sauerstoff unter katalytischer Wirkung von Laccase:



Die Berechnung der photometrischen Aktivitätsbestimmung erfolgt nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz (Formel 4):

Formel 4: Lambert-Beer'sches Gesetz und dessen Anwendung für die Bestimmung der Enzymaktivität

$$\frac{\Delta E}{\Delta t} = \frac{\Delta c}{\Delta t} * \epsilon * d \quad \longleftrightarrow \quad \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E}{\Delta t} * \frac{1}{\epsilon * d} = \text{U/ml}$$

Δc = Konzentration der absorbierenden Substanz

Δt = Reaktionszeit in Minuten

ΔE = Extinktionsänderung

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

d = Länge des Lichtweges

Unter Berücksichtigung der Verdünnung und der Dimensionen folgt daraus:

$$U/ml = \frac{\Delta E / \text{min.}}{\varepsilon * d} * n$$

U/ml = Units pro ml Enzymlösung

ΔE = Extinktionsänderung bei 420 nm im linearen Bereich

ε = molarer Extinktionskoeffizient von ABTS: $3600 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$

d = Länge des Lichtweges durch die Küvette in mm

n = Verdünnungsfaktor der Enzymlösung

Eine Unit [U] beschreibt die Enzymmenge, die für die Umsetzung von einem Mikromol Substrat pro Minute unter den Testbedingungen benötigt wird.

4.2.2 Schüttelkulturen von Weißfäulepilzen

Die Laccase wird für anfängliche Versuche zunächst ohne Fermenter hergestellt, wofür Pilzstammkulturen der Weißfäulepilze *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Trametes hirsuta* und *Phlebia radiata* (siehe Kapitel 4.1.4.1) auf BSM- (Bifidus Selective Medium) oder L₁- (Agar-Agar) Agarplatten (siehe Kapitel 4.1.5) angezchtet und anschließend als Vorkultur in Flüssigmedien (z. B. BSM oder L₁ – Flüssigmedium) überführt werden.

Nach 7 Tagen werden die Vorkulturen homogenisiert und in frische Flüssigmedien übertragen, um somit die eigentlichen Versuchskulturen herzustellen. Sowohl die Vorkulturen, als auch die Versuchskulturen werden in 500 ml Erlenmeyerkolben bei konstant 24 °C Raumtemperatur auf einem Rund-Reziproschüttler bei 90 U/min aufbewahrt. Bei den Versuchskulturen werden täglich die extrazellulären Laccaseaktivitäten durch den standardisierten ABTS-Test (siehe Kapitel 4.2.1) nach MATSUMURA et al. (1986) ermittelt, um zum einen die Laccaseproduktion statistisch auszuwerten und zum anderen in Erfahrung zu bringen, welche Pilzstämme sich für eine hohe Ausbeute an Laccase am besten eignen. Dabei soll die Laccaseproduktion während der Kulturdauer zusätzlich durch einen so genannten Induktor erhöht werden.

Folgende Induktoren und Mengen bzw. Konzentrationen werden ausgewählt:

1. Indulin (Kraftlignin) mit 1 mg/ml, 1,25 mg/ml und 1,5 mg/ml in 0,1 M NaOH gelöst und pH-Wert mit 1 M HCL auf 5,0 eingestellt
2. Vanillin 1,25 mg/ml in 0,1 M NaOH gelöst, mit 1 M HCL auf pH 5,0 eingestellt
3. Xylidin (2,5-Dimethylanilin) in einer Konzentration von 6×10^{-4} mol/l.

4.2.3 Fermentation von *Trametes versicolor* im 5 l Fermenter

Weiterhin erfolgen Versuchsreihen mit einem 5 l Labor-Fermenter von *New Brunswick Scientific*. Als Laccaseproduzent dient *Trametes versicolor*, welcher auf BSM bzw. L₁ – Agar angezüchtet und in Flüssigmedien vorkultiviert wurde (vgl. Kapitel 4.2.2). Anders als bei der Versuchsdurchführung in Kapitel 4.2.2 werden die Vorkulturen nach der Homogenisierung direkt in das Reaktorgefäß des Fermenters gegeben, in dem sich 4 l bis 5 l Flüssigmedium befindet (BSM oder L₁-Medium). Das Gefäß ist mit einem Rührwerk versehen. Der Fermenter wird an eine Fermenter - Prozesseinheit angeschlossen, womit Temperierung, Abluftkühlung, und Belüftung geregelt werden und mittels Temperatur-, pH - und pO₂ – Sonden Daten aufgenommen werden können. Die Fermentation erfolgt bei 25 °C und 100 U/min Rührgeschwindigkeit. Die Kultur wird mit 1,5 l/min bis 2,0 l/min steriler Pressluft belüftet. Als Antischaummittel wird 1 ml/l Baumwollsamöl zugegeben. Wie bei den Schüttelkulturen (Kapitel 4.2.2) soll auch hier die Laccaseproduktion durch Zugabe von Induktoren erhöht werden. Die Wahl fällt auf Indulin, welches nach 72 Stunden des Fermentationsbeginns mit 1,25 g/l in 0,1 M NaOH solubilisiert hinzugegeben wird.

Täglich werden Proben aus dem Reaktorgefäß entnommen, wodurch das Mycelwachstum (Ermittlung der Biotrockenmasse durch Trocknung einer bestimmten Mycelmenge), der pH – Wert und die Laccaseaktivität überprüft werden können.

4.2.4 Analyse der Industrielaccase

Vor der Anwendung von Laccasen als Ersatz für ein herkömmliches Bindemittel ist es wichtig, ihre spezifischen Charakteristika zu kennen, um das Potential dieser Enzyme bestmöglich zu nutzen. Die hier verwendete Laccase ist die *Novozyme* Laccase 51003 (siehe Kapitel 4.1.4.2). Um das Potential dieser Laccase möglichst weit auszuschöpfen werden das pH-Optimum, die pH-Stabilität, das Temperaturoptimum und die Temperaturstabilität unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Alle Überprüfungen der Laccaseaktivitäten werden mit dem Na-Acetat Puffer (120 mMol, pH 5,0, siehe Kapitel 4.1.7.1) durchgeführt (MATSUMURA et al., 1986; KILARU, 2006). Für die Untersuchungen des pH-Optimums und der pH-Stabilität sowie des Temperaturoptimums und der Temperaturstabilität wird die Laccase mit McIlvaine Puffer (siehe Kapitel 4.1.7.2) behandelt. Die Messmethoden werden in Anlehnung an KILARU (2006) durchgeführt.

Bei der Untersuchung des pH-Optimums und der pH-Stabilität werden pH-Werte von 2,5 bis 7,0 (in Abständen von je 0,5) gewählt.

Bei den Laccaseaktivitätsmessungen wird das Substrat ABTS (2,2'-Azinobis-3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonat) verwendet (siehe Kapitel 4.2.1).

4.2.5 Untersuchung von Ligninproben mittels GPC (Gel-Permeations-Chromatographie)

Durch die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) soll die Molekulargewichtsverteilung des Lignins vor und nach der Inkubation mit Laccase bzw. Laccase und Mediator untersucht werden, wobei die Laccase- und Mediatorkonzentrationen variiert werden. Bei den verwendeten Ligninen handelt es sich um Ca-Ligninsulfonat (Wafex), Kraftlignin (Indulin) und Na-Ligninsulfonat. Als Kontrollproben dienen reine Lignin-Pufferlösungen. Die Probenvorbereitung und Messmethode ist dabei an die Methode von MAJCHERCZYK und HÜTTERMANN (1996) angelehnt. Die Messungen erfolgen an einer Hochdruckflüssigkeitschromatographieanlage (HPLC) von *Waters* (vgl. Kapitel 4.1.8).

Die Probenvorbereitung gestaltet sich wie folgt:

Jeweils 10 mg der oben genannten Lignine werden in McIlvaine Puffer (pH 6,0) gegeben. Je nach gewünschter Konzentration werden zwischen 50 U/ml und 250 U/ml (in 50er U/ml Schritten) Laccase und 10 mM oder 20 mM Mediator in den Puffer hinzugegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 4 ml Inkubationslösung vorhanden ist. Zum Vergleich der Molekulargewichte bei unterschiedlichen Laccasekonzentrationen werden die Proben 2 Stunden lang inkubiert. Für Zeitreihenversuche bei gleich bleibender Laccasekonzentration werden die Proben 1, 2, 6, 12 und 24 Stunden inkubiert.

Anschließend werden von jeder Probe 2 ml entnommen und mit 2 ml Ethylacetat (50 mM TDMA) für 30 Minuten durch einen Horizontalschüttler vermischt. Bei Zimmertemperatur werden die Proben bei 2000 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert, wobei sich die organische Phase von der wässrigen Phase trennt. Von der organischen Phase werden 1 ml entnommen und diese zu 1 ml NaCl-Lösung (1 %ig) gegeben. Die Lösungen werden 15 Minuten durch den Horizontalschüttler vermischt und danach bei 2000 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert. Dieser Vorgang wird eins- bis zweimal wiederholt, um die NaOH-Reste aus den Proben zu waschen. Nach dem Waschen werden 0,2 ml der organischen Phase entnommen und in spezielle Probenröhrchen (Vials) für die GPC gegeben, welche für 1 Stunde bei 50° C in einem Vakuumtrockenschrank gestellt werden. Nach diesem Vorgang werden zum Lösen der eingetrockneten Proben 0,5 ml reines Tetrahydrofuran (THF) zugegeben. Tetrahydrofuran (THF) ist ein Lösungsmittel, das nicht nur für die Probenvorbereitung benötigt, sondern hauptsächlich als Laufmittel für die GPC-Anlage eingesetzt wird. THF gilt als gefährlich, da sich darin explosive Peroxide bilden können. Daher wird THF fast ausschließlich mit einem peroxid-bindenden Stabilisator geliefert, welcher für chromatographische Messungen entfernt werden muss. Dies geschieht durch Destillation des Lösungsmittels unmittelbar vor den Untersuchungen.

Die mit THF befüllten Vials werden direkt in die GPC überführt, wo die Proben gemessen werden können. Doch müssen für die Auswertung der Probenspektren in der HPLC vorher Polysteren-Standards gemessen werden, die einerseits Hinweise darüber geben, ob eine hohe Trenngenaugigkeit der Säulen gewährleistet ist und die andererseits für die Auswertungssoftware als Referenzen für die Berechnung der Ligninmolekulargewichte notwendig waren, um die Messergebnisse miteinander vergleichen zu können. So werden Polysteren-Standards mit Molekulargewichten von 2,7 Mio. Dalton bis 416 Dalton bestimmt, um einen möglichst großen Molekulargewichtsbereich abzudecken.

Die Polyester-Standards sind in Standard 1 und Standard 2 unterteilt. Sie setzen sich aus je 6 Polyesterenen zusammen, die folgende Molekulargewichte enthalten (Tabelle 5):

Tab. 5: Molekulargewichte der Polyesterene Standards

Molekulargewichte in Dalton (Da.)	
Standard 1	Standard 2
470.000	2.700.000
110.000	200.000
34.500	110.000
10.200	614
3.100	520
1.030	416

Von jedem Polyesteren wird eine bestimmte Menge (in mg) abgewogen und in der gleichen Menge (in ml) THF gelöst, in welchem 20 mM TDMA (Alliquat 336) enthalten sind. Die Messung der Standards erfolgt im *Waters* Detektor bei einer Wellenlänge von 254 nm, die Ligninproben werden bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Während der Messungen in der HPLC Anlage dient THF + 20 mM TDMA (Alliquat 336) als Laufmittel, das die Proben vom Autosampler über die Gel-Säulen zum Detektor transportiert. Alle Messergebnisse werden in einem Computerprogramm der Fa. *Waters* erfasst, berechnet und können als Spektren unter Angabe der mittleren Molekulargewichte (M_w), des Zahlenmittels des Molekulargewichtes (M_n) und der Polydispersität (M_w/M_n) dargestellt werden.

4.2.6 Chemische Analyse der Holzfasern

Die quantitative Bestimmung des Hemicellulose-, Extraktstoff- und Ligningehaltes erfolgt an nativen Holzfasern und an Holzfasern, die als Kontrollproben im reinen McIlvaine Puffer (pH 6,0) behandelt wurden, sowie an Holzfasern, die mit Laccase und dem Laccase-Mediator-System inkubiert wurden. Der Cellulosegehalt der Fasern wird mittels der gewonnenen Analyseergebnisse rechnerisch ermittelt, indem die Analyseergebnisse von 100 % an Gesamtbestandteilen im Holz abgezogen werden. Die Laccase behandelten Holzfasern werden mit einer Laccasekonzentration von 200 U/ml und die Laccase-Mediator behandelten Fasern mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA im McIlvaine Puffer (pH 6,0)

inkubiert. Die 2-stündige Inkubation erfolgt mit jeweils 5 g Holzfasern in 150 ml Gesamtpufferlösung (ohne oder mit Laccase bzw. Laccase und Mediator) im Schüttelwasserbad bei 45 °C. Nach der Inkubation werden die Holzfasern von der Inkubationslösung getrennt, mit bidestilliertem Wasser ausgewaschen und für die chemischen Untersuchungen bei 103 °C im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Die Weiterbehandlung der Holzfasern ist den im Folgenden beschriebenen chemischen Analysemethoden zu entnehmen.

4.2.6.1 Hemicellulosegehalt mittels Pentosanbestimmung

Zur Quantifizierung der Hemicellulose bedient man sich der Reaktion, dass beim Erhitzen und der anschließenden Dehydration von Pentosan und pentosanhaltigen Materialien mit Säuren Furfurol entsteht. Das Furfurol wird anschließend quantitativ mit dem Spectrophotometer *Beckmann Coulter DU 800* bestimmt und deren Konzentration mit Hilfe einer Eichreihe festgelegt. Mit den Werten der Furfurol-Konzentration werden mit entsprechender Formel (Formel 5) die Pentosanwerte ausgerechnet. Ausgehend davon, dass die Pentosangehalte anteilig an der Hemicellulose bei Kiefer 56 % ausmachen, gelangt man zu den Hemicellulosegehalten (HÄGGLUND 1939). Zur Bestimmung wurde die Apparatur nach JAYME und NEUHOF (JAYME und BÜTTEL 1968) verwendet. Der Versuch zur Pentosanbestimmung läuft wie folgt ab:

Nach dem Einwiegen von 2 g atro Fasermaterial (unbehandelt oder behandelt) in einen 500 ml fassenden Rundkolben werden 200 ml 3,2 N Bromwasserstoffsäure hinzu gegeben. Der Rundkolben wird in einen Heizpilz gestellt. Ein Tropftrichter wird auf den Kolben gesetzt. Der Tropftrichter ist über eine Glasröhre mit einem Kugelhühler verbunden, welcher nach unten geöffnet das Destillat entlässt. Das Kühlwasser wird noch vor dem Beheizen des Kolbens angestellt. Wenn 90 ml der Flüssigkeit abdestilliert sind, werden über den Tropftrichter 90 ml bidestilliertes Wasser in den Rundkolben geleitet. Sind im weiteren Verlauf 180 ml Flüssigkeit abdestilliert, werden in den Kolben 60 ml bidestilliertes Wasser eingelassen. Sind insgesamt 240 ml Destillat vorhanden ist der Vorgang beendet. Anschließend wird das Destillat mit bidestilliertem Wasser in einem geeichten Messkolben auf 250 ml aufgefüllt. Aus diesem Kolben werden je 5 ml in 100 ml fassende Messkolben pipettiert, die mit bidestilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 ml aufgefüllt werden, was einer Verdünnung von 1:20 entspricht.

Mit Hilfe des *Beckmann Coulter* Spectrophotometers (siehe Kapitel 4.1.8) wird aus diesen Verdünnungen der Pentosengehalt bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Eine zuvor erstellte Eichkurve dient dazu, aus der Extinktion direkt auf die Pentosankonzentration zu schließen (Formel 5).

Formel 5: Berechnung des Pentosangehaltes

$$x = 0,03438 * \frac{c}{0,878 * m} * 100$$

x = Pentosengehalt [%]

c = Furfurolkonzentration des Destillates
[mg/l]

m = Masse der Probe [g atro]

4.2.6.2 Bestimmung des Ligningehalts

Die quantitative Bestimmung des Ligningehalts wird nach Verfahren von DENCE (1992) durchgeführt, welches von EURING und MÜLLER (unveröffentlicht) modifiziert wurde. Die nativen sowie die zuvor unterschiedlich inkubierten Holzfasern (vgl. Kapitel 4.2.6) werden zunächst separat in einer Kugelmühle der Firma *Retsch* zermahlen. Die Holzmehle werden in einer Soxhletapparatur mit Cyclohexan und Ethanol (2:1, [V/V]) extrahiert und anschließend mindestens einen halben Tag lang bei 60 °C im Vakuumschrank getrocknet. Nach dem Abwiegen von jeweils 5 mg bis 10 mg Holzmehl in verschließbare Erlenmeyerkolben (Größe 100 ml) werden 4,8 ml Acetylbromid (25 % [v/v] in Essigsäure), sowie 0,2 ml Perchlorsäure (70 %) zugegeben und die Kolben leicht verschlossen. Die Lösungen werden für 30 Minuten bei 70 °C aufbewahrt und währenddessen alle 5 Minuten leicht geschüttelt. Anschließend werden die Kolben 3 Minuten auf Eis gekühlt. Innerhalb der nächsten 10 Minuten müssen 10 ml 2 molare NaOH-Lösung hinzugegeben werden. Nach weiteren 10 Minuten werden 25 ml Eisessig zugefüllt und die Kolben für 20 Minuten in ein 20° C warmes Wasserbad gestellt. Es folgt die Entnahme von je 2 ml Lösung in Probenröhrchen und die zweiminütige Zentrifugation bei 10000 rpm und 20 °C in einer *Eppendorf* Zentrifuge *5415 R*. Der Überstand der Lösungen wird abpipettiert und in dem *Beckmann Coulter* Spectrophotometer (siehe Kapitel 4.1.8) bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Letztlich können die Ligningehalte durch Einbeziehen der photometrischen Messergebnisse mittels einer Berechnungsformel von DENCE (1992) ermittelt werden (Formel 6).

Formel 6: Berechnung des Ligningehalts nach DENCE (1992)

Lignin [%] = 100 * (A_s - A_b) * V/a * W
A _s , A _b = Absorption Probe, Absorption Blindprobe
V = Volumen Lösung [l]
a = Standardabsorptionsvermögen von Lignin (nach IDJAMA und WALLIS, 1988 für Weich- und Hartholz 20,09 g ⁻¹ cm ⁻¹)
W = Einwaage Probe [g]

4.2.6.3 Bestimmung des Extraktstoffgehalts

Die Extraktstoffbestimmung wird nach dem Tappi Standard T 204 om 88 (1988) durchgeführt. Bevor die Extraktgehalte der unterschiedlich behandelten Holzfasern bestimmt werden können, werden sie in der *Retsch* Kugelmühle zermahlen. Die Extraktion erfolgt zweistufig in einer Soxhlet-Extraktionsapparatur:

a) Extraktion mit Cyclohexan (C₆H₁₂, zur Analyse) + Ethanol (C₂H₅OH, vergällt, 97%)

In den Soxhlet-Extraktor werden etwa 2 g lutro Holzmehl, welches sich in einer Extraktionshülse (Cellulosehülle) befindet, gegeben. In einen konstant gewogenen Kolben werden 150 ml Lösungsmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethanol in einem Mischungsverhältnis von 2:1 (V:V) gefüllt, mit welchem sechs Stunden extrahiert wird (FENGEL & PRZYKLENK, 1983 sowie TAPPI Test Methods T 204 om 88, 1988). Anschließend wird der aus dem Holzmehl gelöste Extraktstoff im Kolben am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft. Der Kolben wird nach einer 24-stündigen Trocknung in einem Vakuumexsikkator konstant gewogen.

Die Extraktstoffgehalte werden wie folgt berechnet (Formel 7):

Formel 7: Berechnung des Extraktgehalts

Extraktgehalt [%] = Extrakt-Auswaage [g] / atro-Einwaage [g] * 100
--

b) Extraktion mit Ethanol (C_2H_5OH , vergällt, 97%)

Das bereits mit Cyclohexan/Ethanol extrahierte Holzmehl wird zusätzlich 4 Stunden mit etwa 150 ml Ethanol weiter extrahiert, um möglichst viele Extraktstoffe aus dem Holz zu lösen. Nach diesem Vorgang wird der im Lösungsmittel befindliche Extraktstoff in den Kolben gegeben, in denen sich bereits die Extraktstoffe aus der Cyclohexan und Ethanol-Extraktion befinden. Nach der Destillation am Rotationsverdampfer wird der Kolben erneut konstant gewogen. Es folgt erneut die Berechnung der Extraktgehalte (siehe Formel 7), indem die Ausbeute beider Extraktionsstufen gravimetrisch bestimmt und aufaddiert den Extraktstoffgehalt bezogen auf die Einwaage Holzmehl ergibt.

4.2.7 Untersuchung der Holzfasern mittels Rasterelektronenmikroskop (REM)

Die für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen benötigten Holzfasern werden direkt bei dem Herstellungsprozess in der Pilotanlage der Fa. *BINOS* (Kapitel 4.1.9.2) entnommen. Der Zeitpunkt der Probennahme ist jener, wenn die Fasern nach 2 Stunden Inkubationszeit und der anschließenden Trocknung als Faservlies auf das Formband gestreut werden, um zu MDF-Platten verpresst zu werden. Dabei wird nur eine geringe Menge an einzelnen Fasern für die Präparation der REM-Proben benötigt. Als Kontrollproben dienen folgend behandelte Holzfasern:

- Native Holzfasern, völlig unbehandelt aus den aufgelockerten Fasern entnommen
- Native Holzfasern, die mit McIlvaine Puffer (pH 6,0) besprüht und im Faserbunker 2 Stunden „inkubiert“ werden

Da ein gezieltes Spektrum an Laccase und Laccase Mediator behandelten Holzfasern untersucht werden soll, werden folgende Laccase- und Mediatorkonzentrationen ausgewählt. Alle behandelten Holzfasern werden im Mischer mit Laccase bzw. Laccase-Mediator Puffergemisch besprüht und für 2 Stunden im Faserbunker inkubiert:

- mit 100 U/ml Laccase behandelte Holzfasern
- mit 100 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA behandelte Holzfasern
- mit 200 U/ml Laccase behandelte Holzfasern
- mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA behandelte Holzfasern

Alle entnommenen Fasern werden mit bidestilliertem Wasser ausgewaschen, um auszuschließen, dass bei der Aufnahme der REM-Spektren Reste aus der Sprühinkubationslösung (Puffer, Laccase, Mediator) auf der Holzfaseroberfläche haften bleiben. Nach dem Auswaschen der Fasern werden diese in einen Vakuumtrockenschrank bei 105 °C überführt und etwa 12 Stunden getrocknet.

Die Untersuchungen der Holzfasern werden mit dem Rasterelektronenmikroskop Typ EM 515 der Firma *Philips* durchgeführt. Hierzu müssen die Fasern auf kleine Probenteller aufgeklebt werden. Die Fasern müssen dabei möglichst einzeln auf die Probenteller geklebt werden. Die Fasern dürfen nicht über den Rand herausragen und müssen gegebenenfalls gekürzt werden.

Nach dem Aufkleben der Holzfasern erfolgt das Bedampfen der Proben mit Gold. Das hierzu verwendete Gerät ist der Sputter *Emscope Sc 500*, das die Proben unter Vakuum mit einer Goldschicht von 40 nm bis 50 nm überzieht.

Anschließend können die Proben im Rasterelektronenmikroskop analysiert werden. Die jeweiligen Vergrößerungen sind im Ergebnisteil (Kapitel 5.6) angegeben.

4.2.8 Phenolische Hydroxyl-Gruppen Laccase inkubierter Holzfasern

Zur Bestimmung des Gehaltes phenolischer Hydroxyl-Gruppen in der Fasersuspension werden 5 g Holzfasern in einem Laccase-Puffergemisch (McIlvaine-Puffer) bzw. in einem Laccase-Mediator-Puffergemisch (150 ml Gesamtvolumen) im Wasserbad bei 45 °C unter Schütteln 24 Stunden lang inkubiert. Die Kontrollprobe beinhaltet lediglich die Holzfasern und den McIlvaine Puffer. Die Laccasekonzentrationen betragen 50 U/ml, 100 U/ml und 200 U/ml. Es werden für die gleichen Laccasekonzentrationen Proben mit zusätzlich jeweils 10 mM Mediator 4-Hydroxybenzoesäure (HBA) inkubiert. Zur Bildung einer Zeitreihe werden aus den Probengefäßen stündlich von 0 bis 8 Stunden etwa 2 ml der Suspension entnommen. Eine letzte Probennahme erfolgt nach 24 Stunden. Die Suspensionen werden bei 13200 U/min (Eppendorf Zentrifuge) zentrifugiert. Der Gehalt des Überstandes an phenolischen Hydroxyl-Gruppen wird bei einer Wellenlänge von 280 nm mittels *Beckmann Coulter* Spectrophotometer photometrisch bestimmt.

4.2.9 Bestimmung freier Radikale auf der Oberfläche der Holzfasern mittels Elektronenspin Resonanz Spektroskopie (ESR)

Mit der Elektronenspin Resonanz-Spektroskopie soll die Bildung freier phenolischer Radikale auf der Oberfläche der Holzfasern untersucht werden, wozu die Holzfasern zum einen nur mit Laccase und zum anderen mit dem Laccase-Mediator-System inkubiert werden. Dazu werden etwa 5 g Holzfasern in McIlvaine Puffer mit einem pH von 6,0 gegeben. Die Laccaseaktivitäten, sowie die Mediatorkonzentrationen werden hierbei variiert (z. B. 10 U/ml, 50 U/ml, 100 U/ml Laccase und 10 mM, 20 mM Mediator), um eine effektive Radikalisierung phenolischer Bindungen auf der Holzfaseroberfläche mit dem Laccase-Mediator-System zu erlangen. Die Gesamtmenge an Pufferlösung, Laccase und Mediator beträgt unabhängig von den jeweiligen Konzentrationen immer 150 ml. Die Inkubationsdauer beträgt zwei Stunden. Nach Beendigung der Inkubation wird eine geringe Menge von 0,5 bis 1 ml der jeweiligen Fasersuspensionen in spezielle Quarzröhrchen pipettiert. Bis zur Messung werden die befüllten Röhrchen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt, um zu gewährleisten, dass die Enzymreaktion gestoppt wird. Die Spektren werden dann bei einer Temperatur von -196 °C in einem magnetischen Feld von 500 Gauss bis 4400 Gauss aufgenommen.

Erste Messungen werden vom Institut für Biophysik des Uniklinikums-Saarland durchgeführt. Weitere Messungen erfolgen unter gleichen Messbedingungen am Institut für Anorganische Chemie der Universität Göttingen.

4.2.10 Strukturaufklärung der inkubierten Holzfasern mittels Nuclear-Magnetic-Resonance Spektroskopie (NMR)

Die eindimensionale NMR-Spektroskopie ist die am häufigsten angewandte Strukturaufklärungsmethode der Chemie. Bei ihr wird die chemische Verschiebung eines Atoms von einer Referenzsubstanz gemessen. ^1H und ^{13}C sind die Kerne, die am häufigsten in der organischen Chemie gemessen werden. Es gibt die Möglichkeit, sowohl Festkörper als auch fluide Lösungen zu analysieren (zwei verschiedene Messprinzipien).

Für die inkubierten Holzfasern wird die ^{13}C -NMR-Spektroskopie angewandt, um die Holzbestandteile vor und nach der Behandlung zu charakterisieren. Für die Analyse der Holzfasern ist die Festkörpermessung relevant.

Während der Dissertation werden Festkörpermessungen am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt.

Die Probenvorbereitung gestaltet sich wie folgt:

5 g Holzfasern und McIlvaine Puffer (pH 6,0) werden für 2 h bei 45 °C unter Schütteln im Wasserbad inkubiert. In die Pufferlösung wird je nach gewünschter Konzentration Laccase oder Laccase (z. B. 100 U/ml, 200 U/ml) und Mediator (z. B. 10 mM, 20 mM) gegeben. Nach der Inkubationszeit erfolgt eine Waschung der Holzfasern mit bidestilliertem Wasser und eine 12-stündige Trocknung der Fasern bei 105 °C im Vakuumtrockenschrank, womit ein fortdauerndes Inkubieren unterbunden werden kann. Nach der Trocknungsphase werden die Fasern zur Messung mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie verwendet.

4.2.11 Fourier-Transform-Infrared Spektroskopie (FTIR)

Mit Hilfe der Fourier-Transform-Infrarot-(FTIR)-Spektroskopie wird eine Strukturaufklärung der Holzproben vor und nach dem Pilzbefall durchgeführt. Die funktionellen Gruppen bzw. Struktureinheiten des Holzes zeigen charakteristische Schwingungen, die bestimmten Absorptionsbanden im FTIR-Spektrum zugeordnet werden können. Vor der Aufnahme der Spektren werden die Proben wie folgt vorbereitet:

Wie bei den morphologischen Untersuchungen der Holzfasern mittels Rasterelektronenmikroskop (Kapitel 4.2.7) werden alle Fasern aus dem Produktionsprozess an der MDF-Pilotanlage entnommen, nachdem die Holzfasern 2 Stunden lang im Faserbunker inkubiert, anschließend getrocknet und als Faservlies auf das Formband gestreut wurden, um zu MDF-Platten verpresst zu werden. Für die FTIR-Messungen sind lediglich etwa 2 g bis 3 g Fasermaterial notwendig.

Um ein möglichst weites Spektrum der Laccase und Laccase-Mediator behandelten Holzfasern abzudecken, werden folgende Laccase- und Mediatorkonzentrationen gewählt:

- mit 100 U/ml Laccase im McIlvaine Puffer behandelte Holzfasern
- mit 100 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA behandelte Holzfasern
- mit 100 U/ml Laccase und 20 mM Mediator HBA behandelte Holzfasern
- mit 200 U/ml Laccase im McIlvaine Puffer behandelte Holzfasern
- mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA behandelte Holzfasern
- mit 200 U/ml Laccase und 20 mM Mediator HBA behandelte Holzfasern

Als Kontrollproben werden verwendet:

- native Holzfasern, unbehandelt, direkt von den aufgelockerten Fasern entnommen
- mit McIlvaine Puffer (pH 6,0) behandelte Holzfasern, 2 Stunden „inkubiert“

Anschließend werden alle Holzfasernproben mit bidestilliertem Wasser ausgewaschen und für etwa 12 Stunden im Vakuumtrockenschrank bei 105 °C getrocknet.

Da zur Messung der FTIR-Spektren möglichst homogene Proben benötigt werden, müssen die getrockneten Holzfasern gemahlen werden. Dies geschieht mit einer *Retsch* Kugelmühle. Anschließend wird das Holzpulver mit dem mit dem FTIR Spektrometer *Equinox 55* von der Firma *Bruker Optics*, Ettlingen aufgenommen (siehe Kapitel 5.8.1). Dazu werden die Holzproben auf ein in dem FTIR-Gerät befindlichen Kaliumbromid-(KBr)-Fenster mit 2 mm Durchmesser platziert. Das Pulver wird mit Hilfe einer Spatelspitze über dem KBr-Fenster gleichmäßig verteilt. Die Schwingungsbereiche werden durch 32 Scanvorgänge bei einer Strahlung im mittleren Infrarotbereich (4000 cm^{-1} bis 400 cm^{-1}) aufgenommen und als Absorptionsbanden (angegeben in Wellenzahlen [cm^{-1}]) im FTIR-Computerauswertungsprogramm namens OPUS 5.5 dargestellt. Jede Holzprobe wird zwecks Bildung eines mittleren FTIR-Spektrums mehrfach über dem KBr- Fenster vermischt und neu aufgenommen.

Die charakteristischen Banden werden nach einer Vektornormierung und Grundlinienkorrektur funktionellen Gruppen bzw. Struktureinheiten zugeordnet. Da die für die Lignin charakteristischen Schwingungsbereiche in dem Bereich 1800 cm^{-1} bis 850 cm^{-1} liegen, wird dieser Bereich zum Vergleich der verschieden behandelten Holzproben hervorgehoben, gesondert beschrieben und diskutiert.

4.2.12 Herstellung Laccase und Laccase-Mediator gebundener Holzfasern-Dämmplatten

Zur Herstellung der enzymatisch gebundenen Dämmplatten werden im Inkubationsreaktor (siehe Kapitel 4.1.9.1) 500 g Holzfasern zwei Stunden lang mit einer 25 l Pufferlösung inkubiert. Die Pufferlösung besteht aus McIlvaine Puffer (pH 6,0) und einer gewünschten Laccase- bzw. Laccase-Mediorkonzentration (vgl. Kapitel 3.8.2). Somit beträgt die Stoffkonzentration 2 %, unter welcher man das Verhältnis von Fasermasse zur Masse des Schwebemediums versteht (LAMPERT 1967). Die Inkubationslösung wird durch den Heizstab des Inkubationsreaktors auf 45 °C erwärmt. Ein Rührwerk durchmischt die Lösung während

der gesamten Inkubationszeit. Die in dem Ergebnisteil (Kapitel 5.11) beschriebenen Dämmplatten sind mit einer Laccasekonzentration von 200 U/ml und einer Mediatorkonzentration von 10 mM Mediator HBA hergestellt. Für die Kontrollplatten werden die Holzfasern lediglich im McIlvaine Puffer (pH 6,0) „inkubiert“.

Nach der Inkubationszeit erfolgt das Überführen der Inkubationslösung in die Gießform (siehe Kapitel 4.1.9.1), wo die inkubierten Fasern aufgefangen durch ein Sieb durch Sogwirkung entwässert werden. Die Dämmplattenlänge und -breite beträgt 500 mm x 300 mm, bei einer Einwaage von 500 g Holzfasern liegt die Plattenhöhe bei 20 mm. Anschließend wird das Faservlies aus dem Gießkasten entnommen, zwischen zwei Aluminiumbleche gelegt und in der *Becker & van Huellen* Presse bei 100 bar zwei Minuten lang kalt gepresst. Durch diesen Vorgang wird das Faservlies nochmals entwässert, da die Faserfeuchten noch weit über 200 % liegen. Das Vlies wird nach dem Kaltpressen gewogen und dessen Feuchte bestimmt. Liegt diese bei etwa 120 % erfolgt eine 10-minütige Mikrowellentrocknung bei 1850 Watt. Beträgt die Faserfeuchte mehr als 120 % muss der Kaltpressvorgang vor der Trocknung wiederholt werden. Nach der ersten Mikrowellentrocknung wird erneut gewogen und die Faserfeuchte bestimmt. Dieser Vorgang wird solange wiederholt bis eine Zielfeuchte von 8 % bis 10 % erreicht ist.

Die Dämmplatten werden in Probenkörper zugeschnitten, die zur Bestimmung der Platteneigenschaften Rohdichte, Wasseraufnahme, Dickenquellung, Querkzugfestigkeit und Ausgleichsfeuchte (Gleichgewichtsfeuchte) dienen. Die Probenkörper werden anschließend bei 20 °C und 65 % relativer Luftfeuchte mehrere Tage konditioniert.

Gepprüft werden die Platten auf ihre Querkzugfestigkeit in Anlehnung an EN 1607 (1996) und auf ihre Dickenquellung in Anlehnung an EN 317 (2003). Die Bestimmung ihrer Dichte erfolgt nach der EN 1602 (1997), die Bestimmung der Wasseraufnahme bei kurzzeitigem teilweisen Eintauchen nach der EN 1609 (1997).

Zusätzlich zu den mit Enzymsuspension gebundenen Platten werden zum Vergleich im selben Herstellungsverfahren Dämmstoffplatten mit Kartoffel-Stärke hergestellt. Eine Inkubationszeit ist dazu nicht notwendig.

4.2.13 Herstellung Laccase und Laccase-Mediator gebundener MDF – Platten

Der Herstellungsprozess der MDF-Platten findet an der *BINOS* Pilotanlage der Arbeitsgruppe Chemie und Verfahrenstechnik von Verbundwerkstoffen, Büsgen-Institut der Universität Göttingen statt (vgl. Kapitel 4.1.9.2). Nach der Berechnung (siehe Beispielrechnung Abbildung 14) der benötigten Menge an Laccase bzw. Laccase-Mediator Puffergemisch

werden die Holzfasern mit der Inkubationslösung im Mischer besprüht und im Faserbunker der Anlage eine bestimmte Zeit lang bei Zimmertemperatur (zwischen 20 und 24 °C) inkubiert. Es handelt sich um das Sprühinkubationsverfahren, welches im herkömmlichen Sinne als Trockenverfahren bekannt ist (vgl. Kapitel 3.6.1 und 3.8.1).

In dieser Arbeit werden zwei Varianten der Sprühinkubation angewandt. Die erste Variante ist die 50 % : 50 % Besprühung, bei der die Inkubationslösung in zwei Besprühungsdurchgängen auf die Fasern aufgetragen wird. Dazu muss der Besprühungsvorgang im Mischer wiederholt werden. Die zweite Variante ist die 100 % Besprühung. Bei dieser Methode wird die gesamte Menge an Inkubationslösung in einem Durchgang auf die Fasern aufgetragen. Durch diese zwei Besprühungsarten soll herausgefunden werden, welche sich zur besseren Besprühung der Fasern mit der Inkubationslösung eignet und ob sich Auswirkungen auf die Plattenqualität bemerkbar machen können. Nach der Inkubation wird das Fasermaterial erneut durch den Mischer geleitet und in der Rohrtrocknungsanlage bei 80 °C bis 100 °C von etwa 50 % bis 75 % auf etwa 10 % bis 14 % Feuchte heruntergetrocknet (siehe Kapitel 3.8.1, FELBY et al., 2002). Es folgen die Rückführung der getrockneten Fasern in den Faserbunker und das Streuen des so genannten Faservlieses auf das Formband. Von dort aus wird das Vlies entnommen und in die Heißpresse überführt.

In einer weiteren Untersuchung werden die Holzfasern zwar mit einem Laccase bzw. Laccase-Mediator Puffergemisch besprüht, jedoch werden die Fasern unmittelbar nach dem Besprühen im Mischer durch die Rohrtrocknungsanlage auf 10 % bis 14 % Feuchte getrocknet. Die Trocknungstemperatur beträgt dabei 100 °C bis 120 °C. Bei dieser Methode bleibt zur Inkubation bleibt nur sehr wenig Zeit (< 2 Minuten). Nach der Trocknung erfolgt das Streuen zum Faservlies und das Verpressen zu MDF-Platten. Eine Inkubation der Fasern im Bunker, sowie der anschließende, erneute Transport des Fasermaterials durch die gesamte MDF-Anlage entfällt.

Ein Hydrophobierungsmittel kommt bei der Herstellung der MDF-Platten nicht zum Einsatz.

Zur Optimierung der Herstellungsparameter wird beim Verpressen die Presstemperatur und die Pressdauer variiert. Entsprechende Ergebnisse befinden sich im Ergebnisteil (siehe Kapitel 5.12). Weiterhin werden die Platteneigenschaften Rohdichte und Plattenstärke variiert, um für die weitere Herstellung der Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen Platten eine geeignete Rohdichte und Plattenstärke zu erhalten, bei der die mechanisch-technologischen Eigenschaften am höchsten sind (vgl. Kapitel 5.12).

Alle hergestellten Faserplatten werden nach einer Abkühlphase (mindestens 4 Stunden) geschliffen und zurechtgeschnitten, um nach den mechanisch-technologischen Eigenschaftstest nach den EN-Normen 310, 317 und 319 (siehe Kapitel 4.1.10) überprüft zu werden. Die Überprüfung der Biege- und Querkzugfestigkeiten findet an der *Zwick-Roell*-Prüfmaschine statt (siehe Kapitel 4.1.11), eine Überprüfung der Rohdichten mittels des

Rohdichteprofilmessgrätes DA-X von *GreCon* (siehe Kapitel 4.1.11). Die Dickenquellwerte nach 24 h Wasserlagerung werden gemäß der Beschreibung in Kapitel 4.1.10.2 ermittelt.

Alle in dieser Dissertation nach verschiedenen Herstellungsparametern hergestellten MDF-Platten werden mindestens zweimal reproduziert. Bei der Herstellung der Kontrollplatten werden Holzfasern grundsätzlich nur mit McIlvaine Puffer besprüht und für die gleiche Zeit, wie die Inkubationsdauer, behandelt.

In der folgenden Abbildung (14) ist eine Beispielrechnung des Laccase bzw. Laccase-Mediator Puffergemisches aufgeführt.

Laccase- und Mediatorkonzentrationsberechnung zur Herstellung einer MDF-Platte mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA

Mittels ABTS-Test gemessene Laccaseaktivität: 1988 U/ml

Benötigte Menge an Inkubationslösung für 15 kg Holzfasern: 15 l (= 15000 ml)

Laccasekonzentrationsberechnung:

$$\frac{\text{gemessene Laccaseaktivität [U/ml]}}{\text{Laccaseaktivität in der Inkubationslösung [U/ml]}} = \frac{1988 \text{ U/ml}}{200 \text{ U/ml}} = 9,94 \text{ (Faktor)}$$

Somit ist dem Puffer Laccase im Verhältnis 1 : 9,94 beizumischen.

Bei 15 l bzw. 15000 ml Gesamtvolumen bedeutet dies:

$$\frac{\text{Gesamtvolumen der Inkubationslösung [ml]}}{\text{Laccaseanteil}} = \frac{15000 \text{ ml}}{9,94} = 1509,1 \text{ ml}$$

Die Inkubationslösung setzt sich wie folgt zusammen:

benötigter McIlvaine Puffer : 15000 ml – 1509,1 ml = 13490,9 ml

Laccase: 1509,1 ml

Für die Zugabe von 10 mM Mediator HBA werden berechnet:

Molare Masse von 4-Hydroxybenzoesäure: 138,125 g/mol entsprechen 138,125 mg/mmol, bei einer 10 mM Lösung an HBA bedeutet dies: 138,125 mg/mmol * 10 mmol/l = 1381,25 mg/l = 1,38125 g/l

Bei 15 l Gesamtvolumen sind dies: 1,38125 g/l * 15 l = 20,72 g

Somit werden noch 20,72 g HBA in die Inkubationslösung hinzugegeben. Das HBA sollte zuvor in einem Teil des Puffers gelöst werden. Die Löslichkeit von HBA in Wasser beträgt 8 g/l.

Abb. 14: Berechnung der Laccase und Mediatorkonzentrationen zur Herstellung von Laccase und Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten.

Zur besseren Verdeutlichung werden alle die in dieser Arbeit hergestellten Plattenvarianten und deren wichtigsten Herstellungsparameter tabellarisch dargestellt (Tabelle 6):

Tab. 6: Herstellungsparameter und Zusammensetzung der MDF-Platten

Zusammensetzung der MDF-Platten	Plattenvariante (Kürzel)	Besprühungsarten [%]	Inkubationszeiten [Min.]	Rohdichten [kg/m ³]	Plattendicken [mm]	Presstemperaturen [°C]	Presszeiten [Min.]
Kontrolle, Holzfasern mit Puffer besprüht	κ	50 : 50, 100	120	800	8, 10	190, 200, 210	3, 4, 5, 6
		100	30	600, 700, 800	8	200	3, 4, 5, 6
		100	< 2	800	8	200	5
Holzfasern mit Laccase Puffergemisch besprüht: 100 U/ml Laccase	L 100	50 : 50, 100	120	800	8,10	190, 200, 210	3, 4, 5, 6
		100	30	600, 700, 800	8	200	3, 4, 5, 6
Holzfasern mit Laccase-Mediator Puffergemisch besprüht: 100 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA	L 100 + HBA 10	50:50, 100	120	800	8,10	190, 200, 210	3, 4, 5, 6
		100	30	600, 700,800	8	200	3, 4, 5, 6
Holzfasern mit Laccase-Mediator Puffergemisch besprüht: 100 U/ml Laccase und 20 mM Mediator HBA	L 100 + HBA 20	50:50, 100	120	800	8	200	3, 4, 5, 6
		100	30	800	8	200	3, 4, 5, 6
Holzfasern mit Laccase Puffergemisch besprüht: 200 U/ml Laccase	L 200	50 : 50, 100	120	800	8	200	3, 4, 5, 6
		100	30	800	8	200	3, 4, 5, 6
		100	< 2	800	8	200	5
Holzfasern mit Laccase-Mediator Puffergemisch besprüht: 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA	L 200 + HBA 10	50 : 50, 100	120	800	8	200	3, 4, 5, 6
		100	30	800	8	200	3, 4, 5, 6
		100	< 2	800	8	200	5
Holzfasern mit Laccase-Mediator Puffergemisch besprüht: 200 U/ml Laccase und 20 mM Mediator HBA	L 200 + HBA 20	50:50, 100	120	800	8	200	3, 4, 5, 6
		100	30	800	8	200	3, 4, 5, 6

Bemerkungen zu Tabelle 6:

1. Für jede einzelne Plattenvariante werden zu den variierenden Herstellungsparametern je etwa 6 MDF-Platten hergestellt. Darüber hinaus werden alle Plattenvarianten mindestens zweimal reproduziert, um gesicherte Aussagen über die mechanisch technologischen Eigenschaften treffen zu können.

2. Die Bezeichnung „Besprühungsart 50 % : 50 %“ beinhaltet, dass zunächst nur die Hälfte der Inkubationslösung auf die gesamten Fasern gesprüht wird und in einen zweiten Besprühungsschritt die andere Hälfte (bei z. B. 15 l Inkubationslösung zunächst 7,5 l auf 15 kg Fasern, anschließend nochmals 7,5 l auf 15 kg Fasern). Das bedeutet, dass die Fasern zum Besprühen zweimal durch die Pilotanlage gefahren werden müssen, was einen höheren Zeitaufwand mit sich bringt. Bei der Besprühungsart 100 % wird sofort die gesamte Inkubationslösung auf die Fasern gesprüht (in einem Schritt z. B. 15 l Inkubationslösung auf 15 kg Fasern). Die Fasern werden zum Inkubieren in den Faserbunker befördert, wonach die Trocknung, das Streuen des Faservlieses und die Herstellung der MDF-Platten erfolgt.
3. Bei einer Inkubationszeit von wenigen Minuten (< 2 Min.) werden die Fasern direkt nach dem Besprühen im Mischer durch die Rohrtrocknungsanlage auf 10 % bis 14 % Faserfeuchte (FELBY et al., 2002) getrocknet und als Faservlies gestreut, wonach sie unmittelbar zu MDF-Platten verpresst werden. Bei den Inkubationszeiten 30 Minuten und 120 Minuten werden die Fasern nicht sofort getrocknet, sondern in Faserbunker befördert, wo sie die vorgegebene Zeit lang inkubieren. Danach erfolgt die Trocknung in der Rohrtrocknungsanlage, das Streuen zu einem Faservlies und die anschließende Verpressung zu MDF-Platten.

Zur Verdeutlichung der aufgeführten Plattenvarianten (Tabelle 6) soll anhand einer Plattenvariante beschrieben werden, welche Herstellungsprozesse stattfinden. So werden die Holzfasern der Plattenvariante L 200 + HBA 10 im Mischer der Pilotanlage der Fa. *BINOS* mit einem Laccase-Mediator Puffergemisch aus McIlvaine Puffer (pH 6,0) mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA besprüht und im Faserbunker für eine Variante 2 Stunden lang inkubiert, für eine andere Variante 30 Minuten lang. Bei einer Inkubationszeit von wenigen Minuten (< 2 Minuten) sind die Fasern unmittelbar nach dem Besprühen getrocknet und weiterverarbeitet worden. Die Besprühungsarten vor der Inkubation der Fasern sind 50 % : 50 % und 100 % für 120 Minuten, 100 % für 30 Minuten und < 2 Minuten. Die Rohdichte für alle L 200 + HBA 10 Platten soll 800 kg/m^3 betragen. Andere Plattenvarianten werden zusätzlich mit Rohdichten von 600 kg/m^3 und 700 kg/m^3 hergestellt und getestet. Die Plattendicke der L 200 + HBA 10 Platten liegt bei 8 mm. Bei anderen Plattenvarianten werden teilweise zusätzlich auch 10 mm starke Platten produziert, um herauszufinden, welche Stärken sich für Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundene MDF-Platten im Hinblick auf die mechanisch-technologischen Eigenschaften besser eignen. Die Presstemperatur in diesem Beispiel liegt bei $200 \text{ }^\circ\text{C}$. Weitere Presstemperaturen, die überprüft werden sind $190 \text{ }^\circ\text{C}$ und $210 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Presszeiten der L 200 + HBA 10 variieren bei den Inkubationszeiten 120 Minuten und 30 Minuten zwischen 3, 4, 5 und 6 Minuten, bei den Platten, die sehr kurz inkubiert werden, beträgt die Presszeit 5 Minuten.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Schüttelkulturen verschiedener Weißfäulepilze

Zur anfänglichen Untersuchung der Laccaseproduktion werden in Laborversuchen über mehrere Tage verschiedene Weißfäulepilze (*Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Trametes hirsuta* und *Phlebia radiata*) in Schüttelkulturen angezchtet. Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, erfolgen tägliche Laccaseaktivitätsmessungen mittels ABTS-Test nach Matsumura et al. (1986) (siehe Kapitel 4.2.1). Durch den Gebrauch von Induktoren (siehe Kapitel 4.1.6 und 4.2.2) soll die Laccaseproduktion zusätzlich gesteigert werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Laccaseaktivitätsmessungen erörtert. Sie dienen als Grundlage für weitere Untersuchungen der Weißfäulepilze beim Einsatz im 5 l Fermenter in Kapitel 5.2.

In Abbildung 15 sind die extrazellulären Laccaseaktivitäten der Weißfäulepilze *Trametes versicolor* und *Trametes villosa* dargestellt.

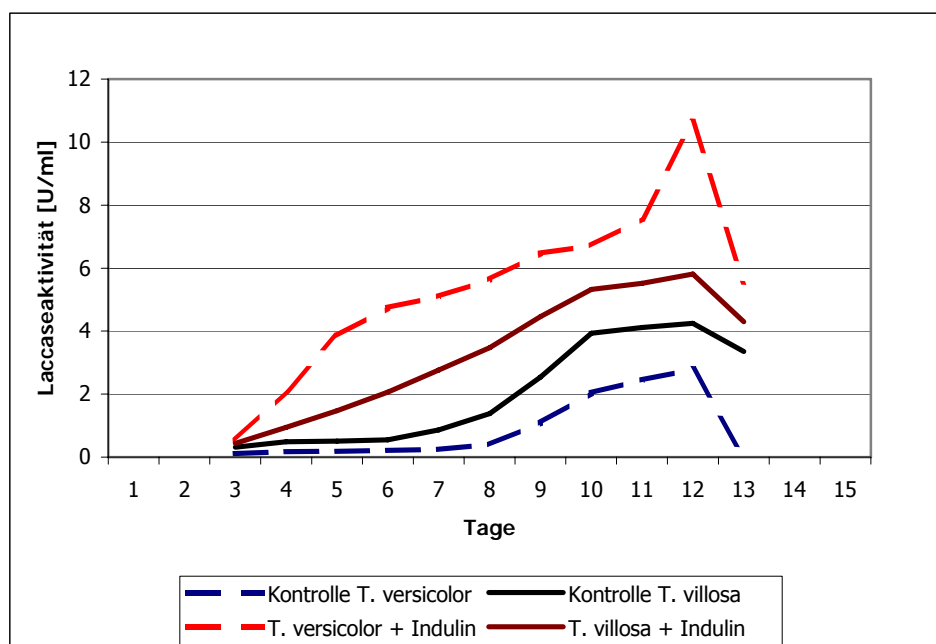


Abb. 15: Extrazelluläre Laccaseaktivitäten von *Trametes versicolor* und *Trametes villosa*

Für jeden Pilzstamm sind zwei Laccaseaktivitätskurven aufgetragen, wobei es sich bei einer um die gemittelten Werte von Kontrollproben handelt und bei der anderen um Proben, denen 1,25 mg/ml Induktor Indulin (siehe Kapitel 4.1.2.1) zugegeben wurde. Die Kontrollproben setzen sich aus dem Flüssigmedium (BSM- oder L₁ Medium, siehe Kapitel 4.1.5) und dem Pilzmycel zusammen, eine Induktorzugabe unterbleibt. Die Induktion der

anderen Proben erfolgte drei Tage nachdem die Flüssigkulturen angesetzt wurden. Zu erkennen ist, dass die Laccaseaktivitäten der Kontrollproben deutlich unter denen der induzierten Proben liegen. So erreichen *Trametes versicolor* und *Trametes villosa* mit Induktor etwa 10,5 U/ml und 6,0 U/ml, während die Kontrollen knapp 3,0 U/ml und 4,2 U/ml erreichen. Bei allen Proben ist ein ansteigender Verlauf der Kurven ersichtlich. Am Tag 12 haben alle Proben die oben genannten Maximalwerte erreicht, wonach ein Absinken der Werte erfolgt.

In zahlreichen Untersuchungen zu dem optimalen Zeitpunkt einer Induktion hat sich gezeigt, dass den oben genannten Pilzkulturen im Flüssigmedium – unabhängig von BSM oder L₁-Medium (siehe Kapitel 4.1.5.1 und 4.1.5.2) - mindestens drei Tage Zeit gegeben werden sollte, um sich auf die Grundbedingungen im Medium einzustellen (Adaption). Es wird deutlich, dass in der ersten Zeit die extrazellulären Laccaseaktivitäten in der Regel noch so niedrig sind, dass durch eine Induktion vor dem dritten Tag keine merkliche Steigerung der Aktivität hervorgerufen werden kann und sich bei einer früheren Induktion auch für die späteren Tage langsame Zunahmen und niedrigere Maximalwerte der Laccaseaktivität zeigen. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von KHARAZIPOUR (1991, 1996), SHEKOLESLAMI (1991) und KRUSENBAUM (1991). Ebenso wirken sich Induktionen, die nach mehr als drei Tagen durchgeführt werden nachteilig aus, da das Pilzwachstumsstadium weit fortgeschritten ist und sich eine Induktion nicht mehr stark bemerkbar macht.

Neben dem Induktor Indulin werden auch die Induktoren Vanillin (1,25 mg/ml) und Xylidin (6×10^{-4} mol/l) (siehe Kapitel 4.1.6.2 und 4.1.6.3) unter gleichen Versuchsbedingungen eingesetzt (Abbildung 16). Die Erhöhung der Laccaseaktivität mit beiden Induktoren ist bei allen Flüssigkulturen verhaltener als mit Indulin. Bei *Trametes versicolor* und *Trametes villosa* werden sowohl bei der Induktion mit Vanillin, als auch mit Xylidin maximale Laccaseaktivitäten von 4,5 U/ml bis 6,0 U/ml erreicht, wobei in diesem Fall bei *Trametes villosa* durch die Induktion von Xylidin (6,0 U/ml) höhere Werte erreicht werden als bei *Trametes versicolor* (5,2 U/ml). Anders ist es bei der Induktion der Flüssigkulturen mit Vanillin. Hier werden bei *Trametes versicolor* 5,5 U/ml Aktivität gemessen, bei *Trametes villosa* dagegen nur 4,5 U/ml.

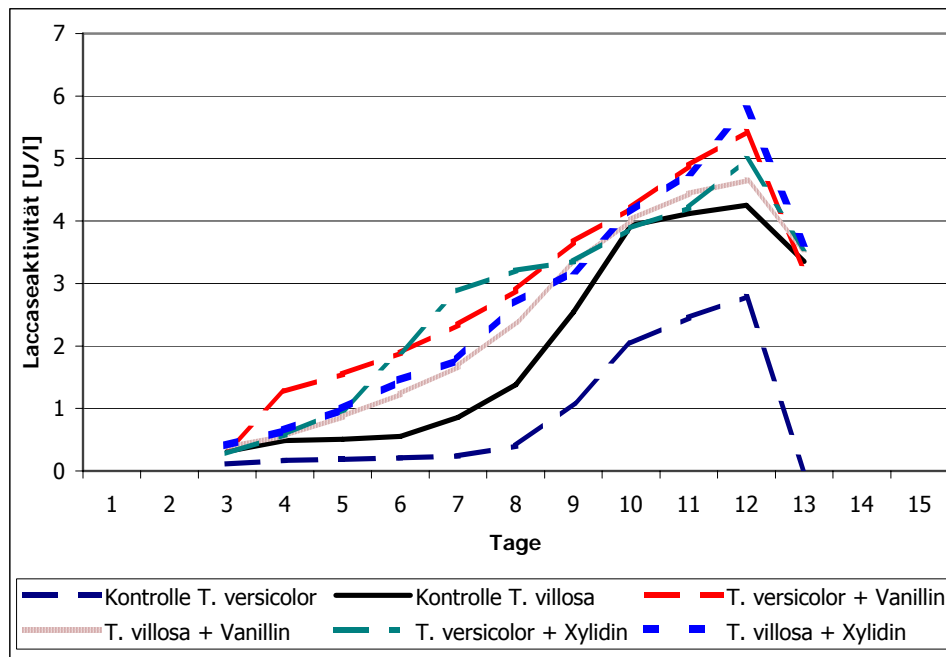


Abb. 16: Extrazelluläre Laccaseaktivitäten von *Trametes versicolor* und *Trametes villosa* induziert mit Vanillin und Xylidin

Neben den beiden Weißfäulepilzen *Trametes versicolor* und *Trametes villosa* werden auch die Pilze *Trametes hirsuta* und *Phlebia radiata* zu Untersuchungen der Laccaseaktivitäten herangezogen.

In Abbildung 17 sind die Laccaseaktivitäten der Weißfäulepilze *Trametes hirsuta* und *Phlebia radiata* aufgeführt. Wie bei *Trametes versicolor* und *Trametes villosa* sind für beide Pilze eine Aktivitätskurve für die Kontrollproben und eine für die induzierten Proben aufgetragen. Bei den Flüssigmedien handelt es sich um BSM- oder L₁-Medium. Ihr Verlauf ist im Vergleich zu denen in Abbildung 15 weniger stark ansteigend. Auch sind die Maximalwerte von 3,8 U/ml (*Trametes hirsuta* + Indulin), 2,7 U/ml (*Phlebia radiata* + Indulin), 0,8 U/ml (Kontrolle *Trametes hirsuta*) und 0,3 U/ml (Kontrolle *Phlebia radiata*) wesentlich geringer und auch zu unterschiedlicher Zeit, nämlich zwischen dem neunten und zwölften Tag, erreicht. Zwar bewirkt eine Induktion einen Laccaseaktivitätsanstieg, doch ist dieser sehr verhalten.

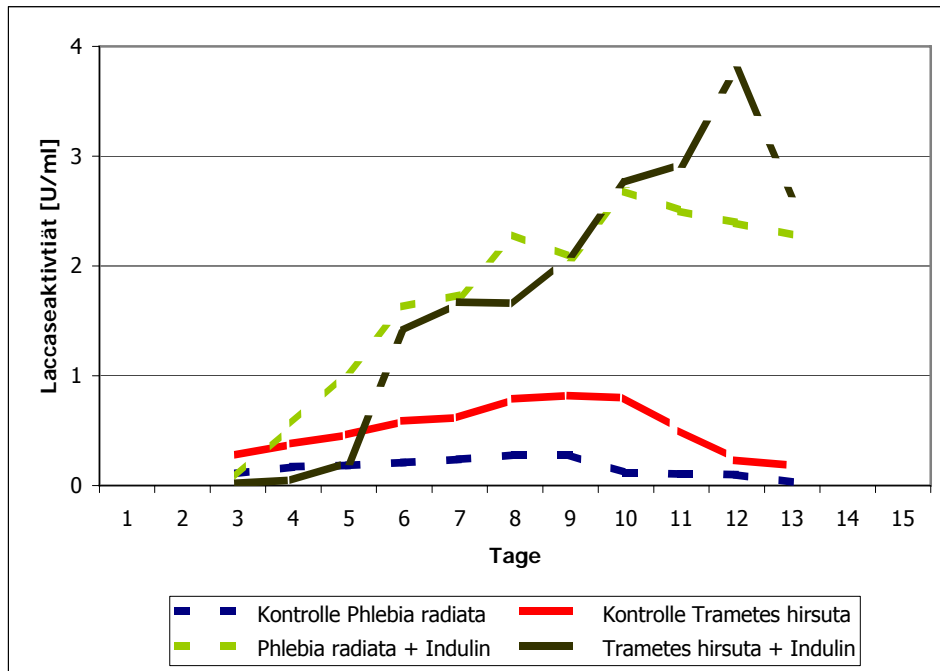


Abb. 17: Extrazelluläre Laccaseaktivitäten von *Trametes hirsuta* und *Phlebia radiata*, induziert mit Indulin

Wie bei den beiden anderen Weißfäulepilzen (*Trametes versicolor* und *Trametes villosa*) finden Untersuchungen zur Steigerung der Laccaseaktivität mit den Induktoren Vanillin und Xylidin statt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

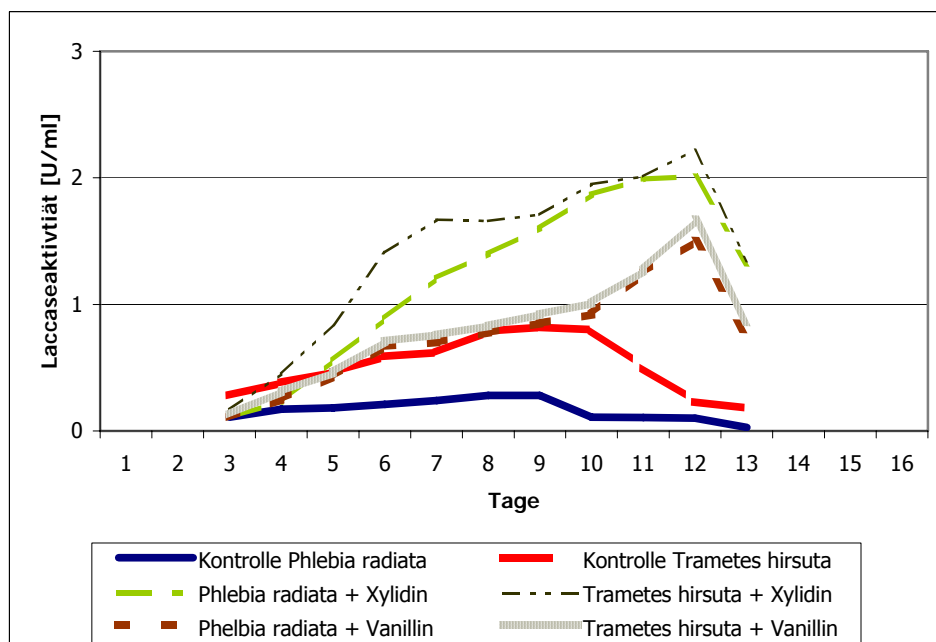


Abb. 18: Extrazelluläre Laccaseaktivitäten von *Trametes hirsuta* und *Phlebia radiata*, induziert mit Vanillin und Xylidin

Bei dem Vergleich der Laccaseaktivitäten von *Trametes hirsuta* und *Phlebia radiata* mit den Induktoren Vanillin und Xylidin fällt auf, dass die Maximalwerte deutlich unter denen liegen, die mit dem Induktor Indulin erreicht werden. Mit Vanillin werden am 12. Tag der Inkubation 1,5 U/ml (*Phlebia radiata*) 1,7 U/ml (*Trametes hirsuta*) erreicht, mit Xylidin 2,0 U/ml (*Phlebia radiata*) und 2,3 U/ml (*Trametes hirsuta*). So tritt eine Steigerung der Laccaseaktivität gegenüber den Kontrollproben mit den Induktoren Vanillin und Xylidin ein, doch ist diese verhältnismäßig geringer als bei den beiden Weißfäulepilzen *Trametes versicolor* und *Trametes villosa*.

Bei näherer Betrachtung zu der Induktion bei der Laccaseproduktion durch Weißfäulepilze und dem Induktor selbst lassen sich neben den besseren Messergebnissen bei dem Gebrauch von Indulin entscheidende Vorteile gegenüber dem ebenfalls als Induktor eingesetzten Xylidin aufführen. Zum einen werden in dieser Dissertation zum Beispiel bei der Induktion der Pilzflüssigkulturen durch Indulin bei *Trametes versicolor* deutlich höhere Laccaseaktivitäten gemessen als bei der Induktion mit Xylidin und bei *Trametes villosa* die gleiche Laccaseaktivität durch Indulininduktion erreicht, wie mit Xylidin. Zum anderen ist Xylidin in der Gefahrenstoffklassierung als „giftig“ eingestuft, was für eine Anwendung von natürlichen, nicht toxischen Phenolen, wie das Indulin, spricht. Zudem ist das aus dem Sulfatprozess (Papierherstellung) gewonnene Kraftlignin Indulin auch im Hinblick auf die spätere Entsorgung besonders umweltfreundlich und im Anschaffungspreis gegenüber dem toxischen Xylidin deutlich günstiger (KHARAZIPOUR, 1996). Eine Alternative gegenüber dem Indulin ist das Vanillin, welches wie die beiden anderen behandelten Induktoren zwar eine Erhöhung der Laccaseaktivität hervorruft, doch im Vergleich zu dem Induktor Indulin nur etwa die Hälfte des Potentials besitzt, die Aktivität zu steigern.

In weiteren Versuchen wird die Effektivität der Induktion mit Indulin überprüft, d. h. es werden Messungen der Laccaseaktivität von *Trametes versicolor* und *Trametes villosa* in Abhängigkeit der Indulinkonzentration vorgenommen. Aufgrund der wesentlich geringeren Laccaseaktivitäten bei *Trametes hirsuta* und *Phlebia radiata* werden diese Pilze zu dieser Untersuchung nicht herangezogen.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen, wird bei dem Weißfäulepilz *Trametes versicolor* die höchste Laccaseaktivität von 10 U/ml bei einer Indulinkonzentration von 1,25 mg/ml im Flüssigmedium ermittelt, während die Aktivitätswerte bei Konzentrationen von 1,0 mg/ml und 1,5 mg/ml deutlich unter 10 U/ml liegen. Bei dem Weißfäulepilz *Trametes villosa* sind keine so hohen Laccaseaktivitätswerte messbar, wie bei *Trametes versicolor*. Mit zunehmender Indulinkonzentration steigt die Laccaseaktivität an. Bei einer Konzentration von 1,5 mg/ml Indulin wird eine Aktivität von etwa 6,1 U/ml erreicht.

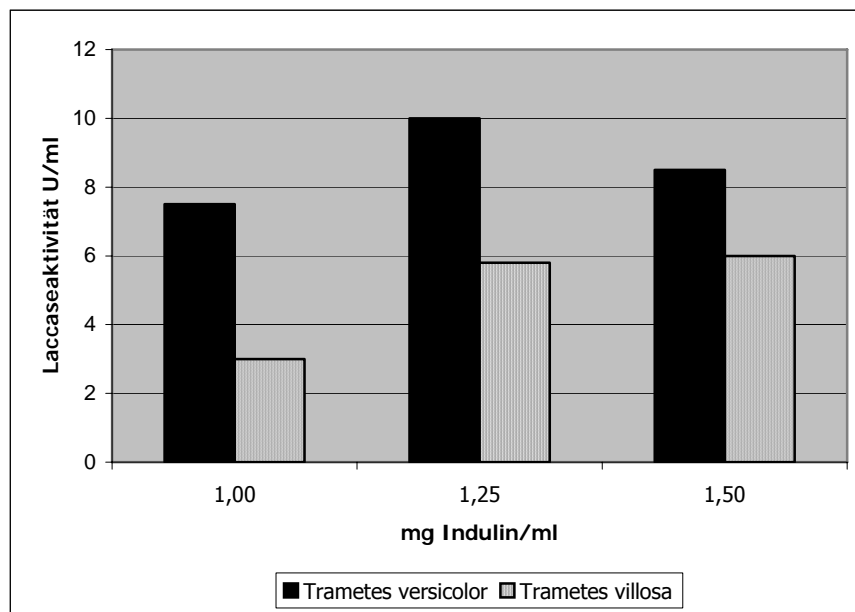


Abb. 19: Extrazelluläre Laccaseaktivität von *Trametes versicolor* und *Trametes villosa* in Abhängigkeit der Indulinkonzentration

Für *Trametes versicolor* kann somit eine Indulinzugabe von 1,25 mg/ml als optimale Konzentration zur Laccaseaktivitätserhöhung angesehen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen von SHEKOESLAMI (1991) und KHARAZIPOUR (1996), die bei *Trametes versicolor* eine maximale Enzymaktivität bei einer Indulinkonzentration von 1,25 g pro Liter Nährlösung feststellten.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass sich von allen untersuchten Pilzen *Trametes versicolor* durch seine hohe Laccaseaktivität von etwa 10,5 U/ml mit Hilfe eines Induktors für die weitere Anwendung als Laccaselieferant für die MDF-Plattenherstellung am besten eignen könnte. Dabei wird die Laccaseaktivität des Pilzes durch Induktion mit Indulin deutlich gesteigert. Die Induktion sollte am dritten Tag nach Ansetzen der Schüttelkulturen erfolgen (siehe Seite 73). Dieser Zeitraum ist notwendig, damit sich der Weißfäulepilz an seine Wachstumsbedingungen (z. B. Art des Nährmediums, Sauerstoffverfügung usw.) anpassen kann (Adoptionsphase) (Kharazipour 1983 und 1996; SHEKOESLAMI, 1991). Ein wichtiger Aspekt, der auch bei der Fermentation im 5 Liter Fermenter berücksichtigt werden muss. Gute Ergebnisse bei den Messungen der Laccaseaktivität wurden auch bei dem Pilz *Trametes villosa* gemessen. Dessen höchste Laccaseaktivität von etwa 6,0 U/ml wird sowohl bei der Induktion mit Indulin als auch bei der Induktion mit dem toxisch wirkenden Xylidin erreicht. Entsprechende Ergebnisse können auch in SHEKOESLAMI (1991) und KHARAZIPOUR (1996) nachgelesen werden, die ein hohes Potential zur industriellen Anwendung dieser beiden Weißfäulepilze für die Grundlage zur Herstellung von Enzymen für die Holzwerkstoffindustrie

sehen. Die beiden anderen untersuchten Weißfäulepilze *Trametes hirsuta* und *Phlebia radiata* kommen aufgrund ihrer schwachen Laccaseproduktion für einen Einsatz im technischen Maßstab eher nicht in Frage.

5.2 Fermentation von *Trametes versicolor* im 5 Liter-Fermenter

Unter Berücksichtigung der in Kapitel 5.1 gewonnenen Ergebnisse erfolgt eine Fermentation des Weißfäulepilzes *Trametes versicolor* im Fermenter, um eine Laccaseproduktion im größeren Maßstab (5 Liter) zu überprüfen. Wie bei den Schüttelkulturen handelt es sich bei dem Flüssigmedium um BSM- oder um L₁-Medium (siehe Kapitel 4.1.5.1 und 4.1.5.2).

In Abbildung 20 sind die Laccaseaktivitäten während des Fermenterlaufes dargestellt. Die Laccaseaktivität ist in den ersten drei Tagen gering. Nach Zugabe des Induktors Indulin (Kraftlignin) am dritten Tag folgt eine starke Zunahme der Aktivität bis auf etwa 12 U/ml am sechsten Tag. Ab dem siebten Tag sinkt die Laccaseaktivität wieder. Durch Optimierung der Bedingungen für die Fermentation im 5 Liter Reaktor stellt der Wert 12 U/ml eine Erhöhung gegenüber den in Kapitel 5.1 aufgeführten Ergebnissen dar, welche in den Schüttelkulturen bei 10,5 U/ml liegen. Wie auch in den Schüttelkulturen ist eine Induktion mit Indulin ratsam, da dieser Induktor eine deutliche Verbesserung der Aktivität hervorruft, was im Hinblick auf die Effizienz der Laccase für ihre spätere Verwendung von hoher Bedeutung ist.

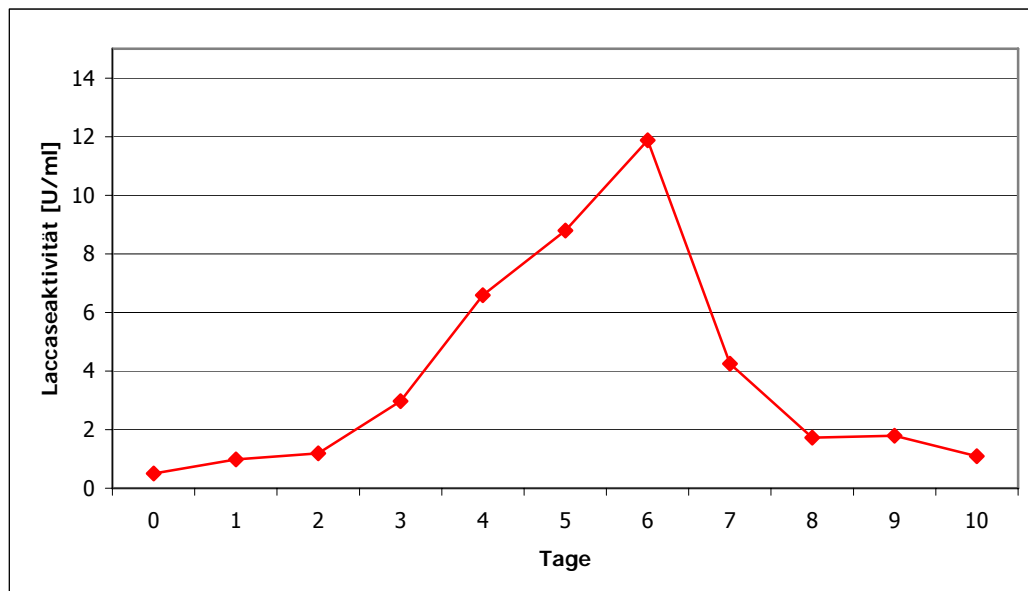


Abb. 20: Laccaseaktivität von *Trametes versicolor* während des Fermenterlaufes

Die folgende Abbildung (21) zeigt die Entwicklung der Biotrockenmasse während des Fermenterlaufes. Vom 1. bis zum 5. Tag ist nur eine geringe Zunahme der Biotrockenmasse zu erkennen. Am 6. Tag ist ein Höchstwert von 18,5 mg/ml erreicht, welches auf einen sehr hohen Zuwachs des Pilzmycels gegenüber dem vorherigen Tag zurückzuführen ist. Ab dem 7. Tag fällt der Wert der Biotrockenmasse aufgrund des hohen Verbrauches an Mediuminhaltsstoffen wieder ab. Dies lässt sich jedoch nicht genau erklären, da sich mit zunehmendem Pilzwachstum im Fermenter fortlaufend neues Pilzmycel bildet, was sich an dem Gehalt der Biotrockenmasse auch nach dem 6. Tag durch weiter steigende oder gleich bleibende Werte deutlich machen müsste. Zwar nimmt die Laccaseaktivität des Pilzes ab dem 7. Tag ab, jedoch ist immer noch das Pilzmycel vorhanden. Mit der nachlassenden Laccaseaktivität muss ein Zellsterben stattfinden, was aber allein die Werte für die Biotrockenmasse noch nicht sinken lässt. Vermutlich kommt es zu einer Autolyse der abgestorbenen Zellen, also einer enzymatisch bedingten Selbstaflösung oder Selbstverdauung von Zellgewebe des Mycels. Das Gewicht der entnommenen Proben zur Biotrockenmasse nimmt demnach auf den Milliliter bezogen ab.

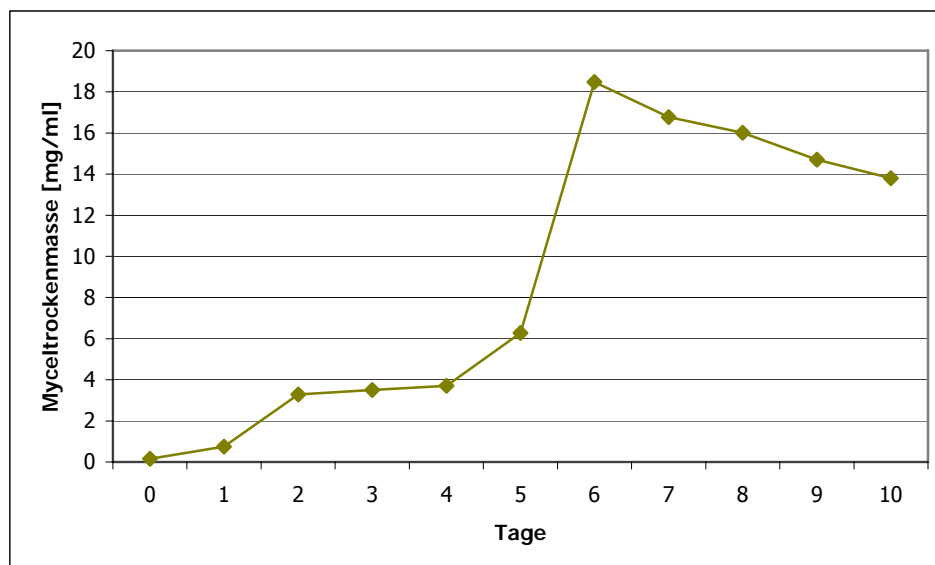


Abb. 21: Myceltrockenmasse von *Trametes versicolor* während des Fermenterlaufes

Bei der Betrachtung des pH-Wertes während des Fermenterlaufes wird deutlich, dass der pH-Wert seit dem Tag der Induktion (Tag 3) bis zur Abnahme der Laccaseaktivität (Tag 7) um den anfänglichen Wert 5,5 schwankt (Abbildung 22). Nach der Indulinzugabe am dritten Tag fällt der pH-Wert auf 4,9. Es folgt ein Anstieg auf 6,0 am sechsten Tag. Am siebten Tag sinkt der pH-Wert wieder. Das Absinken des pH-Wertes am Tag der Induktion hängt mit höher Wahrscheinlichkeit von dem Induktor Indulin ab, der für die

Versuchsdurchführung auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt wurde (vergleiche Kapitel 4.2.2).

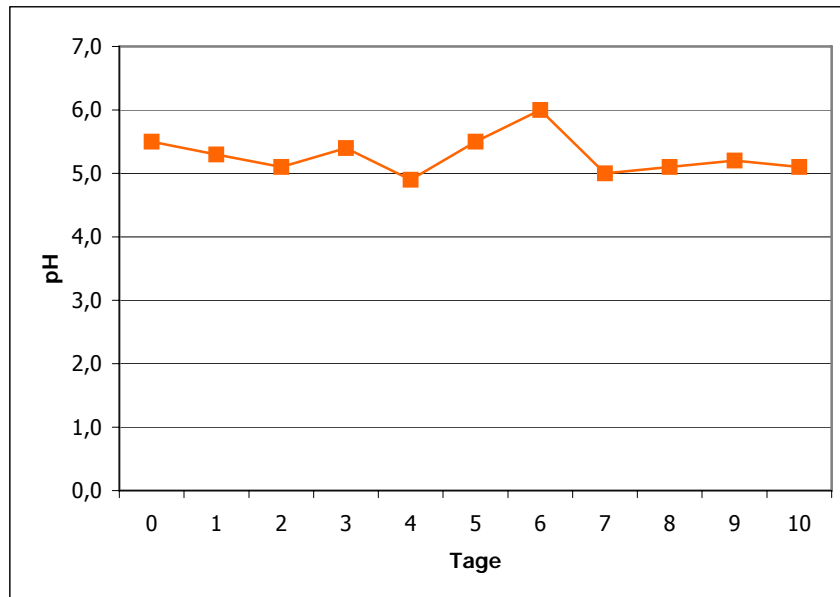


Abb. 22: pH-Wert des Mediums von *Trametes versicolor* während des Fermenterlaufes

Bei der Untersuchung der Laccaseproduktion des Weißfäulepilzes *Trametes versicolor* im 5 Liter-Fermenter kann festgestellt werden, dass die Ergebnisse mit denen in Kapitel 5.1 aus den Schüttelkulturen gewonnenen Ergebnissen vergleichbar sind. Durch die Induktion der Flüssigkulturen am dritten Tag kann die Laccaseproduktion des Weißfäulepilzes gesteigert werden. Wesentliche Unterschiede zu den Schüttelkulturen sind das Erreichen der höheren Laccaseaktivität zu einem früheren Zeitpunkt. So wird der Maximalwert von 12 U/ml drei Tage nach der Induktion der Flüssigkultur im Fermenter ermittelt, während die höchste Laccaseaktivität von *Trametes versicolor* in der Schüttelkultur (10,5 U/ml) erst neun Tage nach der Induktion mit Indulin gemessen wird. Dies ist darauf zurückzuführen, dass im Fermenter, in dem vor allem eine Temperierung, eine Sauerstoffzufuhr und durch das Rührwerk zusätzlich eine konstante Umwälzung der Flüssigkultur gewährleistet wird.

Die Fermentation im 5-Liter Fermenter kann nur für eine Enzym- bzw. Laccaseproduktion im Labormaßstab dienen. Die in diesem Maßstab gewonnenen Ergebnisse können auf größere Fermenter umgesetzt werden. Denkbar sind die Nutzung von Fermentern im Labormaßstab mit einem Fassungsvermögen von beispielsweise 30 Litern bis hin zum technischen Maßstab im Kubikmeterbereich. Entsprechende Versuchsreihen mit den gleichen Weißfäulepilzen sind in KHARAZIPOUR (1996) beschrieben. KHARAZIPOUR (1996) stellt jedoch fest, dass der Einsatz von Enzymen im technischen Maßstab stark vom Preis abhängig ist, der für Enzyme zu bezahlen ist. Nur bei einer großtechnischen Herstellung bei hohen Enzymausbeuten kann eine Enzymproduktion so wirtschaftlich gestaltet werden, dass eine technische Implementierung zu erwarten ist (KHARAZIPOUR 1996).

Als der weltweit größte Hersteller von technischen Enzymen gilt derzeit die Firma *Novozymes*, Bagsvaerd, Dänemark (SCHMITZ, 2005). Sie verfahren grundsätzlich nach den Methoden, wie sie in KHARAZIPOUR (1996) angewendet werden. *Novozymes* produziert über 100 verschiedene Enzyme und Mikroorganismen, darunter auch das in dieser Dissertation verwendete *Novozym* 51003.

5.3 Analyse der *Novozym* Laccase

5.3.1 Laccase-Aktivitätstest

Bei der Messung Laccase-Aktivitäten der *Novozyme* Laccase wird nach standardisierten Verfahren gearbeitet, wodurch zuverlässige Angaben über die Laccaseaktivität eines Enzyms getroffen werden können und eine Vergleichbarkeit mit anderen Enzymen gewährleistet werden kann (KILARU, 2006). Daher wird für diese Dissertation die Laccase-Aktivitätsbestimmung in Anlehnung nach MATSUMURA et al. (1986) angewendet.

Zur Bestimmung der Laccase-Aktivität von *Novozym* 51003 werden die das Substrat ABTS verwendet (vergleiche Kapitel 4.2.1 und 4.2.4). Die Bestimmung erfolgt in 120 mM Na-Acetat-Puffer mit einem pH-Wert von 5,0 (KILARU, 2006). In Tabelle 7 ist ein Ergebnis der Aktivitätsbestimmung aufgeführt.

Tab. 7: Aktivität bei alternierenden Substraten in 120 mM Na-Acetat Puffer

Substrat	ABTS
Aktivität [U/ml]	1829

5.3.2 pH-Optimum und pH-Stabilität der *Novozym* Laccase

Da in dieser Dissertation für die Inkubation der Lignine (siehe Kapitel 4.2.5) und der Holzfasern mit Laccase bzw. Laccase und Mediator grundsätzlich der McIlvain-Puffer (siehe Kapitel 4.1.7.2) verwendet wird, sollen auch das pH-Optimum und die pH-Stabilität der Laccase mit dem Gebrauch von McIlvain-Puffer anstelle des 120 mM Na-Acetat-Puffers (KILARU, 2006) ermittelt werden. Die Laccase-Aktivitätsmessung erfolgt weiterhin nach dem standardisierten Verfahren nach MATSUMURA et al. (1986).

Aus Tabelle 8 wird das pH-Optimum und die pH-Stabilität der *Novozym* Laccase ersichtlich.

Tab. 8: pH-Optimum sowie pH-Stabilität der Laccase im McIlvaine Puffer

	pH Optimum	pH-Stabilität
Substrat	ABTS	ABTS
pH-Wert	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]
2,5	610	115
3,0	1015	137
3,5	1345	543
4,0	1667	955
4,5	1765	1333
5,0	1803	1540
5,5	1930	1713
6,0	2013	1920
6,5	2018	1901
7,0	1788	1791
7,5	1303	1589

Zur Veranschaulichung des pH-Optimums und der pH-Stabilität werden die Ergebnisse in Abbildung 23 dargestellt.

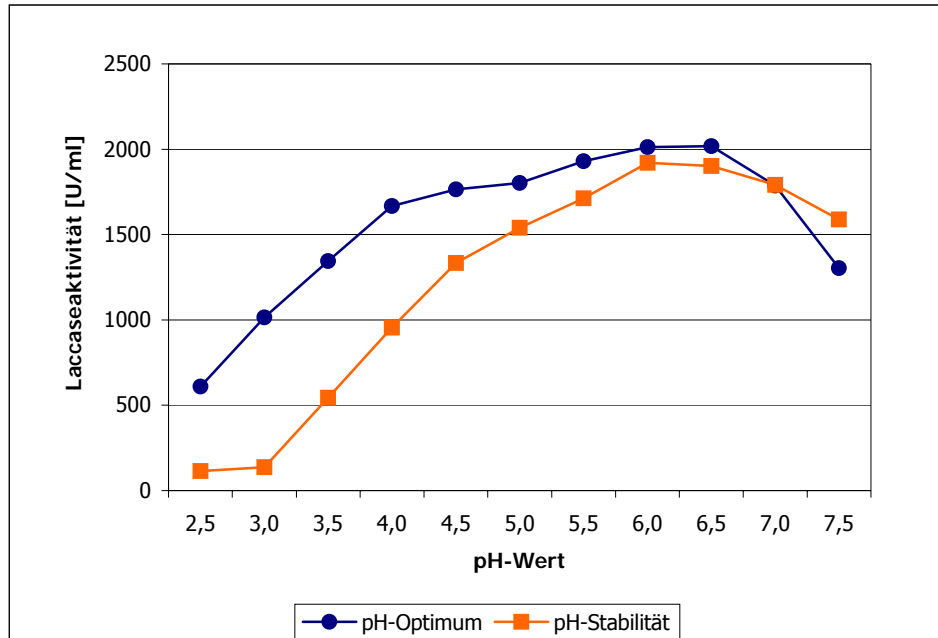


Abb. 23: pH-Optimum und pH-Stabilität der *Novozym* Laccase im McIlvaine Puffer

Das pH-Optimum der *Novozym* Laccase im McIlvaine Puffer wird in dem pH-Bereich 6,0 und 6,5 erreicht, denn bei diesen Werten werden die höchsten Laccaseaktivitäten von 2013 U/ml und 2018 U/ml gemessen. Bis zu einem pH-Wert von 4,0 steigen die Laccaseaktivitäten

zunächst stärker an, bei welchem knapp 1700 U/ml gemessen werden. Anschließend erfolgt ein langsames Annähern an das pH-Optimum, bis die Aktivitäten bei den pH-Werten 7,0 und 7,5 deutlich absinken. Bei der Überprüfung der pH-Stabilität ist ein ähnlicher Verlauf der Laccaseaktivitäten zu beobachten. Nach dem pH-Wert 3,0 steigen die Aktivitäten kontinuierlich an, bis bei dem pH-Wert 6,0 der Maximalwert von 1920 U/ml ermittelt wird. Bei pH 6,5 werden noch 1901 U/ml gemessen, bei höheren pH-Werten nur noch niedrigere Laccaseaktivitäten.

Für die Verwendung der *Novozym* Laccase im McIlvain Puffer kann gefolgert werden, dass die höchsten Aktivitätswerte bei den pH-Werten von 6,0 bis 6,5 erreicht werden können, wobei die Stabilität der Laccase ebenfalls bei den gleichen pH-Werten gewährleistet werden kann. Wie in Kapitel 4.1.4.2 erwähnt wird die *Novozym* Laccase mit einem pH-Wert von etwa 7,5 geliefert (NOVOZYMES, 2003). Durch die hier gewonnenen Ergebnisse ist festgestellt worden, dass die Laccase bei den o.g. pH-Werten eine optimale und stabile Aktivität zeigt. Ein pH-Wert von 7,5 kann daher nur zu Transportzwecken und zur zeitlich begrenzten Lagerung der Laccase dienen. Für eine gezielte Anwendung, wie in dieser Dissertation die Aktivierung des Holzlignins, muss der pH-Wert der Laccase zum Erreichen ihres vollen Potentials zum leicht sauren Bereich hin verschoben werden, was mit Hilfe des McIlvaine Puffers ermöglicht wird.

Neben dem pH-Optimum und der pH-Stabilität zum Ausschöpfen des vollen Laccasepotentials zählen auch das Temperaturoptimum und die Temperaturstabilität, da die Umgebungstemperatur, in der die Laccase zur Anwendung kommt, die Laccaseaktivität entscheidend beeinflussen kann. Daher wird die *Novozym* Laccase zur Bestimmung des Temperaturoptimums und der Temperaturstabilität zwei Stunden lang verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Die Ermittlung des Temperaturoptimums erfolgt direkt nach dem Erreichen der jeweiligen Temperatur. Verwendet wird der McIlvain Puffer, der aufgrund der bisher in diesem Kapitel beschriebenen Versuchsergebnisse mit einem pH-Wert von 6,0 hergestellt wird.

5.3.3 Temperaturoptimum und Temperaturstabilität der *Novozym* Laccase

In der folgenden Tabelle (9) sind die Laccaseaktivitäten zur Ermittlung des Temperaturoptimums und der Temperaturstabilität eingetragen. Die Temperaturen reichen von 10 °C bis 80 °C.

Tab. 9: Temperaturoptimum der Laccase (vor der Inkubation) und Temperaturstabilität nach 2 Stunden Inkubation in McIlvain Puffer

	Temperaturoptimum (vor der Inkubation)	Temperaturstabilität nach 2 Stunden Inkubation
Temperatur [°C]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]
10	682	685
20	789	746
30	1034	1032
40	1739	1629
50	2196	1899
60	2673	78
70	3252	22
80	2821	13

In der folgenden Abbildung (24) sind die in Tabelle 9 eingetragenen Laccaseaktivitäten in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt.

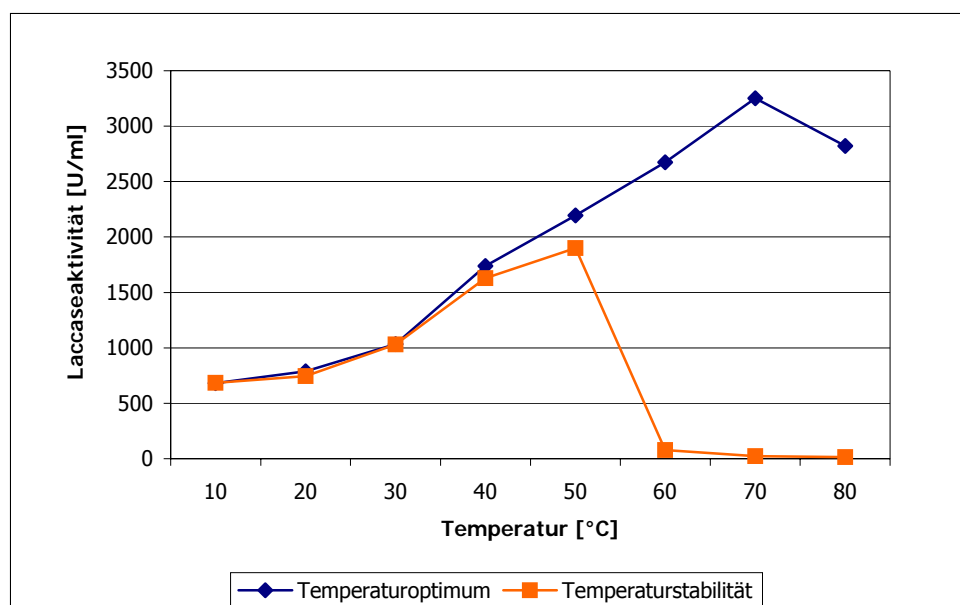


Abb. 24: Temperaturoptimum und Temperaturstabilität der Laccase nach 2 Stunden in McIlvain Puffer

Bei der Temperierung der *Novozym* Laccase fällt auf, dass die Aktivität mit steigender Temperatur zunimmt. Bei 70 °C werden mit der Laccase 3252 U/ml erreicht, der höchste Wert, der in dieser Dissertation bei der Laccasebestimmung gemessen wurde. Diese Temperatur wird auch bei NOVOZYMES (2003) als jene angegeben, bei der die höchste Aktivität der *Novozym* Laccase ermittelt wird. Bei einer Temperatur von 80 °C sinkt die Laccaseaktivität wieder ab. Betrachtet man die Temperaturstabilität der Laccase, dann wird deutlich, dass nach zwei Stunden so gut wie keine Laccaseaktivität mehr vorhanden ist. Wird die Laccase höher als 50 °C temperiert (60 °C – 80 °C), fällt die Laccaseaktivität nach zwei Stunden stark ab (78 U/ml, siehe Tabelle 9). In dem Temperaturbereich von 40 °C bis 50 °C werden die höchsten Laccaseaktivitäten nach zwei Stunden gemessen (1629 U/ml und 1899 U/ml, siehe Tabelle 9), die unwesentlich von den Aktivitätsmessungen direkt nach dem Erreichen der Temperatur abweichen (1739 U/ml bei 40 °C und 2196 U/ml bei 50 °C, siehe Tabelle 9). In diesem Temperaturbereich herrscht somit die höchste Stabilität der Laccase.

Mit der Laccaseanalyse konnten für die weitere Behandlung und Verwendung der *Novozym* Laccase entscheidende Ergebnisse gewonnen werden. So stellte sich heraus, dass der optimale pH-Wert der Laccase im McIlvain Puffer im Bereich von 6,0 und 6,5 liegt, bei dem die Laccaseaktivität zusätzlich stabil bleibt. Zu den Laccaseaktivitäten bei unterschiedlichen Temperaturen kann festgehalten werden, dass die höchste Aktivität zwar bei 70 °C erreicht wird, die Laccase jedoch im Temperaturbereich zwischen 40 °C und 50 °C eine stabile Aktivität nach 2 Stunden zeigt.

Der Gebrauch der Laccase bei einem pH-Wert von 6,0 bis 6,5 sollte als Grundlage für die gesamten analytischen Untersuchungen dienen. Eine Temperierung der mit Laccase angereicherten Inkubationslösungen (Puffer, Laccase, ohne oder mit Mediator, Lignin oder Holzfasern) ist im Labormaßstab durchführbar. Bei der Produktion der enzymgebundenen Dämmplatten und vor allem der enzymgebundenen MDF-Platten im Pilotmaßstab gestaltet sich eine Temperierung der Inkubationslösung dagegen schwieriger.

5.4 Untersuchung der Ligninproben mittels GPC

Die Ergebnisse der folgenden Untersuchungen sollen den Einfluss der Inkubation mit Laccase und Laccase-Mediator auf die Molekulargewichte drei verschiedener technischer Lignine erörtern. Darüber hinaus können die Ergebnisse modellhaft für die enzymatische Aktivierung des Holzfaserlignins mit Laccase und Mediator angewandt werden.

5.4.1 GPC Untersuchung von Ca-Ligninsulfonat (Wafex)

Wie in Abbildung 25 zu sehen, sind für Kontrollproben, Laccase- und Laccase-Mediator behandelte Proben die Mittleren Molekulargewichte (MW) für Ca-Ligninsulfonat (Wafex) nach 2 stündiger Inkubation bei verschiedenen Laccasekonzentrationen aufgeführt. Mit steigender Laccasekonzentration ist ein Ansteigen der Molekulargewichte bei den Proben Laccase und Laccase + 10 mM HBA und Laccase + 20 mM HBA zu erkennen. Das Molekulargewicht der Kontrollprobe bleibt bei 55000 Dalton konstant. Der Grund hierfür ist, dass es sich um Wafex handelt, welches lediglich in McIlvaine Pufferlösung ohne die Einwirkung von Laccase behandelt wurde und somit keiner chemischen Veränderung durch das Enzym unterlag. Auch bei der Zugabe des Mediators HBA in den Konzentrationen 10 mM und 20 mM können keine Unterschiede in der Höhe des Molekulargewichtes in der Wafex-Pufferlösung festgestellt werden. Sowohl bei der Kontrollprobe Wafex, als auch bei den Proben Wafex und 10 mM HBA, sowie Wafex und 20 mM HBA werden identische Molekulargewichte gemessen, nämlich 55000 Dalton. Für die weitere Interpretation der Untersuchungsergebnisse kann somit festgehalten werden, dass das Vorhandensein des Mediators ohne Enzym in der Wafex-Pufferlösung keine Reaktionen an dem Ca-Ligninsulfonat (Wafex) auslöst und eine Veränderung des Molekulargewichtes bewirkt.

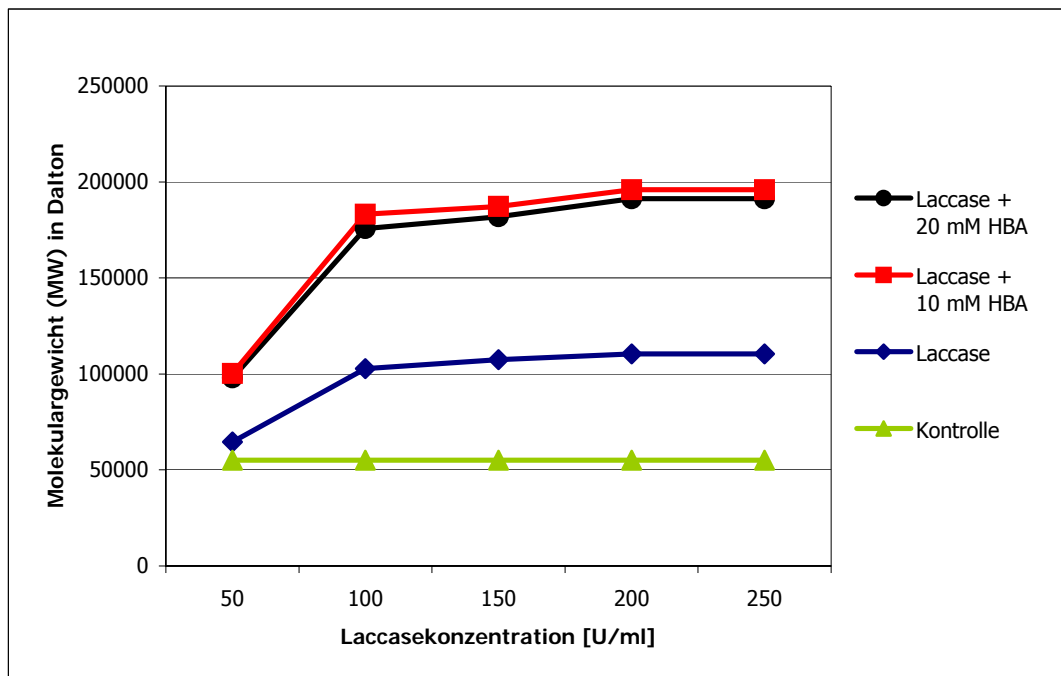


Abb. 25: Mittleres Molekulargewicht (MW) von Ca-Ligninsulfonat (Wafex) nach 2 h Inkubation

Vergleicht man die Molekulargewichte der Laccase und Laccase-Mediator behandelten Proben untereinander, werden bereits bei einer Enzymkonzentration von 50 U/ml

Unterschiede deutlich. Die Differenz zwischen der Probe Laccase und den Proben Laccase + 10 mM HBA sowie Laccase + 20 mM HBA liegt bei etwa 35000 Dalton, welche sich mit zunehmender Laccasekonzentration auf bis zu 85000 Dalton bei 200 U/ml vergrößert. Betrachtet man die Molekulargewichte der einzelnen Laccase und Laccase-Mediator behandelten Proben in Abhängigkeit von der Laccasekonzentration, ist zu erkennen, dass die Werte bei 50 U/ml bis 200 U/ml jeweils ansteigen und bei 250 U/ml konstant bleiben. So werden die höchsten Molekulargewichte bei einer Laccasekonzentration von 200 U/ml erreicht. Bei der Probe Laccase werden 110000 Dalton, bei Laccase + 10 mM HBA 196000 und bei Laccase + 20 mM HBA 191000 gemessen. Dies bedeutet eine Steigerung des Molekulargewichtes um ca. 78 %, wird der Mediator HBA in die Inkubationslösung hinzugegeben. Die Molekulargewichten bei 250 U/ml liegen wie oben beschrieben auf gleicher Höhe mit den Molekulargewichten bei 200 U/ml. Somit hat eine weitere Erhöhung der Laccasekonzentration von 200 auf 250 U/ml in der Pufferlösung keine Zunahme des Molekulargewichtes von Wafex erbracht, was den Schluss zulässt, dass bei einer Laccasekonzentration von 200 U/ml die Katalyse und Polymerisierung der Ligninmoleküle voll ausgeschöpft zu sein scheint.

Ebenso scheint dies der Fall bei einer Verdoppelung des Mediatoranteils auf 20 mM zu sein, da die Molekulargewichte des mit Laccase + 20 mM HBA inkubiertem Wafex gleichauf oder geringfügig unterhalb den mit der Laccase + 10 mM HBA behandelten Wafexprobe liegen.

Insgesamt kann anhand der Ergebnisse darauf geschlossen werden, dass durch die Einwirkung des Mediators HBA wesentlich mehr „Ligninbruchstücke“ oder „-radikale“ gebildet werden und im weiteren Verlauf wieder untereinander polymerisieren als beim alleinigen Vorhandensein der Laccase in der Inkubationslösung.

5.4.1.1 GPC Untersuchung von Ca-Ligninsulfonat (Wafex) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

In einem Versuch von Laccase und Laccase-Mediator behandeltem Wafex mit einer Inkubationsdauer von 24 Stunden werden den Inkubationslösungen in den ersten beiden Stunden, der 6., 12. und 24. Stunde Proben entnommen und für die Messungen in der GPC-Anlage präpariert. Die Laccasekonzentration der Inkubationslösungen beträgt 200 U/ml, die Mediatorkonzentration 10 mM und 20 mM. Deutlich zu erkennen ist das hohe Niveau der Molekulargewichte der Proben Laccase + 10 HBA und Laccase + 20 mM HBA (siehe Abbildung 26). Bereits in der ersten Stunde steigt das Gewicht auf über 125000 Dalton. Nach der 2. Stunde ist der Höchstwert von 196000 (10 mM HBA) und 191000 (20 mM HBA) Dalton erreicht, wonach die Molekulargewichte bis zum Ende der Inkubationszeit langsam auf etwa 140000 bis 130000 Dalton absinken. Wie auch bei der vorherigen Untersuchung von Wafex

bei unterschiedlichen Laccasekonzentrationen (siehe Abbildung 25) wird deutlich, dass eine Erhöhung des Mediatoranteils von 10 mM auf 20 mM keine Erhöhung der Molekulargewichte bringt, somit also nicht mehr Ligninradikale gebildet werden und später polymerisieren.

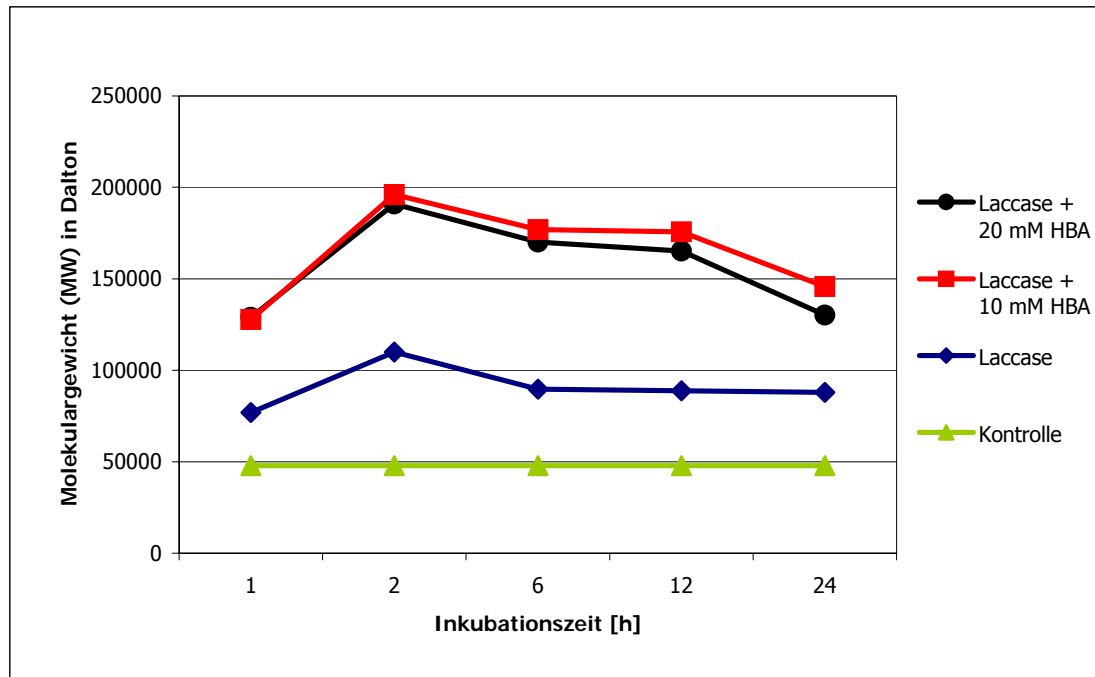


Abb. 26: Mittleres Molekulargewicht (Mw) von Ca-Ligninsulfonat (WAFEX) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Auch bei der Probe Laccase ist der Höchstwert von 110000 Dalton nach 2 Stunden erreicht, danach bleibt das Molekulargewicht relativ konstant unter dem Höchstwert. Dass nach 2 Stunden Inkubationszeit sowohl bei der Probe Laccase als auch bei der Probe Laccase + HBA kein Anstieg der Molekulargewichte mehr zu verzeichnen ist, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit daran, dass nach 2 Stunden keine zusätzlichen Ligninbestandteile mehr radikalisiert werden, da eine starke Polymerisation einsetzt hat. Das Abnehmen der Molekulargewichte nach dieser Zeit wäre damit zu erklären, da durch die Polymerisation die einmal gebildeten freien Radikale für weitere Reaktionen nicht mehr zur Verfügung stehen und nicht gemessen werden können (BERGMANN, 1998). Um die durch die Laccase und mit dem Mediator in erhöhter Form katalysierte Reaktion im übertragenen Sinne zu einer Verklebung der Ligninbestandteile auf der Holzfaseroberfläche zu nutzen, sollte somit eine Inkubationszeit von (maximal) 2 Stunden gewählt werden. Dabei ist die Verwendung des Mediators HBA in einer Konzentration von 10 mM in einem Laccase-Puffergemisch mit 200 U/ml Laccase zu empfehlen.

5.4.1.2 GPC Untersuchung von Ca-Ligninsulfonat (Wafex) mit unterschiedlichen Mediatoren

Über die Inkubation mit Laccase und dem Mediator 4-Hydroxybenzoesäure (HBA) hinaus werden alle in Kapitel 4.1.3 aufgeführten Mediatoren für Molekulargewichtsmessungen mittels GPC getestet. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, sind die maximalen Molekulargewichte von Wafex aufgeführt, welches resultierend aus den bisherigen Ergebnissen ausschließlich mit 200 U/ml Laccase und 10 mM des jeweiligen Mediators für 2 Stunden inkubiert wurde. Zum Vergleich der Molekulargewichte bei unterschiedlichen Mediatoren sind nochmals die Werte für die Kontrollprobe (reines Wafex in Pufferlösung) mit 55000 Dalton und die mit 200 U/ml Laccase inkubierte Probe mit 110000 Dalton aufgeführt. Zu erkennen ist der verhältnismäßig hohe Wert für den Mediator HBA. Dieser liegt, wie auch schon in anderen Untersuchungen bei 196000 Dalton. Mit den übrigen Mediatoren können bei weitem nicht diese Werte ermittelt werden. Bei den Mediatoren Methylsyringat und ABTS werden über 133000 Dalton erreicht. Der niedrigste Wert wird mit 112000 Dalton bei der Verwendung von Acetosyringon ermittelt. Dieser liegt kaum höher als bei der alleinigen Inkubation mit 200 U/ml Laccase. Unter Verwendung der Mediatoren TEMPO und Syringaaldehyd werden Molekulargewichte um 122000 Dalton erreicht.

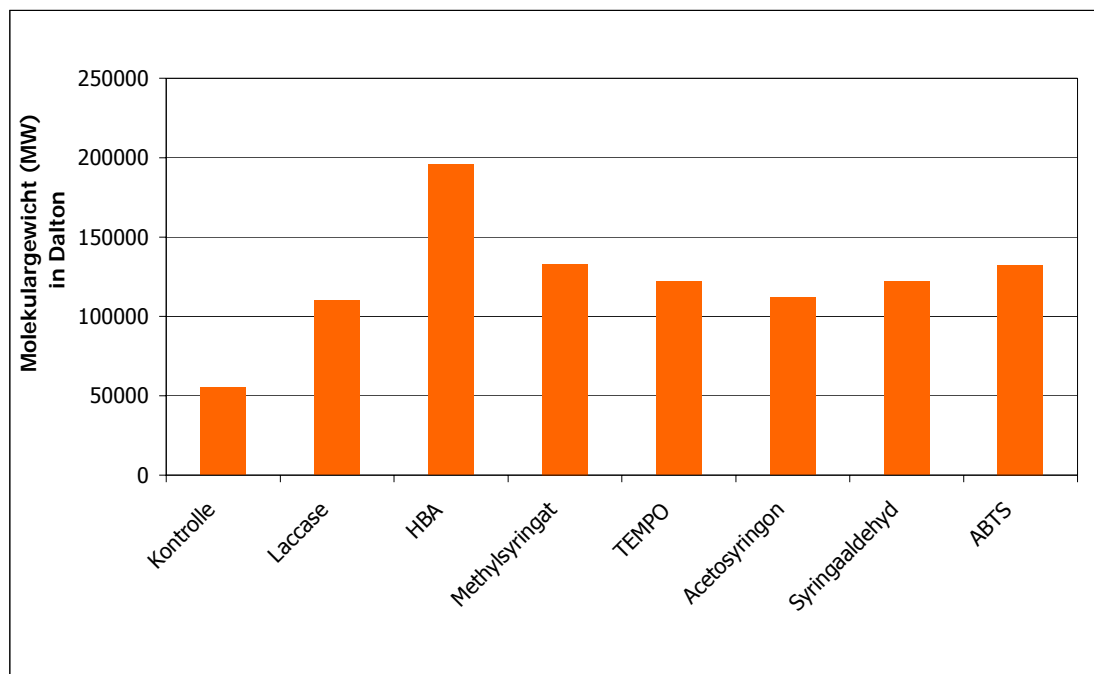


Abb. 27: Mittleres Molekulargewicht (Mw) von Ca-Ligninsulfonat (Wafex) mit verschiedenen Mediatoren (Laccasekonzentration 200 U/ml, Mediatorkonzentration 10 mM in Mc-Ilvainpuffer, pH 6,0)

Die Ergebnisse lassen erkennen, dass der Mediator HBA das unter diesen Bedingungen beste Potential bildet, als Mediator im Zusammenwirken mit der Laccase die Ligninmoleküle des Ca-Ligninsulfonates (Wafex) radikalieren zu können. HAARS et al. (1981) und KHARAZIPOUR (1983) nutzten in ihren Untersuchungen *para*-Hydroxybenzoesäure (4-Hydroxybenzoesäure) erfolgreich als Induktor, um eine Erhöhung der Laccaseaktivität der Pilze *Trametes versicolor* und *Pleurotus florida* im Sulfitablaugemedium zu erreichen. JOHANNES und MAJCHERCZYK (1999) beschreiben die 4-Hydroxybenzoesäure als sehr wirkungsvollen natürlichen Mediator im Laccase-Mediator-System. Einen positiven Effekt des Mediators HBA beobachteten auch HÜTTERMANN (unveröffentlicht) und LÜTKEMEYER-WAGNER (2007), die mittels Gel Permeations Chromatographie und in anderen Untersuchungen zum Laccase-Mediator-System mit dem Mediator HBA bessere Versuchsergebnisse erzielen konnten, als mit anderen Mediatoren. Chandra et al. (2004) beschreiben ebenfalls HBA als wirkungsvollsten Mediator im Laccase-mediator-System für die Modifikation von Papier und Zellstoff. Gegenüber den in diesem Kapitel behandelten Mediatoren hat die 4-Hydroxybenzoesäure darüber hinaus den Vorteil, dass es Anwendung in Bereichen der Pharmazie, Kosmetikindustrie und der Lebensmittelchemie (vgl. Kapitel 4.1.3.2) findet und somit auch als handelsübliche Chemikalie erhältlich ist. Weiterhin ist der Preis gegenüber den anderen verwendeten Mediatoren günstiger. So liegt ihr Preis zum Beispiel um 75 % unterhalb des Preises von ABTS (ROTH Chemikalien, 2008). Darüber hinaus hat es gute chemisch-physikalische Eigenschaften. Bei der Verwendung des teureren ABTS werden zwar auch relativ hohe Molekulargewichte bei Wafex gemessen, doch ist die intensive Grünfärbung des Substrates (z. B. Holzfasern) für eine spätere Weiterverwendung des Produktes ein entscheidender Nachteil. Mit dem ebenfalls hier eingesetzten Mediator Methylsyringat können in etwa die gleichen Molekulargewichte wie mit ABTS erreicht werden. Das Methylsyringat findet als Biokatalysator in industriellen Prozessen Anwendung (vgl. Kapitel 4.1.3.4). Als Mediator in dieser Arbeit stellt es zwar zu HBA eine Alternative da, doch ist die Wirkung in Verbindung mit der Laccase auf das Lignin geringer. Die beiden Substanzen Syringaaldehyd und TEMPO bewirken als Mediatoren eine unzureichende Molekulargewichtserhöhung des Wafex-Lignins gegenüber der alleinigen Behandlung mit 200 U/ml Laccase (siehe Abbildung 27). Syringaaldehyd und TEMPO sind im Vergleich zu HBA teurer. Zudem besitzt TEMPO eine toxische Wirkung (vgl. Kapitel 4.1.3.6), was für seine Verwendung als Mediator und auch für eine spätere Abbaubarkeit bedenklich sein kann. Das hier als Mediator verwendete Acetosyringon bewirkt keine spürbare Molekulargewichtserhöhung gegenüber der Wafex-Probe, die nur mit 200 U/ml Laccase behandelt wurde. Somit scheidet auch Acetosyringon als geeigneter Mediator für das Laccase-Mediator-System aus.

5.4.2 GPC Untersuchung von Na-Ligninsulfonat

Die Abbildung 28 zeigt die Mittleren Molekulargewichte für Na-Ligninsulfonat bei unterschiedlichen Laccase- und Mediatorkonzentrationen nach 2 Stunden Inkubation.

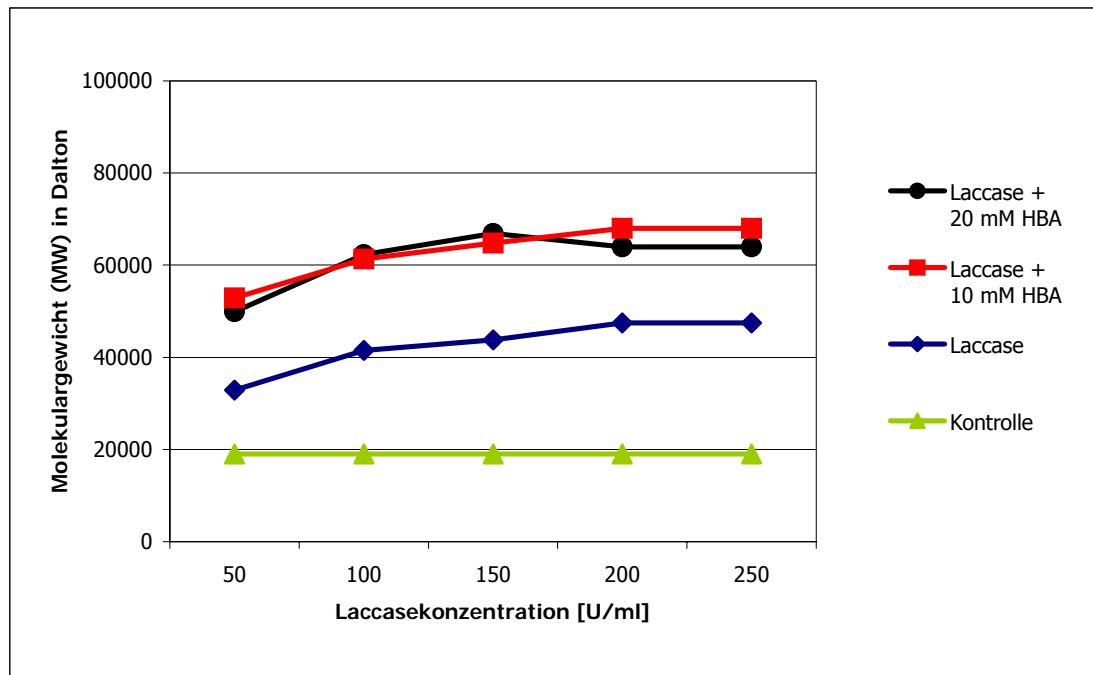


Abb. 28: Mittleres Molekulargewicht (Mw) von Na-Ligninsulfonat nach 2 h Inkubation

Wie bei Ca-Ligninsulfonat (Wafex) unterscheiden sich auch hier die Werte für die Proben Laccase und Laccase + HBA (10 mM und 20 mM) deutlich. Bereits bei einer Laccasekonzentration von 50 U/ml besteht zwischen den Laccase und Laccase-Mediator behandelten Proben eine Differenz von etwa 20000 Dalton, welche über die gesamten Laccasekonzentrationen relativ konstant bleibt. Sowohl bei der Probe Laccase, als auch bei der Probe Laccase + 10 mM HBA sind die Molekulargewichte bei einer Konzentration von 200 U/ml mit 47500 Dalton und 68000 Dalton am höchsten. Die Steigerung des Laccase-Mediator behandelten Na-Ligninsulfonates gegenüber dem nur mit Laccase behandelten beträgt demnach 43 %. Bei 250 U/ml bleiben die Werte bei den mit Laccase und Laccase + 10 mM Mediator behandelten Proben konstant. Bei der Probe Laccase + 20 mM HBA wird das höchste Molekulargewicht von knapp 67000 Dalton schon bei der Verwendung von 150 U/ml Laccase erreicht, bei 200 U/ml und 250 U/ml liegen die Werte unterhalb von 67000 Dalton. Die Kontrollprobe bleibt wie zu erwarten bei 19000 Dalton konstant, da keine Einwirkung der Laccase oder des Mediators stattgefunden hat (vgl. Kapitel 5.4.1). Mit Ausnahme der Probe Laccase + 20 mM HBA, die das höchste Molekulargewicht bereits bei

150 U/ml aufweist, werden die Höchstwerte bei den restlichen Proben ab einer Konzentration von 200 U/ml Laccase erreicht. Diese Ergebnisse decken sich mit denen, die bei der Behandlung von Wafex ermittelt werden (siehe Kapitel 5.4.1). Dort werden die höchsten Molekulargewichte mit einer Inkubationslösung mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA gemessen (vgl. Abbildung 25). Eine Erhöhung der Laccasekonzentration auf 250 U/ml ist auch unter ökonomischen Gesichtspunkt nicht notwendig. So kann auch für das Na-Ligninsulfonat festgehalten werden, dass unter den eben genannten Bedingungen die höchstmögliche Radikalisierung der Ligninmoleküle stattfindet.

Neben der Ermittlung des Molekulargewichtes von Na-Ligninsulfonat in Abhängigkeit von der Laccasekonzentration nach 2 Stunden Inkubationszeit erfolgt ebenso wie bei Ca-Ligninsulfonat (Wafex) eine Überprüfung der Molekulargewichtsverteilung über 24 Stunden. Dabei wird eine Laccasekonzentration von 200 U/ml gewählt, bei der in den vorherigen Ausführungen die höchsten Molekulargewichte gemessen werden. Alle anderen Versuchsbedingungen und Probenzusammensetzungen werden für diese Untersuchung beibehalten.

Wie in Abbildung 29 zu sehen, sind bei den Laccase und Laccase-Mediator behandelten Proben gegenüber der Kontrolle bereits größere Unterschiede im Molekulargewicht nach einer Stunde Inkubation zu erkennen.

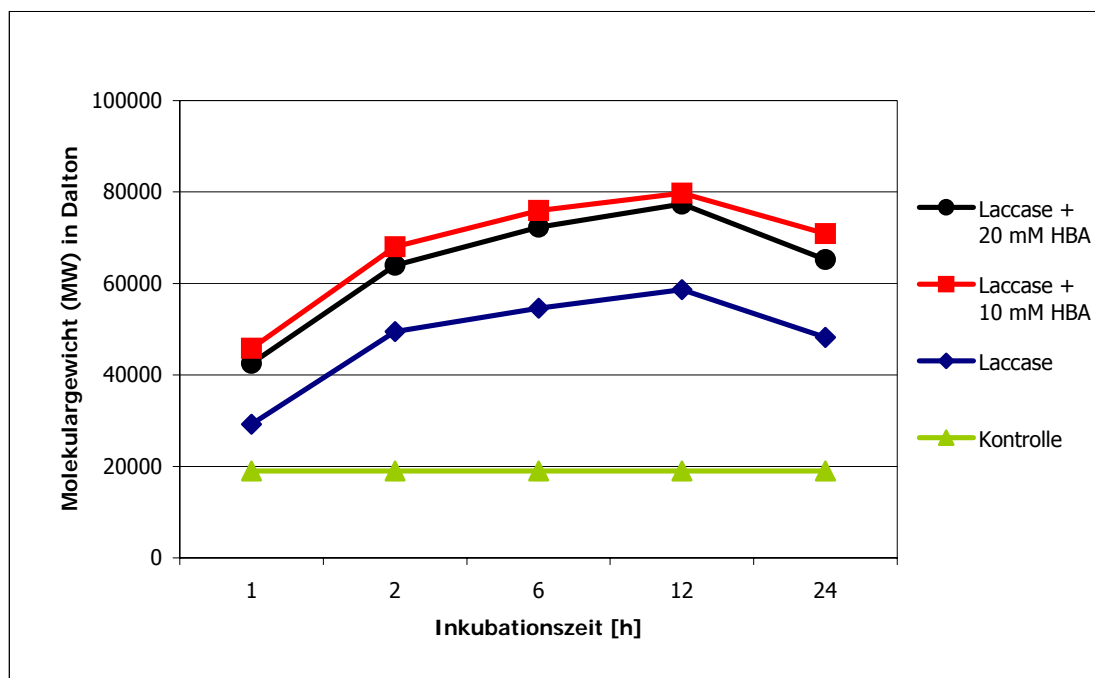


Abb. 29: Mittleres Molekulargewicht (Mw) von Na-Ligninsulfonat in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Das Molekulargewicht der Kontrollprobe bleibt über die gesamte Inkubationsdauer konstant bei 19000 Dalton. Die Werte für die Proben Laccase, Laccase + 10 mM HBA und Laccase + 20 mM HBA steigen bis einschließlich der 12. Stunde an und fallen anschließend bis zum

Messende wieder ab. So werden bei der Probe Laccase maximal 58700 Dalton, bei der Probe Laccase + 10 mM HBA knapp 80000 Dalton und bei der Probe Laccase + 20 mM HBA 77500 Dalton gemessen. Die Unterschiede der Proben Laccase zu den Proben Laccase + 10 mM HBA und Laccase + 20 mM HBA liegen über den gesamten Zeitverlauf um 20000 Dalton. Dies bedeutet, dass durch die Verwendung des Mediators eine Molekulargewichtszunahme von 36 % zu verzeichnen ist. Die Differenz der Molekulargewichte zwischen den Laccase + 10 mM HBA und Laccase + 20 mM HBA Proben ist sehr gering, woraus folgt, dass eine Erhöhung der Mediatorkonzentration keine Steigerung bei der Radikalisierung der Ligninmoleküle hervorzurufen vermag. Um die Zeitdauer zum Erreichen des maximalen, mittels GPC messbaren Molekulargewichtes zu erörtern, kann festgehalten werden, dass die Inkubationsdauer des Na-Ligninsulfonates bei 12 Stunden liegen muss, um eine höchstmögliche Radikalisierung und die direkt anschließende Polymerisation zu bewirken. Nach diesen 12 Stunden können die gesunkenen Molekulargewichte ein Zeichen dafür sein, dass so viele nicht enzymkatalysierte Folgereaktionen (Polymerisation) stattgefunden haben müssen, dass die ursprünglich gebildeten Radikale keine weiteren Reaktionen mehr eingehen können (BERGMANN, 1998).

5.4.3 GPC Untersuchung von Kraftlignin (Indulin)

In folgender Darstellung werden die Mittleren Molekulargewichte von unterschiedlich behandeltem Kraftlignin (Indulin) nach zweistündiger Inkubation verglichen (Abbildung 30).

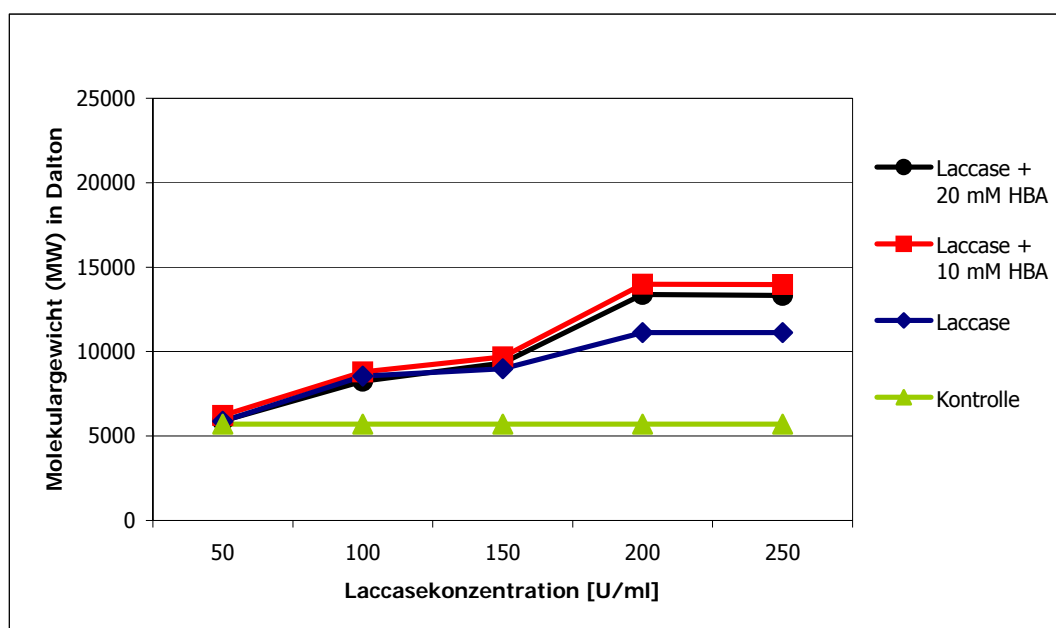


Abb. 30: Mittleres Molekulargewicht (Mw) von Kraftlignin (Indulin) nach 2 h Inkubation

Die Kontrollproben liegen konstant bei 5700 Dalton, da keine Einwirkung durch Laccase oder Laccase-Mediator vorhanden ist. Auch bei der Überprüfung der Molekulargewichte der Kontrollprobe mit 10 mM und 20 mM HBA in der Pufferlösung werden grundsätzlich 5700 Dalton gemessen. Die Proben Laccase, Laccase + 10 mM HBA und Laccase + 20 mM HBA liegen zwar anfänglich mit der Kontrollprobe nahezu gleichauf, doch mit steigender Laccasekonzentration nimmt die Bildung freier Radikale und die direkt folgende Polymerisation zu. Dabei liegen die Molekulargewichte der Proben Laccase + 10 mM HBA und Laccase + 20 mM HBA höher als die der Proben Laccase. Bei der Laccasekonzentration von 200 U/ml werden nach 2 Stunden Inkubationszeit die Höchstwerte 11130 Dalton (Laccase), 14000 Dalton (Laccase + 10 mM HBA) und 13400 Dalton (Laccase + 20 mM HBA) erreicht. Bei 250 U/ml Laccase werden nahezu die gleichen Molekulargewichte gemessen. Wie bei dem Ca-Ligninsulfonat (Wafex, vgl. Kapitel 5.4.1, Abbildung 25) und Na-Ligninsulfonat (vgl. Kapitel 5.4.2, Abbildung 28) kann dies daran liegen, dass eine höchstmögliche Radikalisierung und Polymerisierung der Kraftligninmoleküle bereits bei der Verwendung von 200 U/ml Laccase stattgefunden hat. Die Erhöhung des Mediators auf 20 mM hat sich wie auch bei den anderen behandelten Ligninen nicht verbessernd gegenüber der Verwendung von 10 mM ausgewirkt. Die Molekulargewichte liegen sogar leicht unterhalb der Proben mit 10 mM HBA. Der Effekt der Inkubation mit Laccase + Mediator ist weitaus geringer als bei Wafex.

Insgesamt betrachtet sind die Molekulargewichte deutlich geringer als bei Ca-Ligninsulfonat (Wafex) und Na-Ligninsulfonat (vgl. Kapitel 5.4.1 und 5.4.2). So werden bei gleicher Probenbehandlung beispielsweise mit Wafex Molekulargewichte bis 180000 Dalton und mit Na-Ligninsulfonat bis 68000 Dalton (beide nach zweistündiger Inkubation mit 200 U/ml Laccase + 10 mM HBA) erreicht.

Ein Grund dafür ist, dass sich Indulin strukturbedingt von Wafex und Na-Ligninsulfonat unterscheidet. Dies liegt hauptsächlich am Holzaufschlussverfahren bei dem das durch den alkalischen Aufschluss gewonnene Indulin deutlich mehr in der chemischen Struktur verändert ist, als die durch den Säureaufschluss gewonnenen Ligninsulfonate. Die Laccase „erkennt“ die im wesentlichen unveränderten aromatischen Ringe des Indulins, die Seitenketten sind jedoch so weit verändert, dass eine enzymatisch katalysierte Reaktion nur in sehr geringem Maße stattfindet (LUNDQUIST et al. 1977, zitiert nach BERGMANN, 1998).

Darüber hinaus ist Indulin wasserunlöslich (siehe Kapitel 4.1.2), womit es im Gegensatz zu Ca-Ligninsulfonat (Wafex) und Na-Ligninsulfonat für die Laccase bzw. für das Laccase-Mediator-System im Wasser enthaltenden McIlvaine Puffer (siehe Kapitel 4.1.7.2) schwer erreichbar ist.

In einer weiteren Darstellung (Abbildung 31) sind die Molekulargewichte des Indulins innerhalb eines Behandlungszeitraums von 24 Stunden aufgeführt. Die Inkubationslösung der Laccase und Laccase-Mediator behandelten Proben enthält eine Laccasekonzentration von 200 U/ml. Als Mediatorkonzentrationen werden wieder 10 mM und 20 mM HBA gewählt.

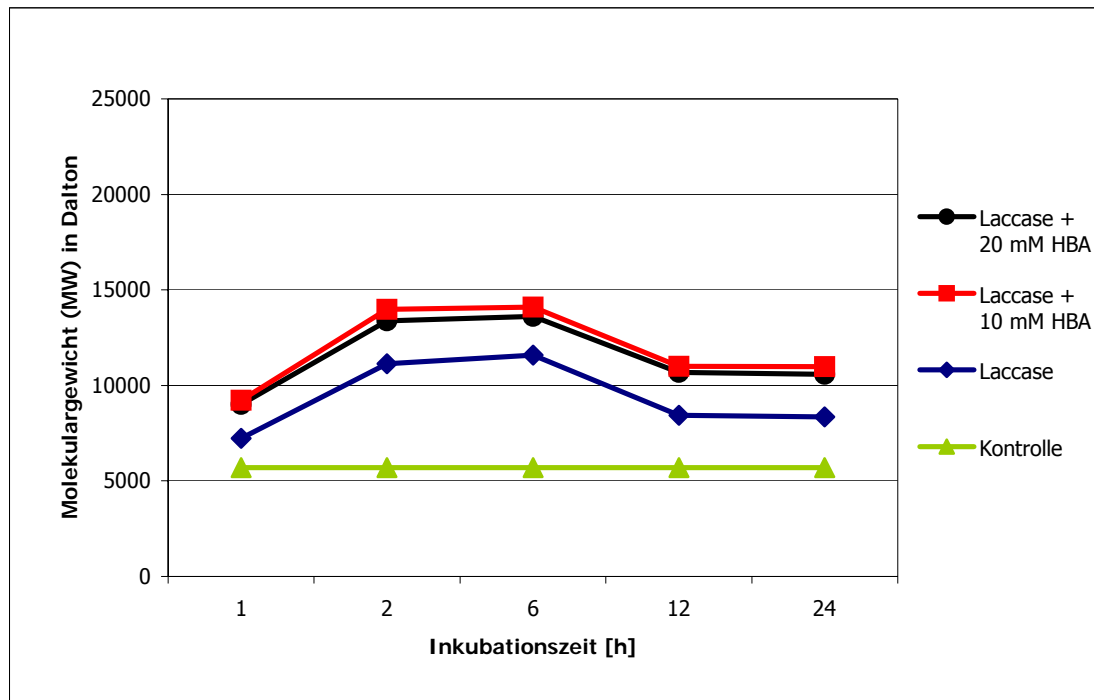


Abb. 31: Mittleres Molekulargewicht (Mw) von Kraftlignin (Indulin) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Es wird deutlich, dass bei allen Laccase und Laccase-Mediator behandelten Proben das höchste Molekulargewicht nach 6 Stunden erreicht ist. Die Werte steigen dabei in den ersten 2 Stunden verhältnismäßig stark an, um sich dann langsam den Höchstwerten von 11600 Dalton bei der Probe Laccase, 14100 Dalton bei der Probe Laccase + 10 mM HBA und 13600 Dalton bei der Probe Laccase + 20 mM HBA anzunähern. Werden die Indulinproben noch länger inkubiert, fallen die Molekulargewichte wieder ab. So werden Werte nach 12 und 24 Stunden gemessen, die in etwa auf dem gleichen Level wie nach einer Stunde Inkubation liegen. Über den gesamten Inkubationszeitraum liegen die Werte der Indulinprobe mit 200 U/ml Laccase und 10 mM über denen der mit 20 mM behandelten Probe. Die Kontrollproben bleiben über den gesamten Zeitraum wie zu erwarten konstant bei 5700 Dalton.

Die insgesamt betrachtet gegenüber den Wafex und Na-Ligninsulfonat Proben niedrigeren Molekulargewichte der Laccase und Laccase-Mediator behandelten Indulinproben scheinen hier, wie auch in den vorherigen Ausführungen diskutiert (siehe Seite 94), auf die andere chemische Struktur der Ligninmoleküle zurückzuführen zu sein (BERGMANN, 1998). Darüber

hinaus ist die Wasserunlöslichkeit des Indulins zu bedenken (siehe Kapitel 4.2.1 und Seite 94). Dennoch muss eine – wenn auch insgesamt schwache – Radikalisierung und anschließende Polymerisation des Kraftlignins stattfinden. Am deutlichsten trifft dies bei den Indulinproben zu, die mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA behandelt wurden. Ein positiver Effekt des Mediators ist demnach auch hier zu erkennen.

5.5 Chemische Analysen der Holzfasern

Das Fasermaterial (siehe Kapitel 4.1.1) wird nach den in Kapitel 4.2.6 beschriebenden Methoden in seiner chemischen Zusammensetzung analysiert. Die Untersuchungen der Holzfasern erfolgen vor und nach der Behandlung mit Laccase bzw. Laccase und Mediator, um eventuelle chemische Veränderungen durch die Inkubation deutlich zu machen. Die Fasern werden bei der mit „Lac.“ bezeichneten Probe mit 200 U/ml Laccase inkubiert, die Proben „Lac. + HBA“ mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA. Als Kontrollprobe (Bezeichnung „Kontrolle“) dienen Holzfasern, die in reinem McIlvaine Puffer (pH 6,0) behandelt wurden. Die Inkubationszeit beträgt 2 Stunden im 45 °C warmen Schüttelwasserbad. Die Ergebnisse der chemischen Untersuchung der nativen Holzfasern werden als „Ausgangsmaterial“ bezeichnet.

5.5.1 Bestimmung des Hemicellulosegehaltes

Die aus den analytisch bestimmten Pentosanwerten abgeleiteten Durchschnittswerte für den jeweiligen Anteil der Hemicellulosen in den verwendeten Holzfasern sind in Abbildung 32 dargestellt. Zur Ermittlung des Hemicellulosegehalts wird der Pentosangehalt bei der Holzart Kiefer nach HÄGGLUND (1939) mit 56 % am Gesamtanteil einberechnet (vgl. Kapitel 4.2.6.).

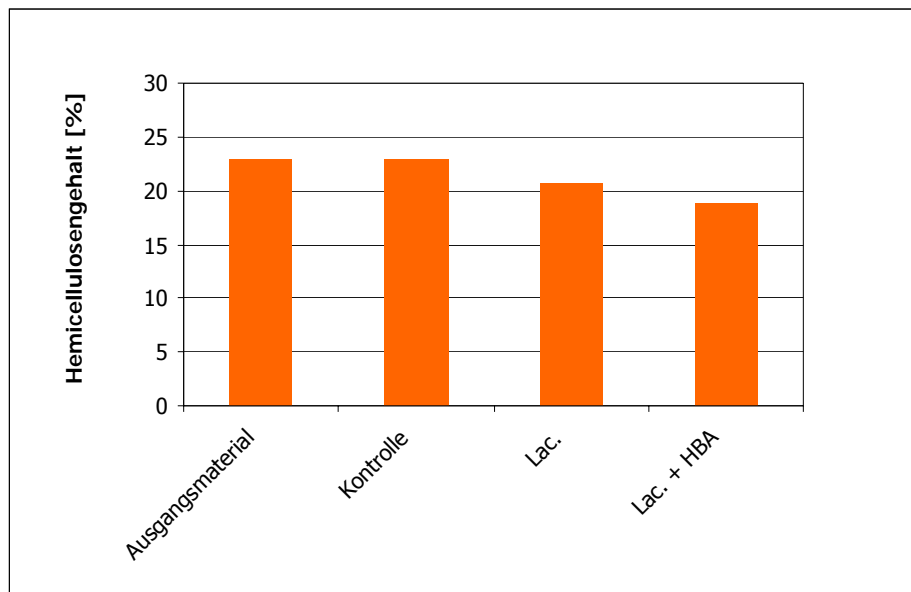


Abb. 32: Prozentualer Anteil der Hemicellulosen in verschiedenen behandelten Holzfasern

Bei der Betrachtung der Hemicellulosenwerte für die unbehandelten Holzfasern (Ausgangsmaterial) und die mit Puffer behandelten Fasern (Kontrolle) werden mit etwa 23 % gleich hohe Gehalte errechnet, worin der Pentosengehalt mit jeweils 12,9 % enthalten ist. Nach der Inkubation mit 200 U/ml Laccase beträgt der Hemicellulosegehalt 20,5 %. Bei der zusätzlichen Verwendung des Mediators HBA sinkt der Gehalt gegenüber der Laccase inkubierten Probe geringfügig und liegt bei 18 %. Eine Diskussion der Ergebnisse befindet sich in Kapitel 5.5.4 (siehe dazu Abbildung 35).

5.5.2 Bestimmung des Ligningehaltes

Abbildung 33 zeigt die Ligningehalte der nativen Holzfasern (Ausgangsmaterial), der Kontrollproben und der mit Laccase bzw. mit Laccase und Mediator behandelten Holzfasern.

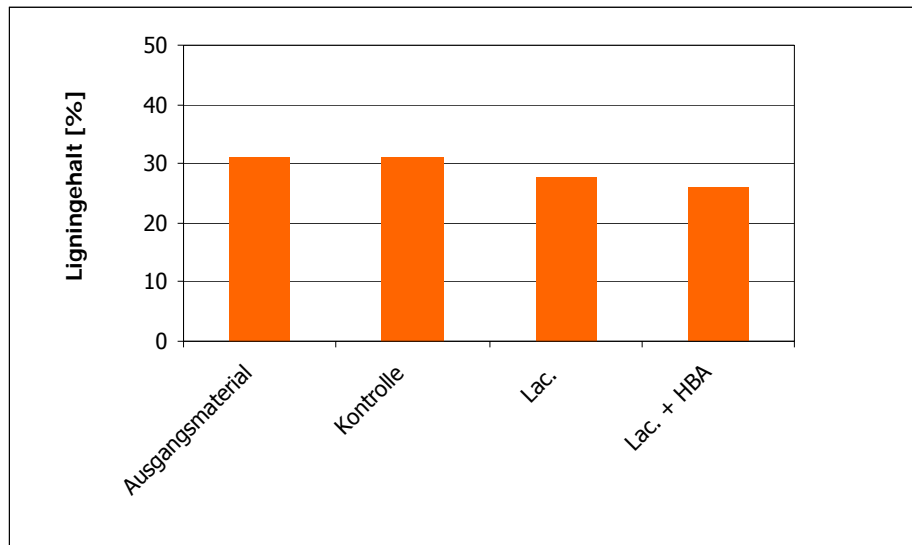


Abb. 33: Ligningehalt verschieden behandelter Holzfasern

Die Ligningehalte des Ausgangsmaterials und der Kontrollprobe liegen gleichauf bei 31 %. Bei der 2-stündigen Inkubation der Holzfasern mit Laccase reduziert sich der Ligningehalt auf etwa 27,5 %, der bei der Zugabe des Mediators HBA mit 26 % nochmals abnimmt (siehe Kapitel 5.5.4, Abbildung 35).

5.5.3 Bestimmung der Extraktstoffgehalte

In der folgenden Darstellung (Abbildung 34) sind die Extraktstoffgehalte der nativen und der verschieden behandelten Holzfasern aufgeführt.

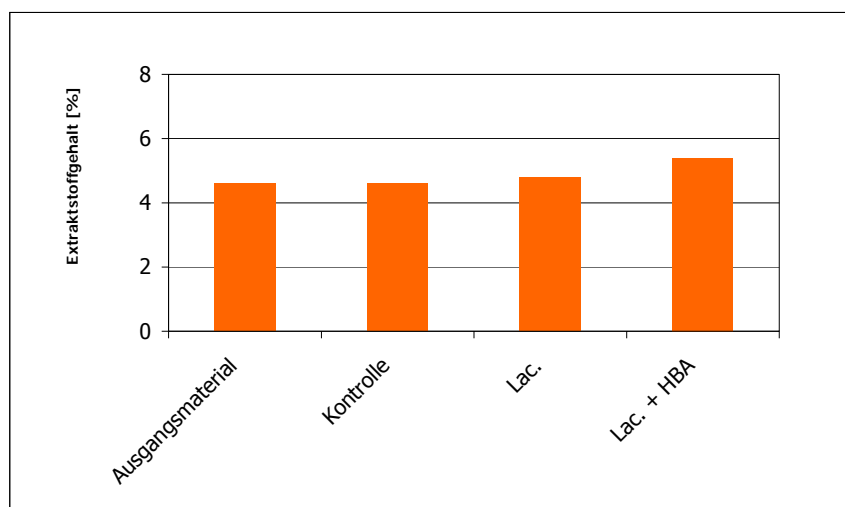


Abb. 34: Extraktstoffgehalte verschieden behandelter Holzfasern

Die Extraktstoffgehalte des Ausgangsmaterials und der Kontrolle sind, wie auch schon jeweils die Hemicellulosen- und Ligningehalte (siehe Abbildungen 32 und 33), gleich hoch. Sie betragen 4,6 %. Bei den Laccase und Laccase-Mediator behandelten Holzfasern werden leicht höhere Extraktstoffgehalte ermittelt, nämlich 4,8 % und 5,4 % (siehe Kapitel 5.5.4).

5.5.4 Zusammenfassung der chemischen Analysen

Wie im Kapitel 4.2.6 beschrieben, werden analytisch drei chemische Komponenten des Holzes quantifiziert: das Lignin, die Pentosane zur Berechnung der Hemicellulosen und die Extraktstoffe. Aus den dabei gewonnenen Ergebnissen lässt sich folglich die noch ausstehende Komponente – Cellulose – rechnerisch bestimmen. Die bisher beschriebenen Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung (35) unter Einbeziehung des Cellulosegehaltes zusammengefasst.

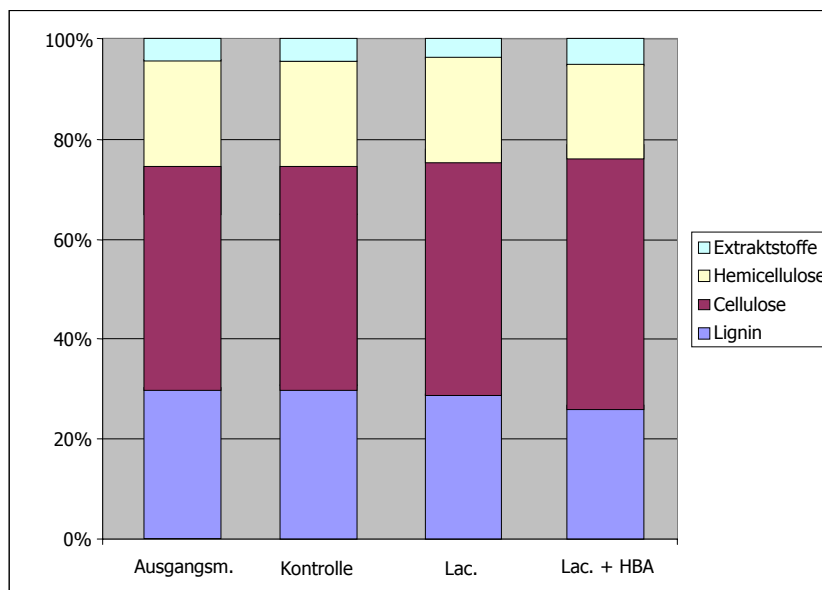


Abb. 35: Kumulative Darstellung der Holzbestandteile für die Baumart Kiefer

Da bei der Ermittlung der Hemicellulosen-, Lignin- und Extraktstoffgehalte der nativen Holzfasern (Ausgangsmaterial) und der in McIlvaine Puffer behandelten Holzfasern (Kontrolle) bei jeder chemischen Komponente identische Werte vorliegen, ergibt sich aus der Berechnung des Cellulosegehaltes ein Anteil von 41,4 %, um eine Zusammensetzung der Holzbestandteile von insgesamt 100 % zu erhalten. Dieser Wert deckt sich mit den Cellulosegehalten für Nadelvollhölzer, die von 40 % bis 50 % reichen (Fengel & Wegener, 1984). Zu beachten ist, dass es sich in diesem Fall um Holzfasern handelt, die durch den thermo-mechanischen Aufschluss gewonnen und dabei chemischen Veränderungen

ausgesetzt waren (vgl. Kapitel 3.5.2). Abweichungen in der prozentualen chemischen Holzzusammensetzung sind daher zu berücksichtigen.

Da die Hemicellulosen- und Ligningehalte der Holzfasern nach der Inkubation mit Laccase und Laccase-Mediator abnehmen und die Extraktstoffgehalte nur leicht zunehmen, steigen rechnerisch die Cellulosegehalte auf über 50 % an, was von natürlichem Standpunkt aus als unmöglich erscheint. Um diesen rechnerischen Fehler zu umgehen, hätte der Cellulosegehalt separat chemisch bestimmt werden müssen. Eine Aussage über den Cellulosegehalt nach einer Inkubation von Laccase bzw. Laccase und Mediator zu treffen, ist somit unter diesen Bedingungen nicht möglich.

Da die Analyseergebnisse der nativen Holzfasern (Ausgangsmaterial) und der in McIlvaine Puffer behandelten Holzfasern (Kontrollen) bei jeder chemischen Untersuchung identisch sind, kann festgehalten werden, dass eine Aufbewahrung der Holzfasern im Puffer unter Schütteln im 45 °C warmen Wasserbad keine Auswirkungen auf die chemische Zusammensetzung der Holzfasern hat.

Die Abnahme der Ligninwerte nach der Behandlung mit Laccase bzw. Laccase und Mediator (vgl. Abbildung 32) sind auf die ligninoxidierende Wirkung der Laccase zurückzuführen. Dabei katalysiert die Laccase das Lignin zu Ligninradikalen. Das hauptsächlich auf der Oberfläche der TMP-Holzfasern befindliche Mittellamellenlignin wird dabei aktiviert und aufgeraut (BERGMANN, 1998). Durch die Behandlung der Fasern mittels Nassinkubation in einer 150 ml Inkubationslösung und die spätere Waschung der Fasern mit bidestilliertem Wasser (vgl. Kapitel 4.2.6) können diese Ligninradikale sich von der Holzfaser gelöst haben und mit der Suspension bzw. dem Wasser entfernt worden sein, was sich durch einen sinkenden Ligningehalt bemerkbar macht. Durch den niedrigeren Wert bei der Inkubation mit Laccase und dem Mediator HBA kann darauf geschlossen werden, dass das Laccase-Mediator-System eine effektivere Aktivierung des Holzfaserlignins hervorrufen muss, als eine alleinige Inkubation mit Laccase. Dass bereits ein Ligninabbau während der 2 Stunden Inkubationszeit stattgefunden haben kann, wodurch ebenfalls sinkende Ligninwerte zu erklären wären, ist mit großer Sicherheit auszuschließen, da ein Ligninabbau durch Weißfäuleenzyme in der Regel erst nach mehreren Stunden und Tagen einsetzt (KIRK, 1980; SCHINDEL, 1999).

Die gegenüber dem Ausgangsmaterial und der Kontrollprobe leicht steigenden Extraktstoffgehalte bei den Laccase und Laccase-Mediator inkubierten Holzfasern können darin begründet liegen, dass durch die Aktivierung und Radikalisierung des Mittellamellenlignins auf der Holzfaseroberfläche bestimmte Ligninmoleküle chemisch so verändert werden, dass sie später bei der Extraktstoffbestimmung aus den Holzfasern gelöst werden und in den Extraktstoffgehalt mit einberechnet werden (RUTIAGA-QUIÑONES, 2001).

Letztlich bleibt die Betrachtung der Hemicellulosen in den Holzfasern, die durch die Behandlung mit Laccase und Laccase-Mediator prozentual abnehmen. Die Unterschiede

zwischen den Werten des Ausgangsmaterials bzw. der Kontrollprobe und den Laccase bzw. Laccase-Mediator behandelten Proben liegen bei 3 % bis 4 %. Eine Abnahme des Hemicellulosegehaltes kann daran liegen, dass durch die Aufrauung der Faseroberfläche durch das Einwirken der Laccase bzw. Laccase und Mediator kurzkettigen Hemicellulosemoleküle mit gelöst werden, die in die Fasersuspension geleitet werden und beim Trennen der Holzfasern und der Suspension mit ausgespült oder spätestens beim Auswaschen der Holzfasern von der Holzfaser entfernt werden. Ein Abbau der Hemicellulose kommt hierbei nicht in Frage, da zwar die Enzyme einiger Weißfäulepilzen auch die Polysaccharide angreifen (SCHMIDT, 1994), aber die 2-stündige Inkubationszeit wie bei dem Lignin für eine Abbaureaktion noch zu kurz ist (KIRK, 1980).

5.6 Untersuchung der Holzfasern mittels Rasterelektronenmikroskop (REM)

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie sollen morphologische Veränderungen von Laccase und Laccase-Mediator behandelten Holzfasern gegenüber den nativen Holzfasern kenntlich gemacht werden. Die nativen Holzfasern werden während des Produktionsprozesses in der MDF-Pilotanlage mit reiner McIlvaine Pufferlösung besprüht, die Laccase und Laccase-Mediator behandelten Fasern werden mit unterschiedlichen Laccase- und Mediatorkonzentrationen besprüht. Alle Proben werden 2 Stunden lang inkubiert (vgl. Kapitel 4.2.7).

Die in dieser Arbeit verwendeten Kiefernholzfasern wurden durch den thermo-mechanischen Aufschluss nach dem ASPLUND-Verfahren (Kapitel 3.3.2) gewonnen. Bei diesem Verfahren treten einige strukturelle und somit auch chemische Veränderungen des Holzes auf. So liegt die Temperatur durch die thermische Behandlung bei 160 °C bis 180 °C weitaus höher als die Glasübergangstemperatur des Lignins bei 123 °C, wodurch das vorwiegend in den Mittellamellen befindliche Lignin in eine glasartige Form übergeht und als inaktive Kruste auf der Faseroberfläche liegt. Die im Holz enthaltenen Cellulosefibrillen sind dadurch in der Ligninkruste eingebettet und nicht zugänglich. Jedoch bleiben alle Stoffe, die vorher für die feste Verbindung der Holzbestandteile verantwortlich waren, vorhanden. In dieser Form stehen sie jedoch nicht mehr für erneute Bindungen zur Verfügung (BERGMANN 1998).

In der folgenden Abbildung (36) ist die eben erwähnte Ligninkruste auf der Holzfaseroberfläche deutlich zu erkennen. Die glatte und glasartige Faseroberfläche lässt vermuten, dass alle Cellulosefibrillen dieser Faser durch das Mittellammellenlignin umschlossen sind. Das vorherige Aufsprühen des McIlvaine Puffers auf die Fasern hatte keinen Einfluss auf deren Beschaffenheit, denn bei einem Vergleich von nativen Fasern, die ohne jegliche Behandlung mit dem Rasterelektronenmikroskop aufgenommen wurden, wurden identische Abbildungen erhalten.

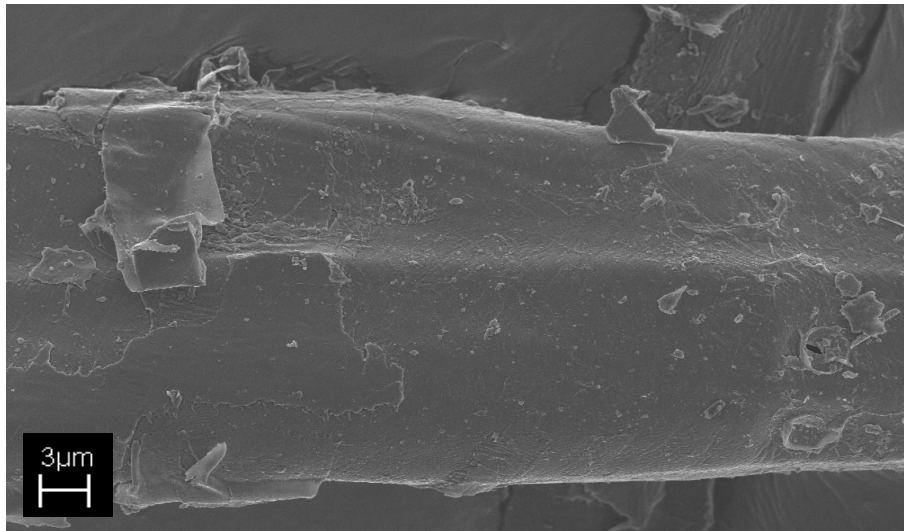


Abb. 36: REM-Aufnahme einer nativen Holzfaser im Puffer (TMP- Kiefernholz, Fa. Steico), 2410-fache Vergrößerung, Anregungsspannung 5,0 kV

Abbildung (37) zeigt eine REM-Aufnahme einer mit 100 U/ml Laccase inkubierten Holzfaser. Bei der Inkubation der Holzfasern mit Laccase dient das auf der Faseroberfläche liegende Lignin dem Enzym als Substrat (KHARAZIPOUR & HÜTTERMANN, 1993). In den katalytischen Reaktionen der Laccase findet eine Reaktivierung des inerten Lignins statt, was bedeutet, dass der Lignin-Cellulosekomplex modifiziert wird (BERGMANN, 1998). BERGMANN (1998) beschreibt weiterhin, dass es bei der Aktivierung des Lignins neben einer Freilegung der reaktionsfähigen Gruppen zu einer Zunahme der Sauerstoffgruppen und einer Radikalisierung des Ligninmoleküls kommt und somit das Lignin auf der Faseroberfläche aufgeraut wird und sich teilweise von der Faser ablöst. Bei dem Vergleich dieser mit der vorherigen Aufnahme (Abbildung 36), lässt sich durch die Einwirkung der Laccase nach 2 Stunden Inkubation eine wellenartige Struktur erkennen. Dies scheint ein Anfang eines Aktivierungs- und Lösungsprozess des Lignins von den Cellulosefibrillen zu sein.

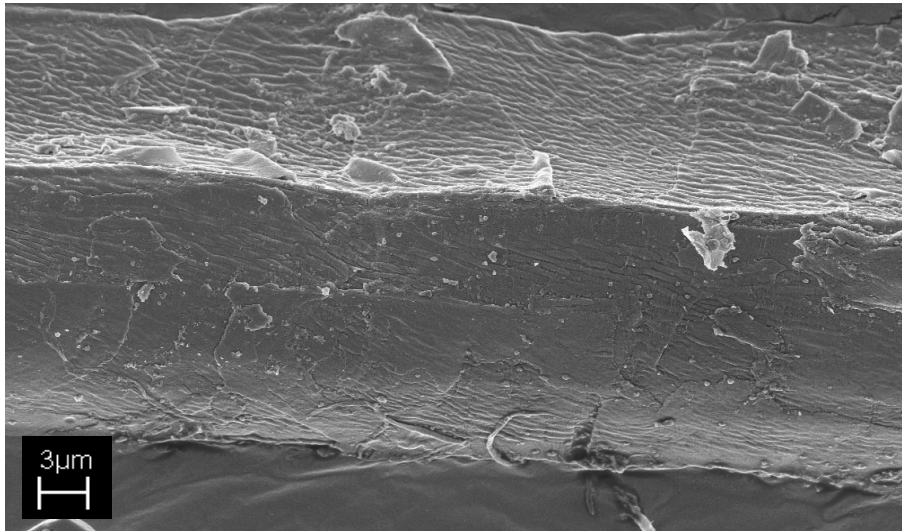


Abb. 37: REM-Aufnahme einer mit 100 U/ml Laccase inkubierten Holzfaser, 3430-fache Vergrößerung, Anregungsspannung 5,0 kV

In einer weiteren Abbildung (38) ist eine Faser dargestellt, die mit 200 U/ml Laccase inkubiert wurde. Wie bei der mit 100 U/ml inkubierten Faser (siehe Abbildung 37) ist die wellenartige Struktur zu erkennen. Darüber hinaus ist erkennbar, wie sich durch die höhere Laccasekonzentration bei gleichen Versuchsbedingungen größere Fraktionen der Ligninkruste von den Cellulosefibrillen abtrennen.

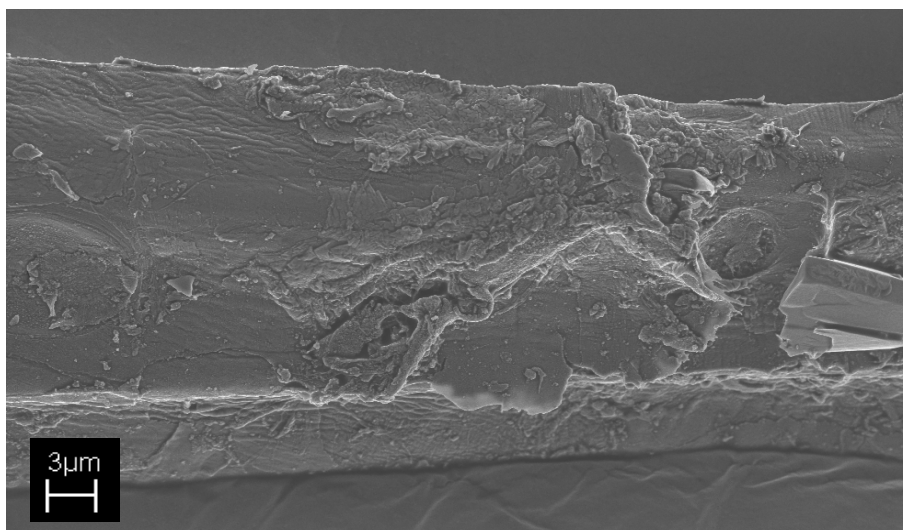


Abb. 38: REM-Aufnahme einer mit 200 U/ml Laccase inkubierten Holzfaser, 3090-fache Vergrößerung, Anregungsspannung 5,0 kV

Ziel dieser Dissertation ist es u. a. durch den Gebrauch von Mediatoren bei der enzymatischen Aktivierung der Holzfaseroberfläche eine stärkere Radikalisierung der Ligninmoleküle zu erreichen. Die Auswirkungen des Mediators im Vergleich zu den nur mit Laccase behandelten Holzfasern soll in den nächsten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen veranschaulicht werden.

Bei dem für diese Versuche verwendeten Mediator handelt es sich um HBA. Dieser wurde mit einer Konzentration von 10 mM in die Laccase-McIlvaine Pufferlösung aufgelöst. Zunächst ist eine Holzfaser abgebildet (Abbildung 39), die mit 100 U/ml Laccase und 10mM Mediator HBA inkubiert wurde. Auf den ersten Blick fallen im Vergleich zur REM-Aufnahme in Abbildung 37 (Inkubation mit 100 U/ml Laccase) keine größeren Unterschiede an der Faseroberfläche auf. Die wellenartige Struktur ist auch hier vorhanden und auch kleinere Ligninbestandteile scheinen sich in der Ablösung von der Holzfaseroberfläche zu befinden. Ein zusätzlicher Effekt durch die Zugabe des Mediators scheint also – zumindest unter diesen Bedingungen - nicht deutlich genug erkennbar zu sein.

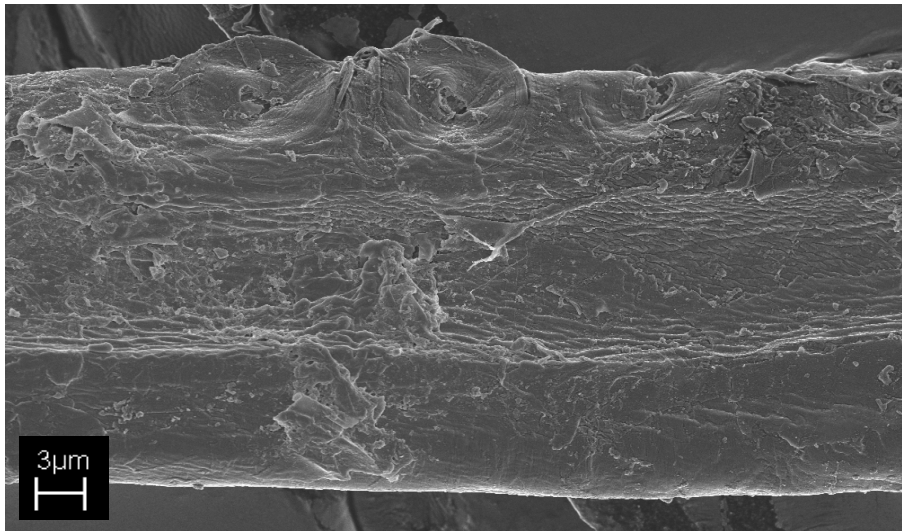


Abb. 39: REM-Aufnahme einer mit 100 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierten Holzfaser, 2460-fache Vergrößerung, Anregungsspannung 5,0 kV

Doch zeigen sich in Abbildung (40) entscheidende Veränderungen in der Fasermorphologie. Anstelle einer Holzfaser sind hier mehrere Fasern aufgenommen. (Diese Änderung ist rein probentechnisch bedingt und führt zu keiner Veränderung der Grundaussage.) So sind nun bei den mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierten Fasern deutlich Ligninbestandteile zu beobachten, die sich im Ablösungsprozess von den Cellulosefibrillen befinden. Auch die einzelnen Cellulosefibrillen werden sichtbar, die in der REM-Aufnahme strangartig und horizontal verlaufen.

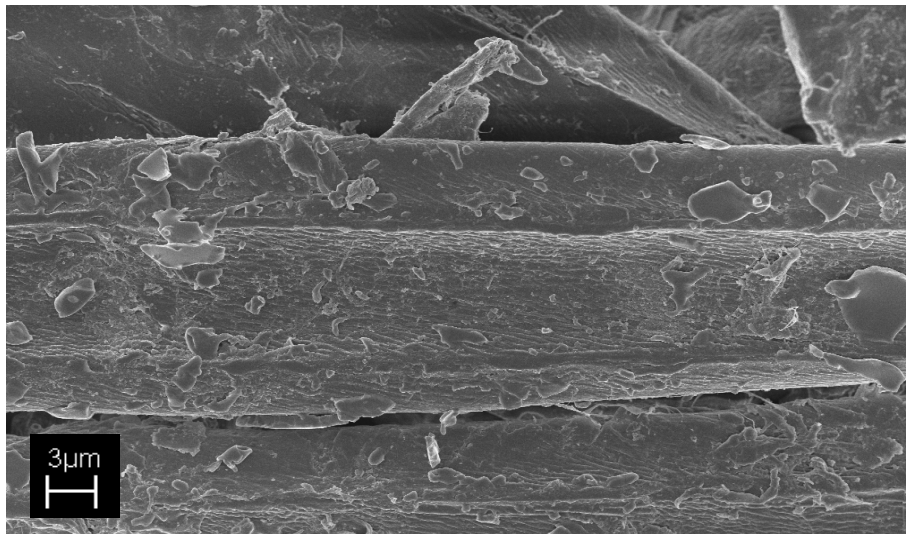


Abb. 40: REM-Aufnahme einiger mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierten Holzfasern, 2170-fache Vergrößerung, Anregungsspannung 5,0 kV

Um näher auf einen Abschnitt bei einer der oben beschriebenen Holzfaser (siehe Abbildung 40) einzugehen, wird dieser in Abbildung (41) vergrößert dargestellt. Es wird deutlich, wie die ursprünglich glasartige und glatte Ligninkruste auf der Holzfaseroberfläche (siehe Abbildung 36) durch die Einwirkung der Laccase und des Mediators aufgeraut wurden. Dabei stehen einzelne Ligninbestandteile stiftartig von der Faser ab.

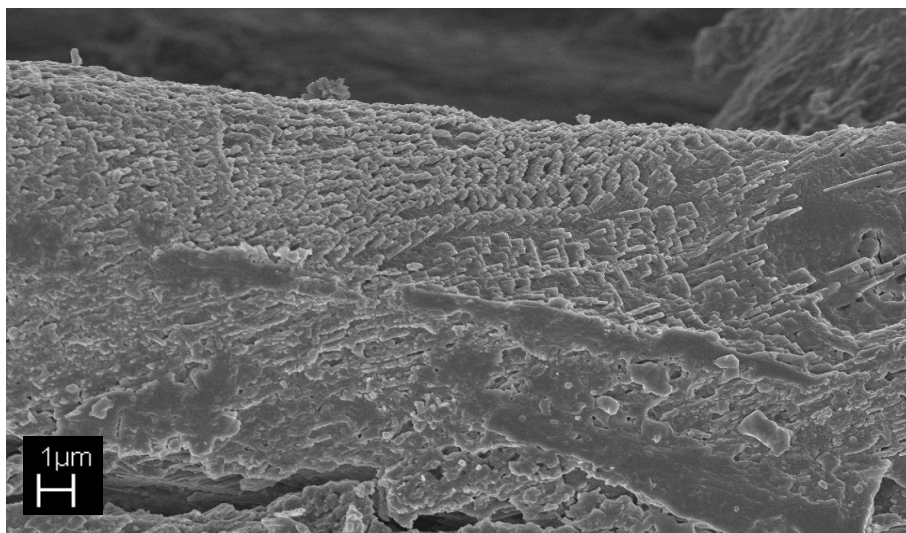


Abb. 41: REM-Aufnahme einer mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierten Holzfaser, 5200-fache Vergrößerung, Anregungsspannung 5,0 kV

Mit Hilfe der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen können wesentliche Erkenntnisse über die Einwirkung von Laccase bzw. Laccase und Mediator auf die Holzfaseroberflächenstruktur gewonnen werden. Grundsätzlich kann bestätigt werden, dass das auf der Faser befindliche, verkrustete Mittellammellenlignin der Laccase als Substrat dient. Nach KHARAZIPOUR (1996) laufen dabei auf der Grundlage der Reaktionen zwischen Laccasen und Ligninen (HIROI und ERIKSON, 1976; HÜTTERMANN et al., 1977, 1981, 1989 b und c; JANSHEKAR et al., 1982; HAARS et al., 1983, 1984, 1987; HAEMMERLI et al., 1986; TROJANOWSKI et al., 1987, GOMEZ-ALARCO, 1991; BOURBONNAIS und PAICE, 1992) folgende Reaktionen parallel ab: Aktivierung des Lignins, Oxidation, Polymerisation, Teilabbau des freigelegten Lignins und Lösung der Bindungen zwischen Lignin und Cellulosefibrillen des Lignocellulosekomplexes.

Die deutlichsten Veränderungen der Holzfaseroberfläche der mit unterschiedlichen Laccase- und Laccase-Mediatorkonzentrationen inkubierten Fasern ergeben sich bei den Proben, die mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA behandelt wurden. Da bei der Inkubation der Holzfasern alle oben genannten Reaktionen parallel ablaufen, so sollte für die Erfüllung der Zielsetzung dieser Dissertation eine optimale Zusammensetzung der Inkubationslösung und eine optimale Inkubationszeit der Holzfasern gewählt werden.

Für eine spätere Verklebung des Lignins beim Verpressen zu Mitteldichten Faserplatten ist sicherzustellen, dass eine höchstmögliche chemische Modifizierung und Radikalisierung der Fasern, aber die geringstmögliche Ablösung der Ligninmoleküle von der Faseroberfläche stattfindet (KÜES et al., 2007). Besonders bei der Inkubation der Holzfasern im Nassverfahren (vgl. Kapitel 3.8.2) ist dies von großer Bedeutung, da bei der Entwässerung der inkubierten Holzfasern zahlreiche Ligninmoleküle mit ausgespült werden können. Aber auch bei der Sprühinkubation sollten so wenig wie möglich Ligninmoleküle gelöst werden, die für eine spätere Verklebung der Fasern untereinander nicht mehr ausreichend Haftungsvermögen im Faserverbund bieten könnten.

Ob die hier gewählte Inkubationszeit von 2 Stunden für eine effiziente Aktivierung des Lignins auf der Holzfaseroberfläche ausreicht oder bereits zu lang ist, wird anhand anderer Untersuchungsmethoden, wie zum Beispiel die photometrische Bestimmung der freigesetzten Hydroxyl-Gruppen in der Suspension inkubierter Holzfasern (Kapitel 5.7), der Bestimmung freier Radikale auf der Holzfaseroberfläche mittels Elektronen-Spin-Resonanz (Kapitel 5.8), sowie der Charakterisierung funktioneller Gruppen mittels Fourier-Transform-Infrarot Spektroskopie (Kapitel 5.10) bis hin zu den mechanisch-technologischen Eigenschaftsprüfungen der Laccase und Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten (Kapitel 5.12) gezeigt.

5.7 Phenolische Hydroxyl-Gruppen Laccase inkubierter Holzfasern

Die Reaktivität des Lignins hängt stark vom Gehalt der phenolischen Hydroxylgruppen ab, an denen durch Ionisation zahlreiche Reaktionen am Ligninmolekül stattfinden (ADLER, 1977). Die dominierende Rolle der phenolischen Hydroxylgruppen zeigt sich zum Beispiel beim Holzaufschluss und bei Bleichungsprozessen (BERGMANN, 1998).

Das Lignin auf der Faseroberfläche dient der Laccase bei der Inkubation als Substrat. Wie bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen im Kapitel 5.6 beschrieben, werden Reaktionsprodukte gebildet, die sich auf der Faseroberfläche befinden und sich in einem Ablösungsprozess befinden. Zur Untersuchung des Gehaltes an phenolischen Hydroxyl-Gruppen werden anders als für die REM Aufnahmen nicht mittels Sprühverfahren inkubiert, sondern im Nassverfahren. Damit wird sichergestellt, dass sich die von der Faseroberfläche lösenden Hydroxyl-Gruppen in die Inkubationslösung gehen, die anschließend photometrisch analysiert werden sollen. So können die dem Lignin entstammenden phenolische Hydroxyl-Gruppen in der Inkubationslösung bei einer Wellenlänge von 280 nm als Extinktion abgelesen werden (KHARAZIPOUR & HÜTTERMANN, 1993, KHARAZIPOUR, 1996).

Das hierbei verfolgte Ziel soll zunächst sein, einen Zeitpunkt zu bestimmen, an dem die meisten phenolischen Gruppen von der Holzfaseroberfläche gelöst werden.

5.7.1 Bildung von phenolischen Hydroxyl-Gruppen in Abhängigkeit von der Laccase- und Mediatorkonzentration

In folgender Abbildung (42) sind die Extinktionen der Hydroxyl-Gruppen dargestellt, die sich während einer 24 stündigen Inkubationszeit von der Oberfläche der Laccase und Laccase-Mediator behandelten Holzfasern gelöst haben. Dabei variierte die Laccasekonzentration zwischen 50, 100 und 200 U/ml, die Mediatorkonzentration betrug 10 mM. Bis zur achten Stunde wurden aus der Fasersuspension stündlich Proben zur Bestimmung der Extinktion entnommen. Danach erfolgte noch eine Messung nach 24 Stunden Inkubationszeit. Ebenso wurden die Extinktionen einer Kontrollprobe gemessen, bei der es sich unter gleichen Versuchsbedingungen um lediglich mit McIlvaine Puffer behandelte Holzfasern handelte. Bei der Überprüfung einer Holzfaserprobe, zu der in den Puffer 10 mM Mediator HBA hinzugegeben und ebenfalls 24 Stunden behandelt wurde, konnten keinerlei Unterschiede in der Extinktion zur eigentlichen Kontrollprobe festgestellt werden. Bei dem Versuch, eine Extinktion aus einer Pufferlösung zu ermitteln, in der sich alleine 10 mM Mediator HBA befanden, zeigte keinerlei Absorption im Photometer an. Somit konnte ausgeschlossen

werden, dass durch die Anwesenheit des Mediators Extinktionen auftreten, die zusätzlich zu den Extinktionen der gelösten Hydroxyl-Gruppen der Holzfasern gemessen und folglich die Ergebnisse verfälschen würden. Auch bei der Überprüfung von Laccase und Laccase-Mediator Pufferlösungen, in die keine Holzfasern gegeben wurden, konnten keine Absorptionen gemessen werden. Letztendlich war für die Interpretation der folgenden Ergebnisse gesichert, dass bei der photometrischen Bestimmung in der Suspension von Laccase und Laccase-Mediator inkubierten Holzfasern ausschließlich die gelösten Hydroxyl-Gruppen absorbiert wurden und dass mit keinen Störfaktoren durch die Laccase bzw. den Mediator zu rechnen war.

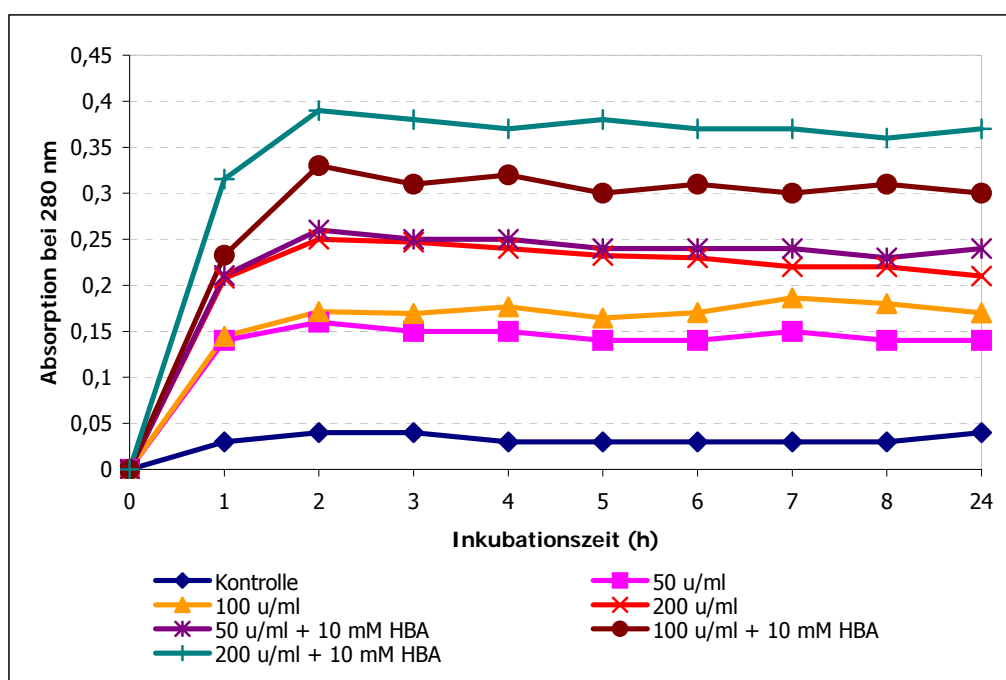


Abb. 42: Photometrische Messung der Hydroxyl-Gruppen in der Fasersuspension in Abhängigkeit von der Laccase- und Mediatorkonzentration

Bei der Betrachtung der Extinktionskurven in Abbildung 42 fällt auf, dass Extinktionswerte der Laccase und Laccase-Mediator behandelten Proben bereits in der ersten Stunde der Inkubation stark ansteigen. Nach der zweiten Stunde Inkubation werden nochmals leicht höhere Werte gemessen. Im weiteren Verlauf können dann keine Steigerungen der Extinktionen mehr festgestellt werden, vielmehr schwanken die Werte um den jeweiligen Höchstwert der Proben nach 2 Stunden Inkubationszeit. Vergleicht man die Proben untereinander, wird deutlich, wie unterschiedlich die Freisetzung der phenolischen Hydroxyl-Gruppen zu sein scheint. Demnach steigen die Extinktionswerte mit zunehmender Laccasekonzentration an. Zwar liegen die Werte bei 100 U/ml Laccase nur leicht über denen der Werte bei 50 U/ml, doch fällt der Unterschied zwischen den Proben mit 200 U/ml

Laccase und den Proben mit 100 U/ml Laccase größer aus. So liegen die Extinktionswerte bei der Verwendung von 200 U/ml Laccase im Schnitt 66 % über den Werten bei der Verwendung von 100 U/ml. Ein besonderer Effekt ist bei den Proben zu erkennen, die zusätzlich mit 10 mM Mediator inkubiert wurden. Die Extinktionen sind deutlich stärker als die der Laccase behandelten Proben. Bereits die Zugabe des Mediators in die Inkubationslösung mit 50 U/ml verursachen eine Freisetzung von Hydroxyl-Gruppen, deren Absorption genauso hoch ist, wie bei den Proben, die mit 200 U/ml Laccase inkubiert wurden. Die höchsten Extinktionswerte werden mit der Probe erreicht, die mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA behandelt wurde. Dabei wird der Maximalwert von fast 0,4 nach 2 Stunden Inkubation gemessen (siehe Abbildung 42). Im weiteren Inkubationsverlauf liegen die Extinktionen leicht unterhalb dieses Wertes. Bei der Betrachtung der Extinktionswerte der Kontrollprobe ist nach 2 Stunden Behandlung im Puffer eine leichte Steigerung von ursprünglich 0,00 auf 0,04 zu erkennen. Im weiteren Verlauf der 24 Stunden schwanken die Werte um 0,04. Da bei der Kontrollprobe weder Laccase noch Mediator hinzugegeben wurden, kann es sich bei den leicht auftretenden Extinktionen um eine geringe Menge an Holzbestandteilen phenolischen Charakters handeln, die durch die Behandlung unter den in Kapitel 4.2.8 beschriebenen Versuchsbedingungen, wie die Aufbewahrung im 45 °C warmen Schüttelwasserbad, von der Faseroberfläche gelöst haben können. Da der Extinktionswert nach 2 Stunden über die ganze Zeit hinweg konstant bleibt, kann davon ausgegangen werden, dass keine weitere Ablösung von Fraktionen an der Faseroberfläche stattgefunden hat.

Aus den gewonnenen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass durch die Verwendung des Mediators HBA deutlich mehr phenolische Hydroxyl-Gruppen von der Holzfaseroberfläche gelöst werden können als durch die Einwirkung der Laccase alleine. Unter den hierzu in Kapitel 4.2.8 beschriebenen Versuchsbedingungen erweist sich als optimale Zusammensetzung der Inkubationslösung zur Aktivierung des Faserflächenlignins ein Laccase-Mediator-Puffergemisch, welches im McIlvaine Puffer eine Laccasekonzentration von 200 U/ml und eine Konzentration von 10 mM des Mediators HBA beinhaltet. Doch auch mit der alleinigen Verwendung der Laccase können besonders bei einer Konzentration von 200 U/ml gute Ergebnisse erzielt werden. Höhere Extinktionen mit steigenden Laccasekonzentrationen bei der Inkubation von Holzfasern konnten auch durch BERGMANN (1998) nachgewiesen werden. Dort wurde festgestellt, dass innerhalb einer 96-stündigen Inkubationszeit die Extinktionen bereits in den ersten Stunden stark ansteigen und im weiteren Verlauf ab 24 Stunden auf einem Niveau blieben. BERGMANN (1998) schreibt folglich, dass eine Inkubation von Holzfasern mit Laccase unabhängig von der Enzymaktivität 24 Stunden nicht überschreiten sollte und dass eine optimale Inkubationszeit bei hohen Enzymkonzentrationen wahrscheinlich weit unter 24 Stunden liegen soll. So kann mit den Versuchen in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die optimalen Zeiten für die

Inkubation von Holzfasern mit Laccase und auch Laccase-Mediator maximal 2 Stunden betragen sollte. In dieser Zeit werden die meisten phenolischen Hydroxyl-Gruppen von der Faseroberfläche gelöst und können somit im weiteren Sinne für eine Verklebung der aktivierten Holzfasern zu Mitteldichten Faserplatten genutzt werden. Eine längere Inkubationszeit bewirkt keine zusätzliche Ablösung von phenolischen Hydroxyl-Gruppen mehr. So kann davon ausgegangen werden, dass die enzymatische Aktivierung des Lignins auf der Faseroberfläche unter diesen Versuchsbedingungen ausgeschöpft zu sein scheint. Zusätzlich könnte als weitere Erklärung für die Beendigung der Ablösung von Hydroxyl-Gruppen nach 2 Stunden sein, dass die während der Inkubationszeit sich in der Ablösung befindlichen Gruppen wieder erneut untereinander polymerisieren und somit ein Verklebungsprozess einsetzt.

Weiterhin muss bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden, dass die Versuchsdurchführung im Nassinkubationsverfahren (vgl. Kapitel 3.8.2) stattfand, wodurch sich die gelösten phenolischen Hydroxyl-Gruppen in der Fasersuspension befanden und bei der Probennahme mit entnommen und im Photometer absorbiert werden konnten. Bei dem Sprühinkubationsverfahren (vgl. Kapitel 3.8.1), bei der die Fasern lediglich mit der Inkubationslösung benetzt werden, ist ebenfalls davon auszugehen, dass Ligninbestandteile auf der Faseroberfläche aktiviert und sich im Anlösungsprozess befinden, doch kann dies mit der hier angewandten photometrischen Methode nicht nachgewiesen werden.

5.7.2 Einfluss des pH-Wertes der Inkubationslösung auf den Gehalt an phenolischen Hydroxyl-Gruppen

Während in Kapitel 5.7.1 die Extinktionen der von den inkubierten Holzfasern gelösten phenolischen Hydroxyl-Gruppen bei unterschiedlichen Laccase- und Mediatorkonzentrationen verglichen werden, ist in weiteren Versuchen untersucht worden, ob der pH Wert der Inkubationslösung einen Einfluss auf die Ablösung von phenolischen Hydroxyl-Gruppen nimmt.

Laut BERGMANN (1998) hat eine Variation des pH-Wertes während der Inkubation der Holzfasern unterschiedliche Auswirkungen auf die Laccase und das Substrat. Demnach soll eine pH-Erhöhung eine Löslichkeitsänderung des Ligninmoleküls bewirken und einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Nach WIENHAUS et al. (1978) spiegeln zwar niedrige pH-Werte eher das pH-Verhältnis im nativen Holz wieder, sie wirken sich jedoch ebenfalls negativ auf die Enzymaktivität und auf die Faserstruktur aus.

In Abbildung 43 sind die Ergebnisse der Extinktionsmessungen der Proben in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt, deren Extinktionen bei den vorherigen Ausführungen am höchsten sind. Es handelt sich hierbei um die Proben, bei denen 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA verwendet wurden. Zuvor bei einem pH-Wert von ausschließlich 6,0 in der Laccase-Mediator Pufferlösung, wurden die pH-Werte im Bereich von 4,5 bis 7,5 variiert.

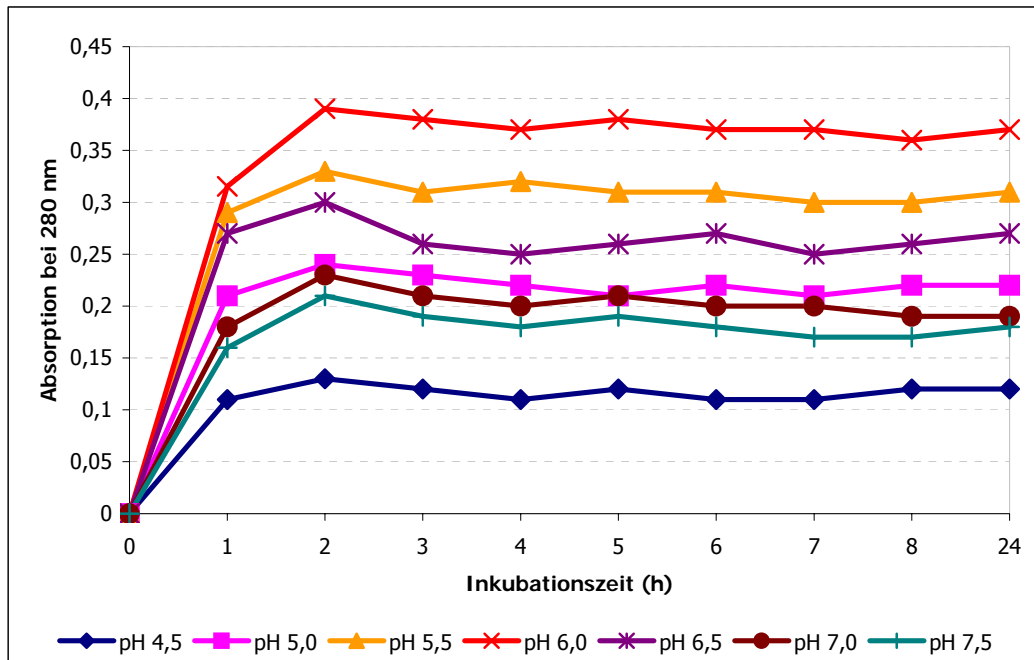


Abb. 43: Photometrische Messung der Hydroxyl-Gruppen in der Fasersuspension in Abhängigkeit des pH-Wertes (Laccasekonzentration 200 U/ml, Mediatorkonzentration 10 mM)

Sofort wird deutlich, dass die Extinktionswerte der Proben bei einem pH-Wert von 6,0 mit etwa 0,4 am höchsten sind und diese wie schon in der vorherigen Untersuchung nach 2 Stunden Inkubationszeit erreicht werden (vgl. Kapitel 5.7.1, Abbildung 42). Auch bei den Proben, die bei anderen pH-Werten inkubiert wurden, werden die höchsten Extinktionen nach 2 Stunden gemessen. Danach ändern sich die Werte kaum, vielmehr schwanken sie um den Höchstwert. Auffällig ist, dass bei den Proben mit dem niedrigsten pH-Wert (4,5) und auch bei denen mit dem höchsten (7,5) die niedrigsten Extinktionswerte gemessen werden. Bei pH 4,5 beträgt die Absorption maximal 0,13 und bei pH 7,5 0,22. Bei den pH-Werten 5,0 und 7,0 treten sehr ähnliche Extinktionen auf, es sind maximal 0,24 und 0,23. Höhere Extinktionen werden letztlich nur noch bei den pH-Werten um 6,0 ermittelt werden, bei pH 5,5 eine Extinktion von 0,33 und bei pH 6,5 eine Extinktion von 0,3.

Die Ergebnisse der Extinktionsmessung aus der Fasersuspension mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierter Holzfasern bei unterschiedlichen pH-Werten machen deutlich, dass der für die Aktivierung des Lignins auf der Holzfaseroberfläche optimale pH-Bereich um 6,0 liegen muss. So muss die hier im McIlvaine Puffer verwendete Laccase mit, aber auch ohne

Mediator bei pH 6,0 die höchstmögliche Aktivierung des Oberflächenlignins auf den Kiefernholzfasern bewirken und dabei die phenolischen Hydroxyl-Gruppen von den Fasern lösen. Bei einer pH-Wertverschiebung in den sauren oder alkalischen Bereich werden wesentlich weniger Extinktionen gemessen. Diese Ergebnisse decken sich auch mit denen in Kapitel 5.3.2, in dem sich für die *Novozym* Laccase ein pH-Optimum und eine pH-Stabilität zwischen 6,0 und 6,5 ergibt. Im weiteren Sinne sind auch die Angaben der Fa. *Novozymes* zu der hier verwendeten Laccase *Novozym* 51003 vergleichbar (NOVOZYMES, 2003). Dort ist beschrieben, dass diese Laccase unabhängig vom Substrat über die höchste Aktivität in einem pH-Bereich von 4,5 bis 6,0 verfügt. Als Beispiel sind TMP-Buchenfasern aufgeführt, bei denen die Laccase zur Inkubation ihre höchste Aktivität zwischen einem pH-Wert von 5,0 und etwa 6,5 hat.

Für die weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit kann somit gefolgert werden, dass möglichst ein Laccase bzw. Laccase-Mediator Puffergemisch verwendet werden sollte, das einen pH-Wert von 6,0 aufweist.

5.8 Bestimmung freier Radikale auf der Oberfläche der Holzfasern mittels Elektronenspin Resonanz-Spektroskopie (ESR)

Die durch die Inkubation der Holzfasern mit Laccase bzw. Laccase-Mediator gebildeten freien Radikale sind bei der Herstellung bindemittelfreier Faserplatten ein wesentlicher Faktor, da die eigentliche Vernetzung der Holzfasern auf ihrem Reaktionsmechanismus beruht (BERGMANN, 1998). Im natürlich gewachsenen Holz kommen freie Radikale nicht vor (IFJU et al. 1980), sondern die Radikalbildung findet erst statt, wenn das Holz bestimmten Chemikalien, der Einwirkung durch Pilze oder Enzyme, elektromagnetischer Strahlung oder physikalisch-mechanischem Stress ausgesetzt ist (HON et al., 1981). Dabei sind einige Radikale sehr stabil, andere dagegen sehr instabil, insbesondere gegenüber Sauerstoff. Nach HON (1983) entstammen die freien Radikale im Holz dem Lignin, nicht aber der Cellulose. Durch das thermo-mechanische Aufschlussverfahren (TMP-Verfahren, siehe Kapitel 3.5.2) werden die Holzfasern im Mittellamellenbereich getrennt. Durch die Überschreitung der Glasübergangstemperatur bei 123 °C und die zusätzliche mechanische Bearbeitung wird das Lignin der Mittellamelle verändert. Bei diesem Vorgang entstehen im Lignin elektrische und statische Ladungen, wobei sich durch die Abtrennung der Seitenketten des Lignins freie Radikale bilden. Diese Radikale können kurzfristig sehr instabile Peroxy-Radikale bilden, die innerhalb kurzer Zeit weiterreagieren. Weiterhin werden auch Phenoxy-Radikale gebildet, die in der Regel dauerhaft und stabil sind und mittels ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden können (HON, 1983).

Für die Untersuchungen an Laccase bzw. Laccase-Mediator inkubierten Holzfasern in dieser Dissertation bietet die Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) eine Möglichkeit, einen Nachweis über das Vorhandensein bzw. die Aktivierung freier Radikale auf der Holzfaseroberfläche zu erbringen.

Wie in Kapitel 4.2.9 erwähnt, wurden die ESR-Spektren teilweise am Institut für Biophysik des Uniklinikums Saarland und teilweise am Institut für Anorganische Chemie der Universität Göttingen angefertigt. Dabei sind alle Spektren unter identischen Bedingungen aufgenommen worden, jeweils mit einem großen Scan (400 Gauss -4400 Gauss, dargestellt 500 Gauss - 4400 Gauss) und kleinem Scan (200 Gauss).

Mit dem weiten Feldbereich wird geprüft, ob irgendwelche charakteristischen Metallsignale vorhanden sind (z. B. Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+}). Der kleine Scan wird zur Analyse der Intensität des organischen Radikals benutzt. Zur Spektrenaufnahme wurden mehrere Scans akkumuliert, so dass sich Messzeiten von maximal 3000 sec. für die einzelnen Spektren ergaben. Alle Spektren sind normiert dargestellt, d. h. durch die Anzahl der Additionen bei der Spektrenaufnahme dividiert worden.

In Abbildung 44 sind die ESR-Spektren der Kontrollprobe (in McIlvaine Puffer behandelte Holzfasern) und von Laccase-Mediator inkubierten Holzfasern dargestellt.

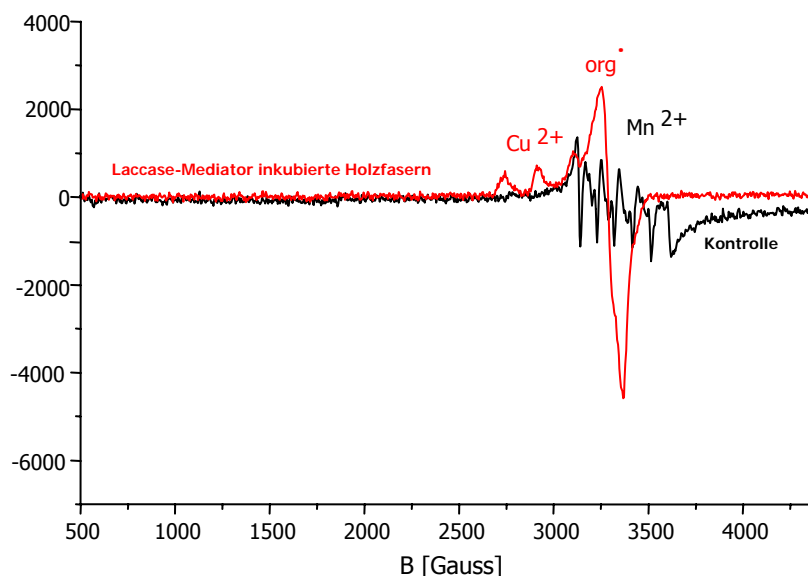


Abb. 44: ESR-Spektrum einer Holzfaserkontrolle und Laccase-Mediator inkubierter Holzfasern

In der Kontrollprobe sind Mn^{2+} -Signale vorhanden, welche sich im Bereich von 3000 Gauss und 3750 Gauss befinden. Die Anhäufung der Peaks in diesem Bereich zeigt auch, dass sich

organische Radikale auf der Holzfaseroberfläche befinden. Ihr Vorhandensein liegt im thermo-mechanischem Aufschluss begründet. Bei dem ESR-Spektrum der Laccase-Mediator behandelten Holzfasern sind Cu^{2+} -Signale, aber keine anderen Metalle erkennbar. Die Cu^{2+} -Signale stammen von der Laccase. Der wesentliche Unterschied zu der Kontrollprobe ist der stark ausgeprägte Peak bei 3250 Gauss, der auf eine hohe Anzahl von freien, organischen Radikalen auf der inkubierten Faser Oberfläche zurückzuführen ist. Es handelt sich hierbei um Phenoxy-Radikale. Der Verlauf des Peaks ist typisch für Laccase inkubierte Holzfasern (FELBY et al., 1997). Dieser ist nach Felby et al. (1997) und WIDSTEN (2002) ein typisches „solid-state“-Spektrum (siehe Abbildung 45). Zu bedenken ist, dass sich in diesem Bereich auch Cu^{2+} -Signale der Laccase befinden. Es liegt also eine Überlagerung der Peaks vor. Entsprechend werden auch bei der Verwendung des Mediators Bestandteile des Mediators mit gemessen, dessen Peaks ebenfalls die Peaks der freien Radikale oder der Laccase überlagern können. Aus diesem Grund sind in den Abbildungen 46 und 47 durch Differenzbildung alle überlagernde Peaks der Laccase und des Mediators aus den ESR-Spektren entfernt worden, so dass lediglich in den Spektren die Peaks der organischen Radikale gezeigt werden können.

Zur Verdeutlichung ist das „solid-state“-Spektrum in Abbildung 45 vergrößert dargestellt.

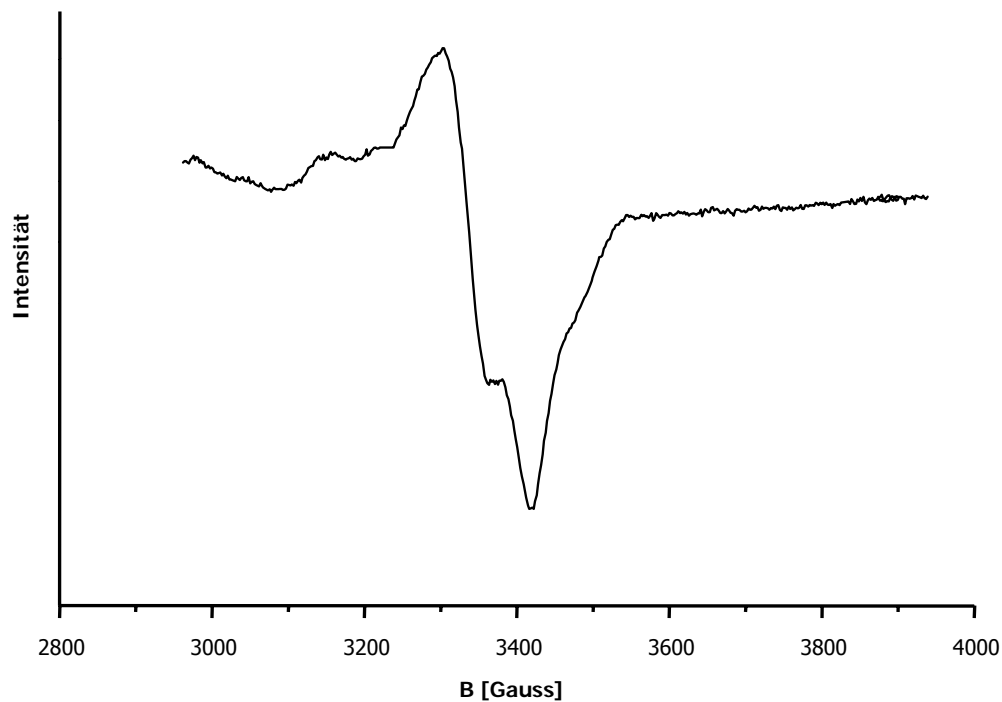
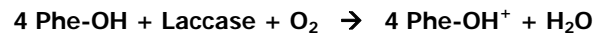


Abb. 45: Typisches „solid-state“ – Spektrum Laccase-Mediator inkubierter Holzfasern

Nach FELBY et al. (1997) katalysiert die Laccase die Bildung von Phenoxy-Radikalen und Wasser in Ein-Elektronen-Schritten aus den phenolischen Hydroxylgruppen des Lignins, wobei Sauerstoff reduziert wird. Die Reaktion läuft wie folgt ab:



In Abbildung 46 sind die ESR-Spektren der mit 200 U/ml Laccase (L 200) und 200 U/ml Laccase + 10 mM Mediator HBA (L 200 + HBA 10) inkubierten Holzfasern verglichen. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden. Wie erwähnt, sind alle möglichen überlagernde Peaks der Laccase und des Mediators aus dem Spektrum durch Differenzbildung entfernt worden.

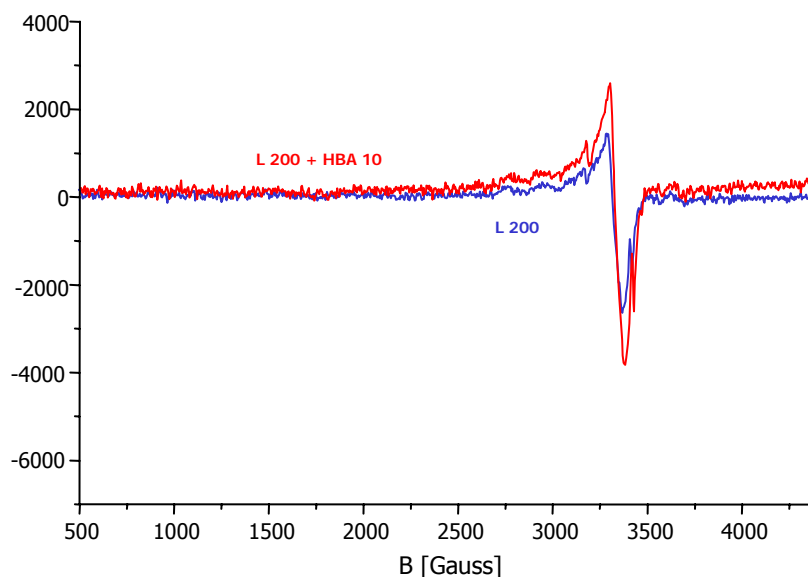


Abb. 46: ESR-Spektren der Laccase (L 200) und Laccase-Mediator (L 200 + HBA 10) inkubierter Holzfasern

Sowohl bei der Probe L 200 als auch bei der Probe L 200 + HBA 10 sind im Bereich 3250 und 3500 Gauss deutliche Peaks zu erkennen, die durch das Vorhandensein freier Phenoxy-Radikale auf der Holzfaseroberfläche entstanden sind. Dabei wird deutlich, dass die Intensität der Peaks bei Laccase-Mediator inkubierten Holzfasern stärker ist als bei Laccase inkubierten Holzfasern.

Der Grund hierfür muss eine durch den Mediator hervorgerufene stärkere Radikalisierung der Liginmoleküle auf der Holzoberfläche sein.

Ein Vergleich der ESR-Spektren bei unterschiedlichen Laccasekonzentrationen (100 U/ml und 200 U/ml), aber einer gleich bleibenden Mediatorkonzentration (10 mM) ist in Abbildung 47 zu sehen. Die Fasern wurden 2 Stunden lang inkubiert.

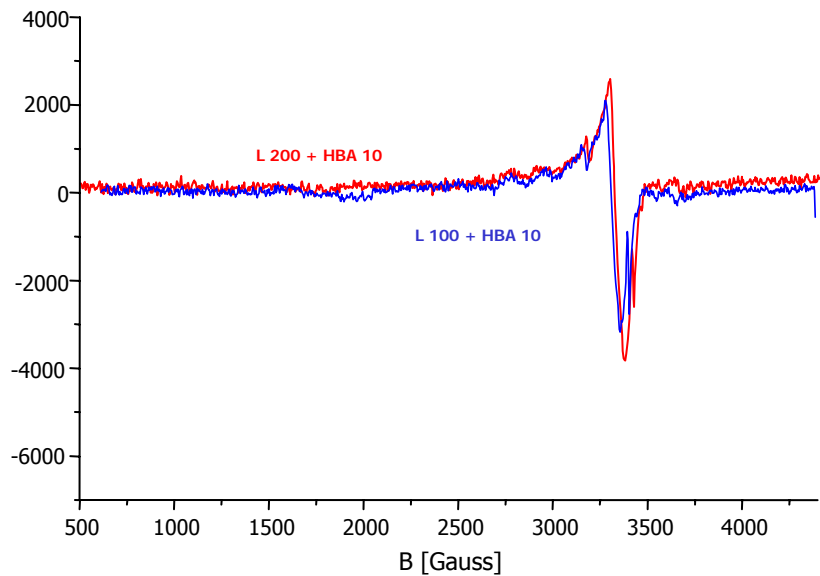


Abb. 47: ESR-Spektren Laccase-Mediator inkubierter Holzfasern mit unterschiedlichen Laccasekonzentrationen

Aus der Abbildung wird deutlich, dass der Peak der Probe L 200 + HBA 10 stärker ist, als der der Probe L 100 + HBA 10. Somit hat die Erhöhung der Laccasekonzentration eine stärkere Bildung freier Radikale auf der Holzfaseroberfläche bewirkt.

Die Untersuchungen der Laccase bzw. Laccase-Mediator inkubierten Holzfasern mittels Elektronenspin-Resonanz haben, wie auch schon andere Analysen (z. B. die Bestimmung des Gehaltes an phenolischen Hydroxyl-Gruppen in Kap 5.7) gezeigt, dass mit der Verwendung des Mediators bessere Ergebnisse erzielt werden können, als bei der alleinigen Inkubation mit Laccase. Dabei wird bei einer Laccasekonzentration von 200 U/ml und einer Mediatorkonzentration von 10 mM die höchste Intensität an freien Radikalen gemessen. Für die spätere Verpressung der inkubierten Holzfasern sind dann diese Radikale von Bedeutung, um mit sich mit anderen freien Radikalen zu vernetzen bzw. miteinander zu verkleben. Um diese Funktion erfüllen zu können, müssen sie auf der Faser Oberfläche „verbleiben“ (FELBY et al., 1997). Dem zur Folge muss verhindert werden, dass sich zu viele phenolische Gruppen bzw. Phenoxy-Radikale von der Faser Oberfläche ablösen. Dies kann dadurch erfolgen, dass die Holzfasern nur für eine bestimmte Zeit lang inkubiert werden dürfen, da ansonsten eine Ablösung der Radikale zu erwarten ist (FELBY et al., 1997). In den anderen analytischen

Untersuchungen dieser Dissertation ist eine Inkubationszeit von 2 Stunden als geeignete Dauer ermittelt worden. In dieser Zeit können genügend freie Phenoxy-Radikale gebildet werden, um anschließend miteinander zu reagieren. Weiterhin ist es von Bedeutung, in welchem Verfahren die Holzfasern inkubiert werden. Bei der Inkubation der Fasern im Nassverfahren (vgl. Kapitel 3.8.2) muss damit gerechnet werden, dass sich durch die stark flüssige Umgebung (Inkubationslösung) viele Radikale lösen können, mit entwässert werden und somit für eine Vernetzung der Holzfasern nicht mehr zur Verfügung stehen. Dagegen können die im Trockenverfahren (vgl. Kapitel 3.8.1, in diesem Fall Sprühinkubation) gebildeten freien Radikale weitgehend auf der Faseroberfläche verbleiben und für eine „Verklebung“ zur Verfügung stehen.

5.9 Strukturaufklärung mittels NMR

In den folgenden Abbildungen sind Ergebnisse der ^{13}C NMR-Spektroskopie aufgeführt. Mithilfe dieser Messmethode soll eine weitere Aufklärung der Struktur von Holzfasern vor und nach der Inkubation mit Laccase, sowie Laccase und Mediator erfolgen.

Zur Interpretation der NMR-Spektren lässt sich eine grobe Einteilung der wichtigsten Strukturen bzw. Bestandteile der Holzfasern durchführen. Nach MILSTEIN et al. (1992) sind für bestimmte Bandenbereiche entsprechende Gruppen zuzuordnen:

- von 0 ppm bis 45 ppm aliphatische Gruppen (alle organischen Verbindungen, die nicht aromatisch sind),
- von 45 ppm bis 60 ppm Methoxygruppen (O-CH_3),
- von 60 ppm bis 110 ppm Kohlenstoffe mit Seitenketten, meist Hydroxyl- oder Ethergruppen
- von 110 ppm bis 160 ppm aromatische Kohlenstoffe,
- und ab 160 ppm Carboxylgruppen ($-\text{COOH}$).

Bei dem folgenden Spektrum (Abbildung 48) handelt es sich um eine Aufnahme der Holzfaserkontrollprobe. Die Kontrollprobe wurde ohne Laccase oder Mediator 2 Stunden lang im McIlvaine Puffer bei 45 °C im Schüttelwasserbad behandelt.

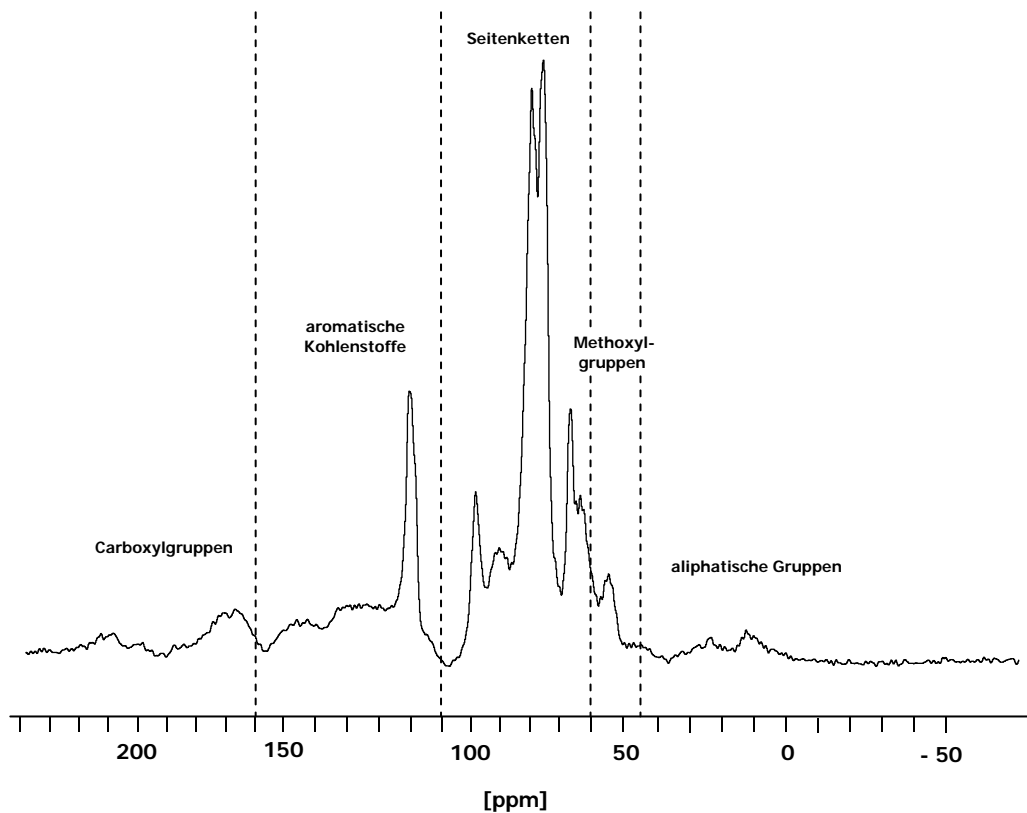


Abb. 48: ^{13}C NMR-Spektrum der Kiefernholzfaser

Bei der Betrachtung des Spektrums fallen die unterschiedlich stark ausgeprägten Peaks der jeweiligen Bestandteile auf. Während die aliphatischen Gruppen und die Carboxylgruppen im Spektrum weniger absorbiert werden, zeigen besonders die Seitenketten der Kohlenstoffe (z. B. Hydroxyl- oder Ethergruppen im Bereich 60 ppm bis 110 ppm) starke Absorptionen. Im relativ engen Bereich der Methoxygruppen (45 ppm bis 60 ppm) wird ein kleinerer Peak deutlich, bei den aromatischen Kohlenstoffen ergibt sich ein markanter Peak bei 120 ppm.

Um mögliche Veränderungen in der Struktur Laccase und Laccase-Mediator inkubierter Holzfasern mittels der Nuklear Magnetischen Resonanz deutlich zu machen, sind in der folgenden Abbildung (49) zunächst die ^{13}C NMR-Spektren der Kontrollprobe und der mit 200 U/ml Laccase behandelten Holzfasersprobe dargestellt. Die Fasern wurden zuvor 2 Stunden lang bei 45 °C im Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend zur NMR-Messung durch Auswaschen und Trocknung präpariert (vgl. Kapitel 4.2.10).

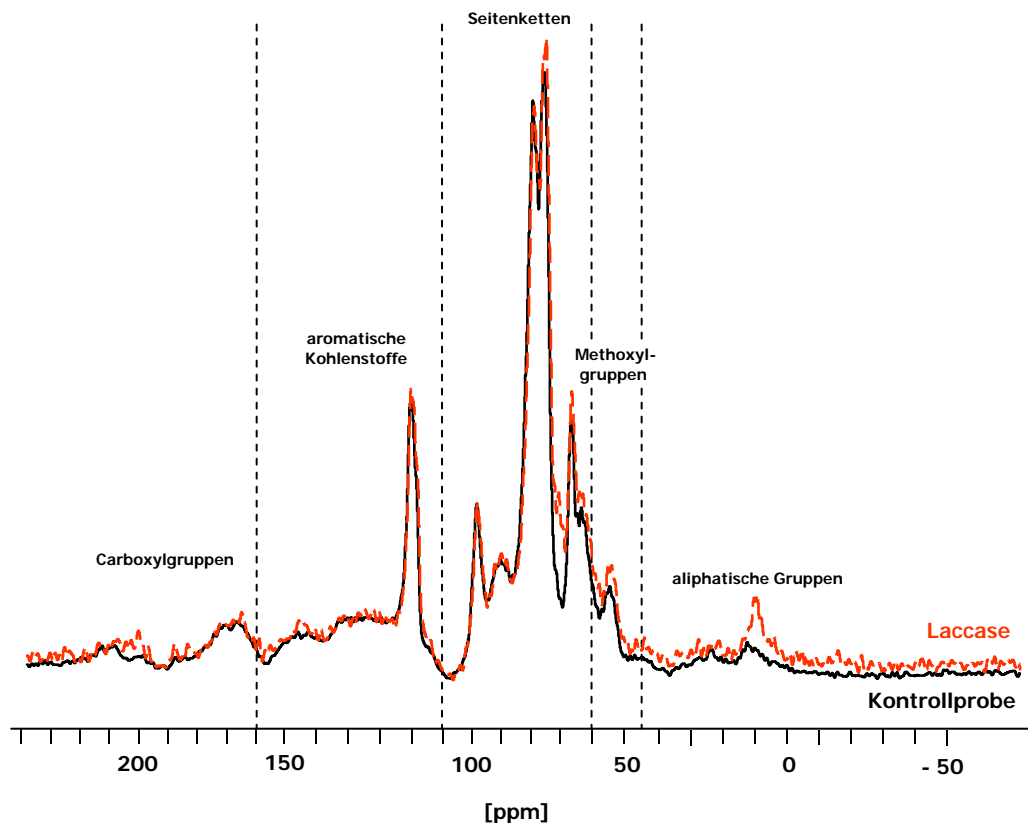


Abb. 49: ¹³C NMR-Spektren der Kontrollprobe und der mit 200 U/ml Laccase inkubierten Holzfasern

Nach der Inkubation der Holzfasern mit Laccase wird deutlich, dass die aliphatischen Gruppen (0 ppm bis 45 ppm), die Methoxylgruppen (45 ppm bis 60 ppm) und teilweise die Seitenketten der Kohlenstoffe (60 ppm bis 110 ppm) durch die Einwirkung der Laccase Veränderungen in der Peakintensität aufweisen. Die Peaks der Laccase behandelten Holzprobe sind in diesen Bereichen sichtbar höher, als die der Kontrollproben. Dagegen sind im Bereich der aromatischen Kohlenstoffe (110 ppm bis 160 ppm) und der Carboxylgruppen (ab 160 ppm) nur leichte Veränderungen gegenüber den nicht mit Laccase behandelten Holzfasern zu erkennen.

Die nächste Abbildung (50) zeigt die NMR-Spektren der mit 200 U/ml Laccase und 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA inkubierten Holzfasern. Zur besseren Vergleichbarkeit ist das Spektrum der Kontrollprobe nicht mehr mit abgebildet. (Entsprechende NMR-Spektren der Kontrollprobe befinden sich in den Abbildungen 48 und 49.)

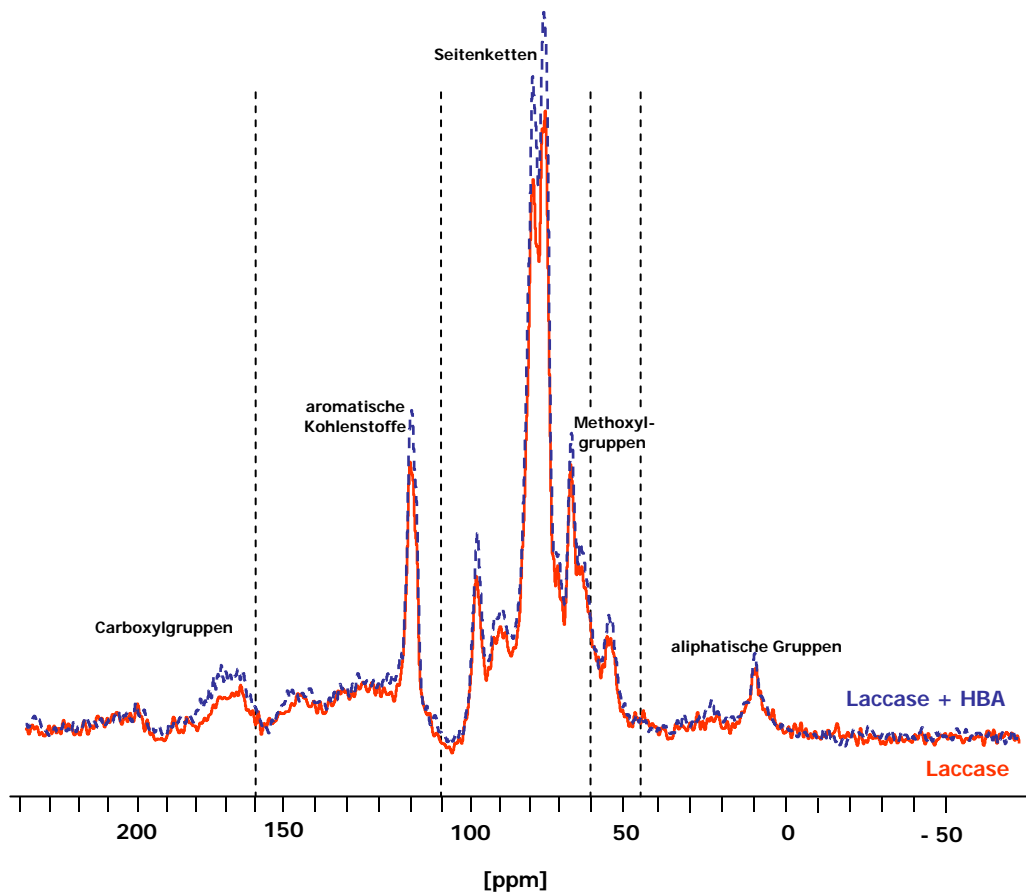


Abb. 50: ^{13}C NMR-Spektrum von Laccase und Laccase-Mediator inkubierten Holzfasern

Bei der Verwendung des Mediators HBA können folgende Beobachtungen gemacht werden: Bis auf den Bereich der aliphatischen Gruppen (0 ppm bis 45ppm) ist eine weitere Intensitätszunahme der Peaks zu erkennen. Besonders deutlich werden hier die Änderungen bei den aromatischen Kohlenstoffen (Peak bei 120 ppm) und den Carboxylgruppen (Peaks zwischen 160 ppm und 180 ppm), die im Vergleich zwischen Kontrollprobe und der Laccase inkubierten Probe nicht erkennbar waren (siehe Abbildung 49). Aber auch die Peaks, die im Bereich der Seitengruppen gemessen werden, sind nochmals stärker absorbiert worden. Bei den Methoxygruppen gibt es eine leichte Steigerung der Intensität.

Bei dem Vergleich der einzelnen Proben konnte anhand der NMR-Spektroskopie, ebenso wie in den anderen Analysen dieser Dissertation festgestellt werden, dass die Laccase und besonders die Laccase in Verbindung mit dem Mediator, in diesem Falle 4-Hydroxybenzoesäure (HBA), Veränderungen an der Holzstruktur vornehmen. Durch die höheren Absorptionen der Laccase-Mediator behandelten Holzfasern bei der NMR-Messung ist darauf zu schließen, dass die ligninoxidierende Wirkung der Laccase durch HBA nochmals

gesteigert werden konnte. Insbesondere im Bereich der aromatischen Kohlenwasserstoffe, bei denen sich es im Holz insbesondere um Phenole handelt, muss eine Oxidation des Mittellamellenlignins auf der Holzfaseroberfläche durch den Mediator unterstützt worden sein. Aber auch die Seitenketten der Kohlenwasserstoffe, bei denen es sich um Hydroxyl-Gruppen oder Ethergruppen handeln kann, sind deutlich höher absorbiert worden.

Wie bereits in mehreren Kapiteln (siehe Kapitel 5.6, 5.7, 5.8) erwähnt, findet durch die katalysierende Wirkung der Laccase eine Aktivierung des Lignins auf der Holzfaseroberfläche statt. So entsteht eine große Menge an Ligninradikalen, die untereinander weiterreagieren und für die Faser-zu-Faser Verbindung verantwortlich sind. KHARAZIPOUR et al. (1996) wiesen nach, dass durch die Inkubation mit Laccase eine hohe Anzahl an Carboxyl- und phenolischen Gruppen freigesetzt und mittels NMR-Messungen nachgewiesen werden konnten. Auch MILSTEIN et al. (1992) schreiben über deutliche chemische Änderung der Ligninstruktur und über eine hauptsächliche Freisetzung von aromatischen Kohlenstoffen. Im Gegensatz zu den hier aufgeführten Ergebnissen erfolgten die NMR-Messungen bei KHARAZIPOUR et al. (1996) an Lignin, welches bereits von der Holzfaseroberfläche durch Inkubation mit Laccase im Nassverfahren in die Fasersuspension gelöst wurde. MILSTEIN et al. (1992) untersuchten Organosolvignin, das mit Laccase inkubiert wurde. Die NMR-Spektren in dieser Dissertation bilden die komplette Struktur der Holzfaser ab. Die höheren Absorptionen nach der Inkubation mit Laccase und Laccase-Mediator drücken keine Freisetzungen von gelöstem Mittellamellenlignin aus, sondern die aktivierten, auf der Faseroberfläche befindlichen Ligninbestandteile. Diese haben sich nicht von der Faser gelöst und stehen für neue Faser-zu-Faser Verbindungen (Autoadhäsion) zur Verfügung, was für die anschließende Weiterverwendung der Fasern zur Herstellung von Faserplatten von hoher Bedeutung ist.

5.10 Fourier-Transform-Infrared (FTIR)-Spektroskopie

Die FTIR-Spektroskopie dient zur Strukturaufklärung der Holzfasern vor und nach ihrer Behandlung mit Laccase bzw. Laccase und Mediator. Durch die Untersuchungen sollt es ermöglicht werden, die Änderungen der chemischen Struktur inkubierter Holzfasern durch Intensität der für die Holzinhaltstoffe typischen Absorptionen bei den FTIR-Messungen sichtbar zu machen. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Absorption des Lignins bei der Spektrenanalyse geworfen.

In den folgenden Abbildung sind die FTIR-Spektren verschieden behandelte Holzfasern abgebildet. Es handelt sich einerseits um die Kontrollproben K, die als Referenz zu den Laccase-Proben L und Laccase-Mediator-Proben L + HBA dienen, andererseits um die Proben L und L + HBA selbst. Die Proben L sind die Fasern, die mit einer Laccase-Puffer-Lösung besprüht und inkubiert wurden. Bei den Proben L + HBA ist zu der Inkubationslösung der Mediator HBA hinzugefügt worden. Den Kurzbezeichnungen L und L + HBA sind die jeweiligen Laccase- und Mediatorkonzentrationen beigefügt.

Das FTIR-Spektrum der Kontrollproben K ist ein typisches Kiefernholzspektrum unbehandelte Kiefernfasern, die in dieser Arbeit für alle Laboranalysen und die Herstellung der Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten eingesetzt wurden. Zwar wurden die Holzfasern der Kontrolle K wie die Laccase bzw. Laccase-Mediator behandelte Fasern für die FTIR-Messungen über eine definierte Zeitdauer „inkubiert“ (behandelt), doch fand dies mit reinem McIlvain-Puffer (pH 6,0) statt. Bei dem Vergleich der FTIR-Spektren von völlig unbehandelte Holzfasern mit den Fasern, die mit der eben genannten Pufferlösung besprüht und „inkubiert“ wurden, konnten keinerlei Unterschiede bei der Auswertung der Spektren festgestellt werden. Die Intensitäten der einzelnen Absorptionsbanden waren nach Vektornormierung und Grundlinienkorrektur über den gesamten Spektrenverlauf identisch. Eine Einwirkung der Pufferlösung auf die Holzfasern während der „Inkubationszeit“ alleine, konnte also ausgeschlossen werden.

Zur Interpretation der Spektren sind die wichtigsten Schwingungstypen und –bereiche, die charakteristisch für die verschiedenen Holzbestandteile sind (vgl. Tabelle 10), durch die Angabe bestimmter Wellenzahlen gekennzeichnet. Dabei ist der Wellenzahlenbereich 1800 cm^{-1} bis 1200 cm^{-1} vergrößert dargestellt. In diesem Bereich sind hauptsächlich die Ligninabsorptionen für Holzspektren zu finden.

Tab. 10: Charakteristische Schwingungsbereiche für Holzbestandteile

Bande in cm^{-1}	charakteristisch für	Holzbestandteile
1734	unkonjugierte C=O Valenzschwingungen in Xylanen	Hemicellulosen
1596	aromatische Ringschwingungen mit C=O (in Syringyleinheiten stärker als in Guajacyleinheiten; in kondensierten Guajacyleinheiten stärker als in veretherten Guajacyleinheiten)	Lignin
1511	aromatische Ringschwingungen mit C=O (in Guajacyleinheiten stärker als in Syringyleinheiten)	Lignin
1462	C-H Deformationsschwingungen, asymmetrisch in $-\text{CH}_3$ und $-\text{CH}_2-$	Lignin
1425	aromatische Ringschwingungen kombiniert mit C-H Valenzschwingungen	Lignin
1375	C-H Deformationsschwingungen	Cellulose und Hemicellulose
1320	C-O Valenzschwingungen (und C-H Valenzschwingungen)	typisch für S-Lignin (Cellulose)
1268	Guajacyleinheiten in Verbindung mit C-O Valenzschwingungen	typisch für G-Lignin
1158	C-O-C Vibration	Cellulose und Hemicellulosen
1060	C-O Deformationsschwingungen	Cellulose und Hemicellulosen
1030	C-O Deformationsschwingungen	Cellulose und Hemicellulosen
898	C-O Deformationsschwingungen	Cellulose

Abbildung 51 zeigt drei Spektren, die Kontrollprobe K, sowie die Laccase und Laccase-Mediator Holzfasernproben. Bei beiden ist eine Laccasekonzentration von 100 U/ml in der Inkubationslösung enthalten, bei der Laccase-Mediator Probe sind 10 mM Mediator hinzugegeben worden. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden.

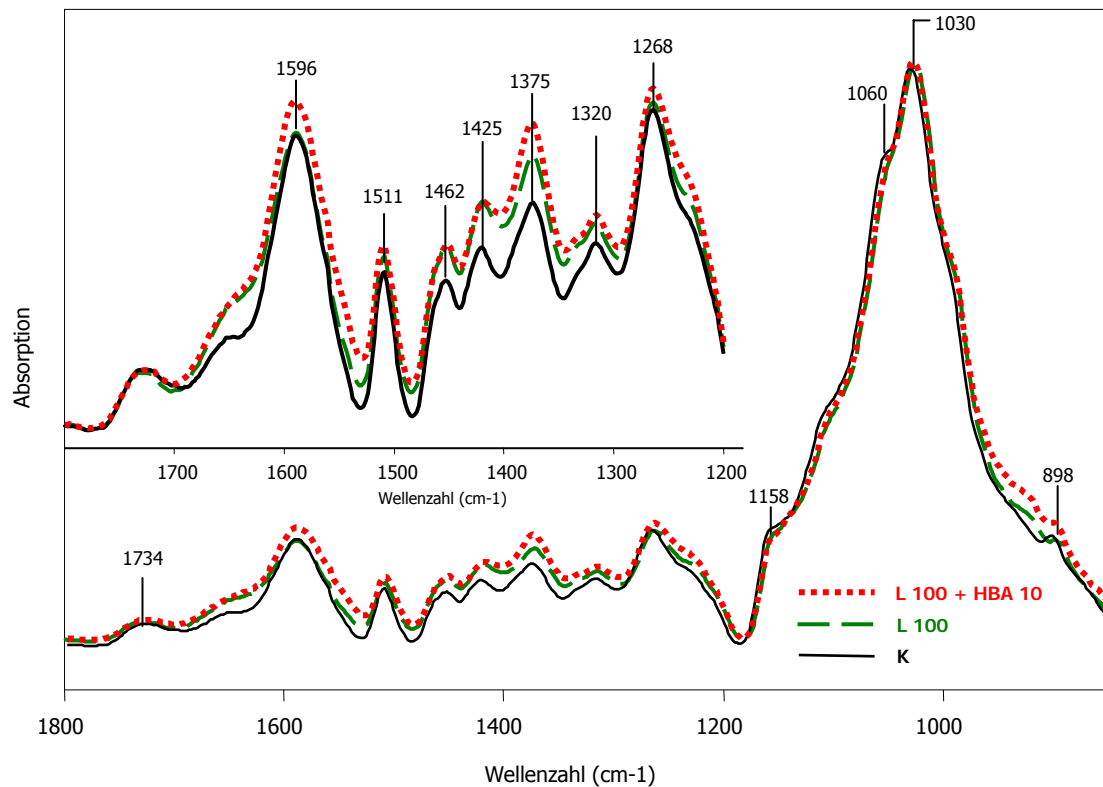


Abb. 51: FTIR-Spektren der Proben K (Kontrollprobe, durchgezogene Linie), L 100 (mit 100 U/ml Laccase inkubierte Holzfasern, gestrichelte Linie) und L 100 + HBA 10 (mit 100 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierte Holzfasern, gepunktete Linie)

Beim Vergleich der drei Spektren fällt auf, dass bei den Laccase und Laccase-Mediator behandelten Fasern nahezu über den gesamten Wellenzahlenbereich höhere Absorptionen gemessen werden als bei der unbehandelten Holzfasersprobe K. Lediglich bei den für Cellulose und Hemicellulosen charakteristischen Banden 1158 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} und 898 cm^{-1} liegen die Absorptionsbanden in etwa gleichauf. Vor allem bei den meisten für das Lignin charakteristischen Banden im Bereich 1800 cm^{-1} bis 1200 cm^{-1} sind die Unterschiede deutlich. Betrachtet man diesen Bandenbereich genauer, so ist dies besonders bei den Banden 1462 cm^{-1} , 1425 cm^{-1} und 1320 cm^{-1} zu erkennen (siehe vergrößerte Darstellung in Abbildung 51). Die Absorptionsbanden bei 1375 cm^{-1} sind ebenfalls deutlich höher, doch handelt es sich hier um C-H Deformationsschwingungen, die für Cellulose und Hemicellulosen charakteristisch sind. Die für das G-Lignin typische Schwingungen bei 1268 cm^{-1} und die aromatischen Ringschwingungen mit C=O bei 1511 cm^{-1} der Proben L 100 und L 100 + 10 mM HBA bleiben dagegen nahezu auf dem gleichen Niveau mit der Kontrollprobe. Bei 1596 cm^{-1} , die Bande für aromatische Ringschwingungen mit C=O in Syringyleinheiten und Guajacyleinheiten (typisch für Lignin) wird nur bei der Probe L 100 + HBA 10 eine höhere Absorption gemessen. Die Proben L 100 und K liegen gleich auf, d. h.

bei der Probe L 100 wurde gegenüber der Kontrollprobe kein Unterschied in der Höhe der Absorption gemessen.

Zu diesen Beobachtungen kann festgehalten werden, dass eine Inkubation von Holzfasern mit Laccase eine Veränderung der Ligninstruktur zur Folge haben muss, da wesentliche Absorptionsbanden, die für Ligninmoleküle typischen Schwingungsbereiche, wie die C-O Valenzschwingungen bei 1320 cm^{-1} , die aromatischen Ringschwingungen und C-H Valenzschwingungen bei 1425 cm^{-1} , sowie die C-H Deformationsschwingungen bei 1462 cm^{-1} nach der Behandlung höhere Absorptionen aufweisen. Bei der Verwendung des Mediators HBA sind die eben genannten Absorptionsbanden leicht höher als die der Probe ohne Mediator. Dagegen ist besonders bei der Bande 1596 cm^{-1} (aromatische Ringschwingungen mit C=O im Lignin) im Vergleich zu der Laccase behandelten Probe eine höhere Absorption vorhanden. Bei den für die Cellulosen und Hemicellulosen typischen Schwingungsbereiche sind keine wesentlichen Veränderungen zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass der Laccase (mit oder ohne Mediator) nur die Ligninbestandteile auf der Faseroberfläche als Substrat dienen. Diese Beobachtungen können besonders bei der morphologischen Untersuchung der Holzfasern mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen in Kapitel 5.6 gemacht werden, bei denen sich Ligninkruste von den Cellulosefibrillen aufräut und sich in einem Ablösungsprozess befindet. Somit können diese Fraktionen des Mittellamellenlignins auf der Faseroberfläche eine höhere Absorption bei den FTIR-spektroskopischen Aufnahmen verursacht haben, denn wie in Abbildung 51 zu erkennen ist, verursachen die für die Ligninbestandteile charakteristischen Schwingungsbereiche im Vergleich zu den für die Cellulose- und Hemicellulosenbestandteile typischen Bereiche (bis auf die Bande 1375 cm^{-1}) höhere Absorptionen. Der ebenfalls höher absorbierte C-H Deformationsschwingungsbereich bei 1375 cm^{-1} , der eigentlich für Cellulosebestandteile charakteristisch ist, könnte entweder durch die stärkeren Absorptionsbanden des Lignins überlagert sein, oder die C-H Bindungen durch die Laccase so verändert worden sein, dass durch diese eine gesteigerte Intensität im Spektrum hervorgerufen haben. Leider ist mit der hier verwendeten Auswertungsmethode, in der die Spektren verschiedener Holzfasern verglichen werden, keine Quantifizierung der geänderten Absorptionen möglich. So können zum Beispiel keine direkten Aussagen über eine prozentuale Ab- oder Zunahme von veränderten Holzbestandteilen getroffen werden. Eine Möglichkeit bietet die relative Darstellung der Spektren. Durch diese wird ermöglicht, durch eine Normierung aller Spektren auf eine bestimmte Absorptionsbande eine relative Beziehung zu anderen Banden darzustellen. Doch muss bei solchen Untersuchungen gesichert sein, dass sich in allen zu vergleichenden Spektren die zu normierende Bande nicht unterscheidet. Das bedeutet, dass alle Spektren bei genau diesem Schwingungsbereich keine Veränderungen durch die Einwirkung von äußeren Einflüssen, wie zum Beispiel das Inkubieren von Holzfasern mit Laccase zeigen dürfen. Bei einem so heterogenen Material, wie Holz, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass trotz unterschiedlicher Behandlungen der Proben eine Absorptionsbande oder ein Absorptionsbereich keine

Änderungen erfährt. So kann anhand dieser Versuchbedingungen nicht eindeutig geklärt werden, ob bestimmte Holzbestandteile und deren charakteristischen Schwingungsbereiche im FTIR-Spektrum im Vergleich zu der Referenzprobe vollständig erhalten bleiben. Da jedoch durch den Vergleich der Spektren unterschiedlich behandelter Holzfasern festgestellt wird, dass die Cellulose und Hemicellulose typischen Banden bei 1060 cm^{-1} und 1030 cm^{-1} weitgehend identisch absorbiert werden, kann eine absolute Beziehung zu anderen Banden beschrieben werden, in der sich zeigt, dass sich bei den Lignin typischen Schwingungsbereichen höhere Absorptionen ergeben.

Mit den folgenden Spektren (Abbildungen 52 bis 55) soll geklärt werden, wie sich die Variation der Laccase und Mediatorkonzentrationen auf die Holzfasern auswirken.

In der nächsten Abbildung (52) werden infolgedessen die FTIR-Spektren der Kontrollprobe, sowie einer mit 200 U/ml Laccase inkubierten Holzfasernprobe und einer mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA inkubierten Probe gezeigt.

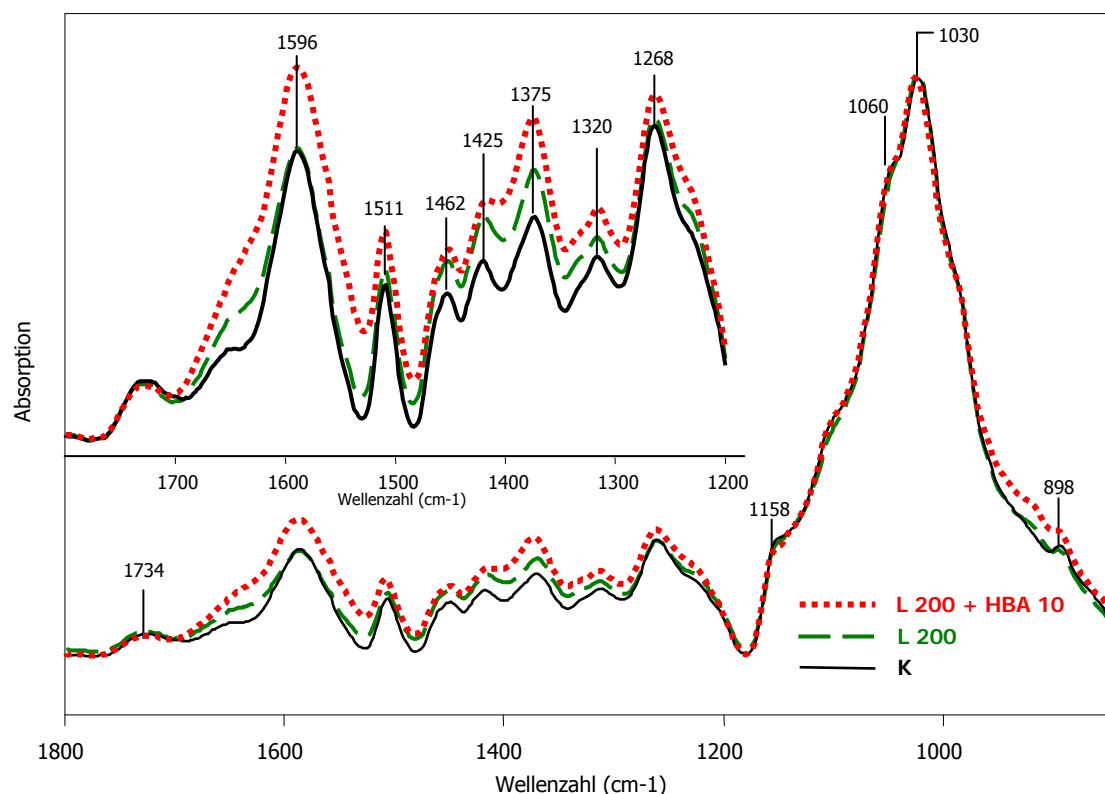


Abb. 52: FTIR-Spektren der Proben K (Kontrollprobe, durchgezogene Linie), L 200 (mit 200 U/ml Laccase inkubierte Holzfasern, gestrichelte Linie) und L 200 + HBA 10 (mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierte Holzfasern, gepunktete Linie)

Wie bei der Abbildung 51 sind deutlich Unterschiede der Absorptionsbanden im Bereich 1800 cm^{-1} und 1200 cm^{-1} zu erkennen. Die Absorptionsbanden für die Laccase-Mediator behandelten Probe liegen wieder sichtbar über denen der allein mit Laccase behandelten Probe. Wie bei der Laccasekonzentration 100 U/ml sind die für Ligninbestandteile charakteristischen Schwingungen bei 1320 cm^{-1} , 1425 cm^{-1} und 1462 cm^{-1} deutlich höher als die der Kontrollprobe. Gleichzeitig bleiben die Cellulose und Hemicellulosen typischen Schwingungen bei 1158 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} und 898 cm^{-1} bei allen Proben auf etwa gleich hohem Niveau. Dagegen ist auch hier die C-H Deformationschwingung bei 1375 cm^{-1} als einzige, für Cellulose und Hemicellulose charakteristische Bande, wesentlich stärker als bei der Kontrollprobe. Wie auch bei einer Laccasekonzentration von 100 U/ml ist die mit 10 mM Mediator HBA versehene Probe bei der Bande 1596 cm^{-1} höher, doch ist hier ein noch größerer Unterschied erkennbar (vgl. Abbildung 51). Auch bei der für das G-Lignin typischen Schwingung bei 1268 cm^{-1} ist nun ein größerer Unterschied zur Kontroll- und Laccase behandelten Probe sichtbar (vgl. Abbildung 51). Dies kann daran liegen, dass bei dieser Laccasekonzentration durch das Hinzufügen des Mediators besonders diese Ligninstrukturen radikalisiert werden, was für die spätere „Verklebung“ der Fasern zu einer MDF-Platte von Bedeutung sein kann.

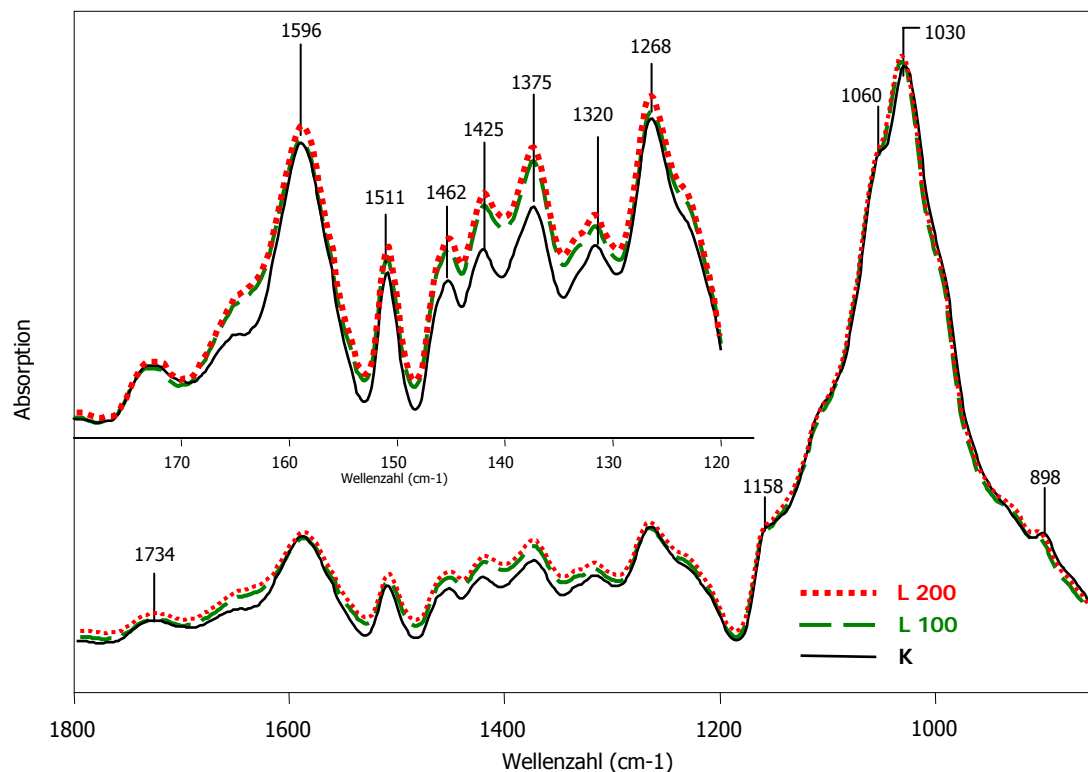


Abb. 53: FTIR-Spektren der Proben K (Kontrollprobe, durchgezogene Linie), L 200 (mit 200 U/ml Laccase inkubierte Holzfasern, gestrichelte Linie) und L 100 (mit 100 U/ml Laccase Holzfasern, gepunktete Linie)

In Abbildung 53 werden die FTIR-Spektren der Proben miteinander verglichen, welche mit 100 U/ml Laccase und 200 U/ml Laccase inkubiert wurden. Zusätzlich ist ein Spektrum der Kontrollprobe eingetragen. Hinsichtlich der einzelnen Höhen der Absorptionsbanden im Spektrungsverlauf bedarf es keiner genaueren Beschreibung der einzelnen Banden (siehe Abbildungen 51 und 52). Was hier beachtet werden sollte, ist der leicht höhere, aber sehr ähnliche Spektrumsverlauf der Probe L 200 gegenüber der Probe L 100. Durch die Verdoppelung der Laccasekonzentration ist ersichtlich, dass im Wesentlichen im Bereich 1800 cm^{-1} bis 1200 cm^{-1} mehr Ligninmoleküle absorbiert werden, d. h. durch die höhere Menge an Laccase in der Inkubationslösung muss eine stärkere Radikalisierung des Lignins auf der Faseroberfläche stattgefunden haben.

In Abbildung 54 werden die Proben abgebildet, deren Mediatorkonzentration bei 10 mM HBA konstant bleibt, deren Laccasekonzentrationen aber zwischen 100 U/ml und 200 U/ml variieren.

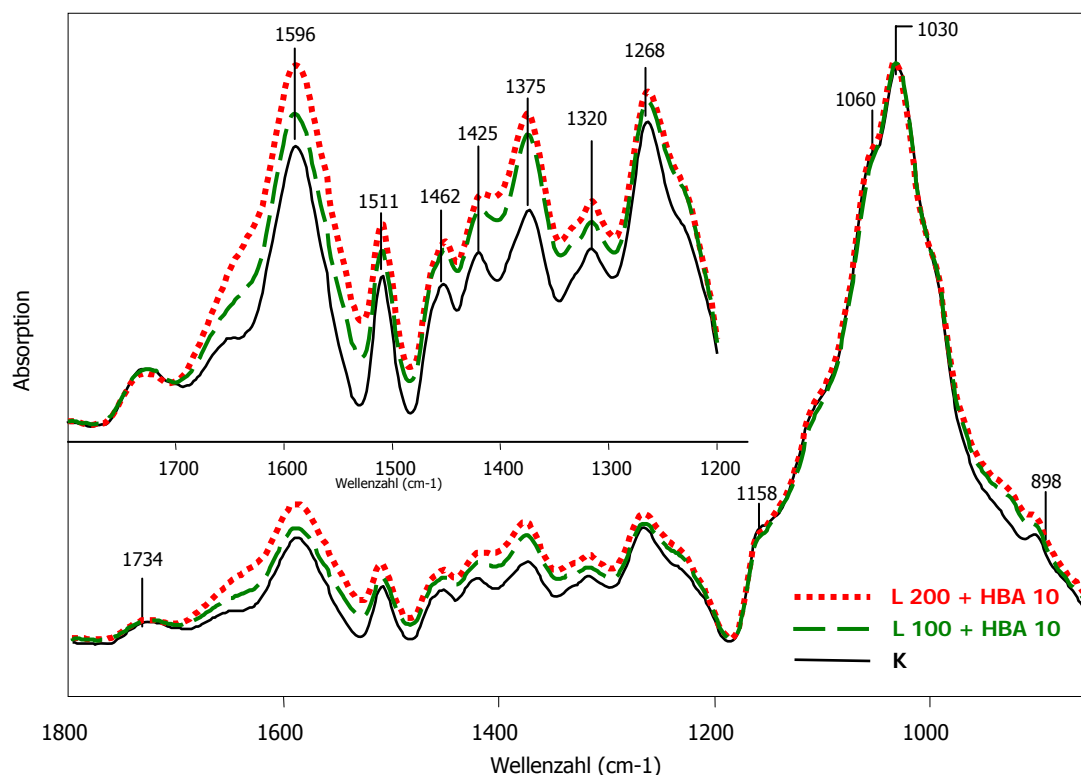


Abb. 54: FTIR-Spektren der Proben K (Kontrollprobe, durchgezogene Linie), L 100 + HBA 10 (mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierte Holzfasern, gestrichelte Linie) und L 200 + HBA 10 (mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierte Holzfasern, gepunktete Linie)

Während die Absorptionen bei allen Proben bei den für Cellulose und Hemicellulosen charakteristischen Schwingungen bei 1158 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} und 898 cm^{-1}

annähernd gleich sind, sind die von der Probe 200 + HBA 10 gegenüber der Probe L 100 + HBA 10 nochmals höheren Absorptionen im Ligninbanden befindlichen Bereich von 1800 cm^{-1} bis 1200 cm^{-1} auffällig. Besonders die aromatischen Ringschwingungen mit C=O bei 1596 cm^{-1} , die aromatischen Ringschwingungen kombiniert mit C-H Valenzschwingungen bei 1425 cm^{-1} und die C-O Valenzschwingungen bei 1320 cm^{-1} sind deutlich erhöht. Dies kann daran liegen, dass wie auch in den vorherigen Ausführungen beschrieben die Zugabe des Mediators in die Inkubationslösung eine höhere Radikalisierung der Ligninmoleküle hervorruft, die durch eine gesteigerte Laccasekonzentration nochmals intensiviert wird. Durch diese scheinbar höhere Aktivierung der Faseroberfläche stünden dann somit mehr Ligninradikale zur Verfügung, neue Bindungen im Faserverbund einzugehen.

In der Abbildung 55 soll gezeigt werden, ob sich wie bei der Verdoppelung der Laccasekonzentration ein höherer Absorptionsbandenverlauf auch bei der Verdoppelung der Mediatorkonzentration von 10 mM auf 20 mM HBA abzeichnet. Die Laccasekonzentration bleibt in diesem Vergleich konstant bei 200 U/ml.

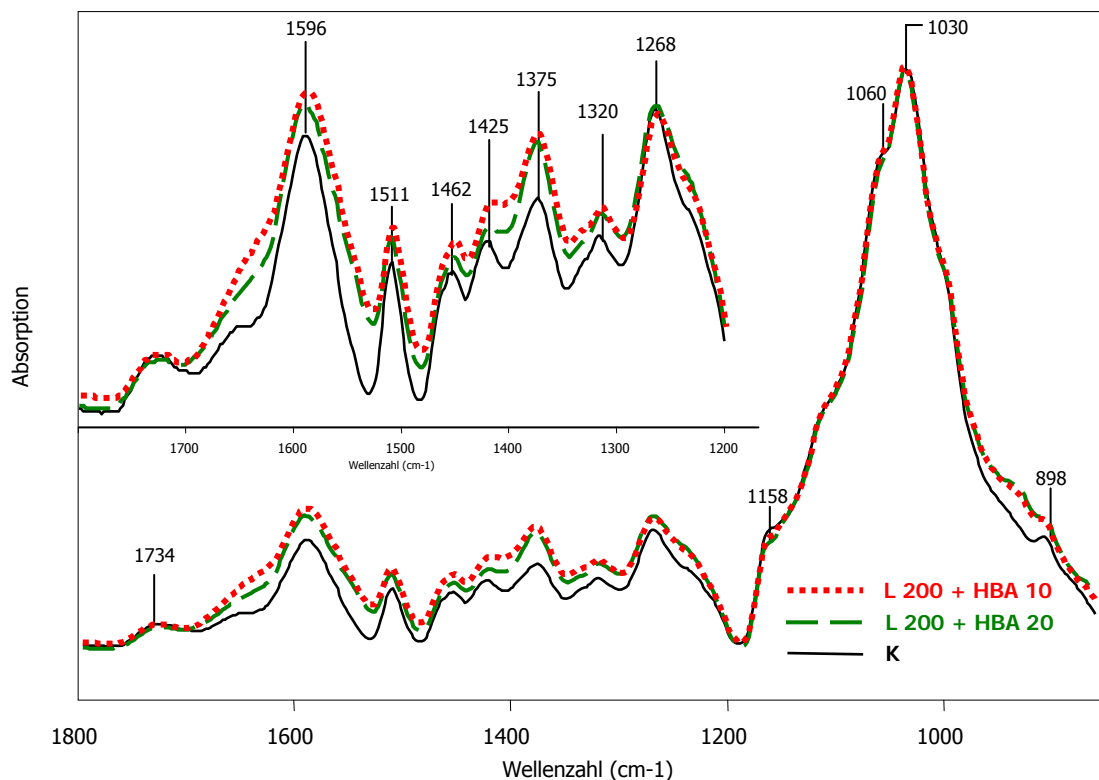


Abb. 55: FTIR-Spektren der Proben K (Kontrollprobe, durchgezogene Linie), L 200 + HBA 10 (mit 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA inkubierte Holzfasern, gestrichelte Linie) und L 200 + HBA 20 (mit 200 U/ml Laccase und 20 mM HBA inkubierte Holzfasern, gepunktete Linie)

Es ist ersichtlich, dass die Absorptionsbanden der Probe L 200 + HBA 20 trotz höherer Mediatorkonzentration, mit Ausnahme der Bande 1268 cm^{-1} , noch unterhalb der der Probe L 200 + HBA 10 liegen. Bei diesem für das G-Lignin typischen Schwingungsbereich liegen Absorptionen gleichauf. Hierdurch wird deutlich, dass zwar eine Erhöhung der Laccasekonzentration eine gesteigerte Aktivierung der Ligninkruste auf der Faseroberfläche hervorrufen kann, eine Erhöhung der Mediatorkonzentration dagegen keinen zusätzlichen Effekt bei der Radikalisierung der Ligninmoleküle mehr bewirkt. Für andere und folgende Untersuchungen zu Laccase-Mediator behandelten Holzfasern bis hin zum Verpressen der inkubierten Fasern als MDF-Platten oder Dämmplatten ist dies ein wichtiges Ergebnis.

Grundsätzlich muss für spektroskopische Untersuchungen von Vollholz und Holzprodukten festgehalten werden, dass durch die FTIR-Technik bestimmte chemische Veränderungen in der Holzstruktur deutlich gemacht werden können, wenn das Holz biologischen Einwirkungen, wie einer Weiß- oder Braunfäule, ausgesetzt war und abgebaut wurde (PANDEY et al., 2003, 2007). In sämtlichen FTIR spektroskopischen Aufnahmen konnte nachgewiesen werden, dass durch den Holzabbau durch Weißfäule- und Braunfäulepilzen deutliche Veränderungen der chemischen Struktur des abgebauten Holzes stattfanden. Da Weißfäulepilze eher die Ligninbestandteile im Holz abbauen und Braunfäulepilze eher die Cellulosebestandteile konnte mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie nachgewiesen werden, dass die für die Lignin typischen Absorptionsbanden bei weißfaulem Holz stark abnehmen und die für Cellulose und Hemicellulose typischen Banden weitgehend erhalten bleiben (SEIFERT, 1968; JAHN, 1979; FENGEL und WEGENER, 1984; SCHMIDT 1994; PANDEY et al., 2003, 2007). Bei braunfaulem Holz tritt das umgekehrte Bild ein, dort werden die für die Cellulose und Hemicellulosen charakteristischen Schwingungsbereiche im Vergleich zu den Ligninbanden stark reduziert dargestellt (PANDEY et al., 2003, 2007).

In den hier gewonnenen Ergebnissen wird jedoch festgestellt, dass anders als in den Untersuchungen zum Holzabbau die für Ligninbestandteile typischen Schwingungsbereiche zunehmen statt abnehmen. Dies muss daran liegen, dass die Versuchsdurchführung für die hier beschriebenen FTIR-Spektren nur 2 Stunden dauerten und Holzabbauversuche mehrere Wochen dauern (EN 350-1 und EN 350-2, 1994).

In dieser Dissertation sollen jedoch keine Holzbestandteile abgebaut werden, sondern lediglich das auf der Faseroberfläche inaktive Mittellammellenlignin enzymatisch aktiviert werden, um bei der Verpressung zu Mitteldichten Faserplatten (MDF) oder Dämmstoffen neue Bindungen einzugehen, die die einzelnen Fasern miteinander vernetzen. Das so modifizierte Lignin ist in den Cellulosekomplex eingebunden, so wie es auch im natürlich

gewachsenem Holz die Cellulosefasern verbindet (BERGMANN, 1998). Innerhalb dieser 2 Stunden Inkubationszeit muss die Ligninkruste auf der Faseroberfläche aktiviert und teilweise aufgebrochen worden sein, wodurch mittels FTIR-Spektroskopie höhere Absorptionen der für die Ligninbestandteile typischen Schwingungsbereiche detektiert werden können. Dabei war es ebenfalls von Vorteil, dass die Fasern zur Versuchsdurchführung im Sprühverfahren (siehe Kapitel 3.8.1) behandelt wurden. Bei einer Inkubation im Nassverfahren (siehe Kapitel 3.8.2) hätten mit dem Restwasser der Fasersuspension an der Faseroberfläche angelöste Ligninbestandteile mit ausgewaschen werden können und nicht mehr für neue Reaktionen im Lignocellulosekomplex zur Verfügung stehen können (vgl. kapitel 5.5 und 5.7).

5.11 Mechanisch-technologische Eigenschaften enzymgebundener Holzfaserdämmplatten

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen der im Rahmen in dieser Dissertation hergestellten Holzfaserdämmplatten dargestellt. Zum Vergleich der Ergebnisse der Laccase bzw. Laccase und Mediator gebundenen Platten werden die Werte einer stärkegebundenen Dämmstofffaserplatte miteinbezogen, die nach gleicher Versuchsbeschreibung (siehe Kapitel 4.2.12) hergestellt wurde. Der Unterschied bei der Herstellung war, dass anstelle der Laccase und Mediator Kartoffel-Stärke in die Pufferlösung hinzugegeben wurde und die Fasern nicht für zwei Stunden inkubiert wurden.

Die Proben, die zur Bestimmung der Rohdichte nach EN 1602 , der der Ausgleichsfeuchte, der Wasseraufnahme nach EN 1609, der Dickenquellung nach EN 317 und der Querkzugfestigkeit nach EN 1607 dienen, werden bei 23 ± 2 °C und 50 ± 5 % rel. Feuchte bis zur Massekonstanz konditioniert.

Abbildung 56 zeigt die Ergebnisse der Rohdichte-Bestimmung.

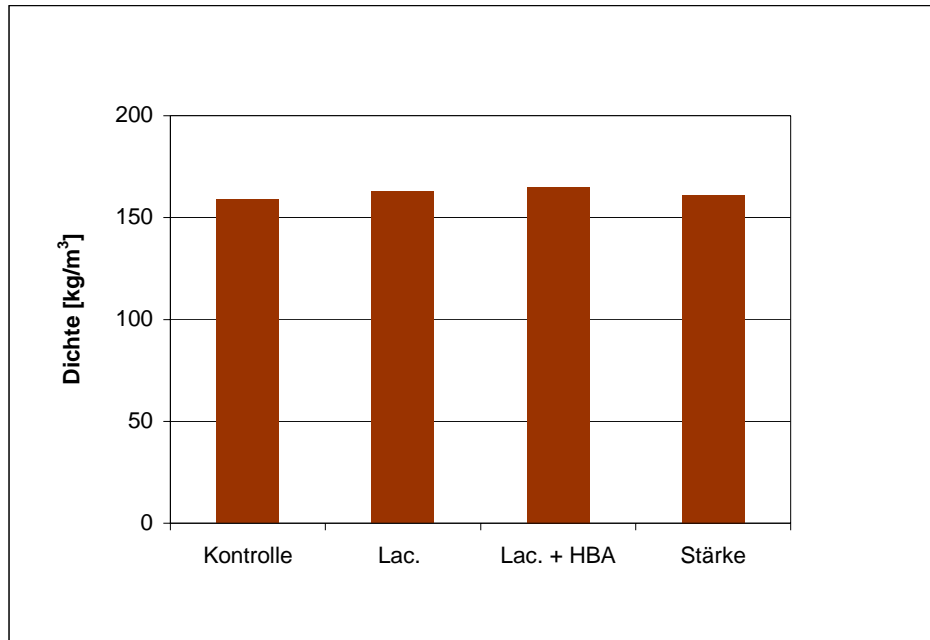


Abb. 56: Rohdichten der Holzfaserdämmplatten (Kontrolle = Holzfasern im Puffergemisch, Lac. = Laccase inkubierte Holzfasern, Lac. + HBA = Laccase und HBA inkubierte Holzfasern, Stärke = stärkegebunden)

Die Rohdichten der Holzfaserdämmplatten variieren von 159 kg/m^3 bei der Kontrollprobe bis 164 kg/m^3 bei der Laccase-Mediator gebundenen Dämmplatte. Diese Werte liegen in dem für Dämmstoffplatten typischen Rohdichtebereich von 150 kg/m^3 bis 190 kg/m^3 (siehe Kapitel 3.7).

In engem Zusammenhang mit der Rohdichte steht die Ausgleichsfeuchte u_{gl} , da die Rohdichte im Allgemeinen als Dichte bei einer bestimmten Feuchte u angegeben wird. Abbildung 57 zeigt, dass die Ausgleichsfeuchte u_{gl} zwischen 8,0 % und 8,5 % Prozent variiert.

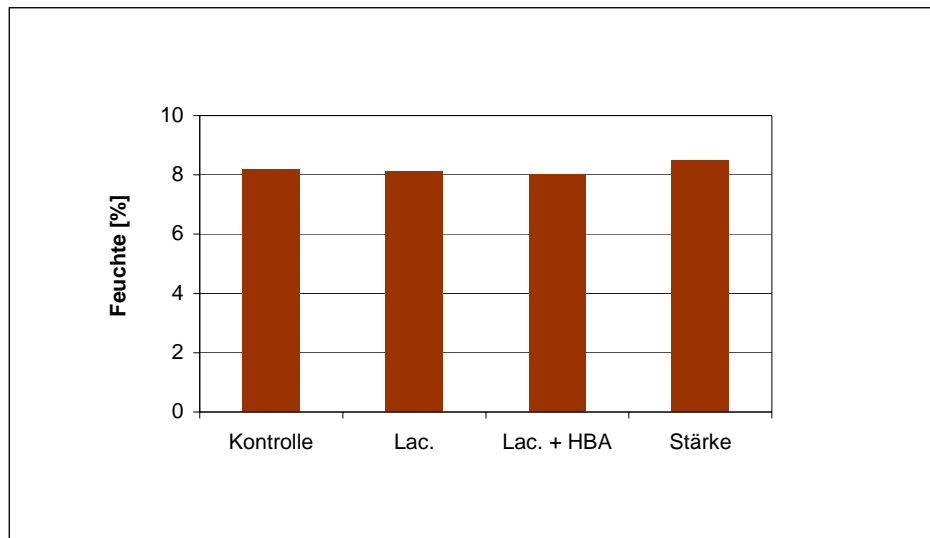


Abb. 57: Ausgleichsfeuchte u_{gl} bezogen auf das Normklima (Kontrolle = Holzfasern im Puffergemisch, Lac. = Laccase inkubierte Holzfasern, Lac. + HBA = Laccase und HBA inkubierte Holzfasern, Stärke = stärkegebunden)

In Abbildung 58 sind die durchschnittlichen, durch zwei-, bzw. 24-stündige Quellung verursachten Gewichtsänderungen der Proben im Verhältnis zum Ausgangszustand aufgeführt. Dabei ist die Gewichtszunahme proportional zur Wasseraufnahme.

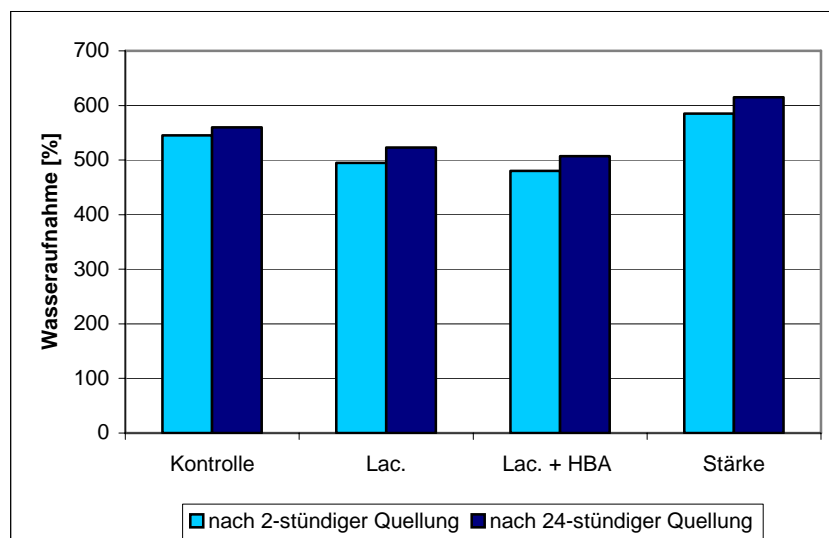


Abb. 58: Wasseraufnahme nach zwei- und 24-stündiger Quellung (Kontrolle = Holzfasern im Puffergemisch, Lacc = Laccase inkubierte Holzfasern, Lacc + HBA = Laccase und HBA inkubierte Holzfasern, Stärke = stärkegebunden)

Bei der Betrachtung der Wasseraufnahme bzw. Gewichtszunahme wird deutlich, dass relativ hohe Werte gemessen werden, die teilweise über 500 % liegen und die bereits nach 2 Stunden erreicht werden. So wird bei der Kontrollprobe eine Wasseraufnahme von etwa 550 % nach 2 Stunden im Wasser ermittelt, die nach insgesamt 24 Stunden nicht wesentlich mehr wird (560 %). Bei der Verwendung von 200 U/ml Laccase ist die Wasseraufnahme mit

490 % nach 2 Stunden und 515 % nach 24 Stunden etwas geringer. Wird der Mediator HBA in die Inkubationslösung hinzugegeben, liegen die Werte bei 480 % (nach 2 Stunden) und 505 % (nach 24 Stunden). Die höchste Wasseraufnahme bzw. Gewichtszunahme wird bei der stärkegebundenen Holzfaserdämmplatte ermittelt, 590 % nach 2 Stunden Wasserlagerung und 610 % nach 24 Stunden.

Abbildung 59 zeigt die relative Veränderung der Plattendicke (d. h. senkrecht zur Plattenebene) nach zwei- und 24-stündiger Quellung.

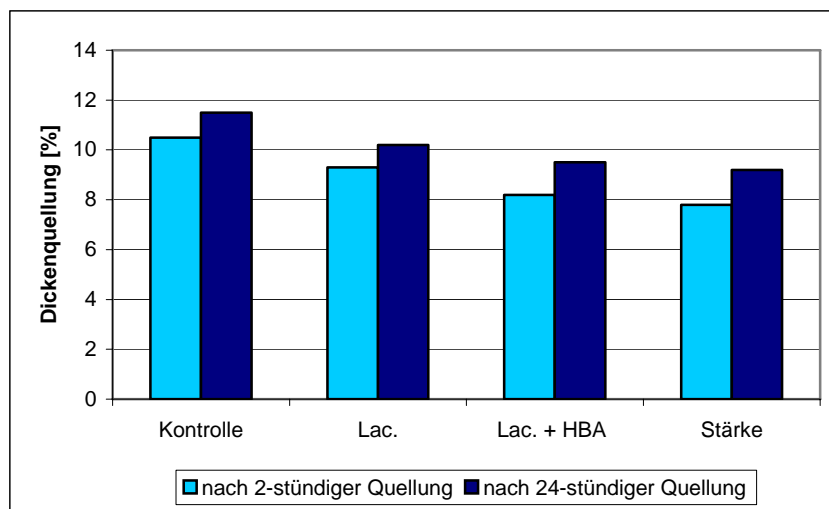


Abb. 59: Dickenquellung nach zwei- und 24-stündiger Quellung (Kontrolle = Holzfasern im Puffergemisch, Lac. = Laccase inkubierte Holzfaser, Lac. + HBA = Laccase und HBA inkubierte Holzfaser, Stärke = stärkegebunden)

Während bei der Kontrollprobe Dickenquellwerte von 10,3 % nach 2 Stunden und 11,5 % nach 24 Stunden ermittelt werden, liegen die der anderen Proben darunter. So quillt die Laccase gebundene Dämmplatte 9 % (nach 2 Stunden) und 10,2 % (nach 24 Stunden). Eine 2-stündige Wasserlagerung der Laccase und Mediator gebundenen Dämmplatte bewirkt eine Quellung um 8,1 %, eine 24-stündige 9,4 %. Auf etwa gleichem Niveau liegt die stärkegebundene Dämmstoffplatte, bei der nach 2 Stunden Wasserlagerung 7,9 % und 9,1 % nach 24-stündiger Quellung gemessen werden.

Wie bei der Wasseraufnahme bzw. Gewichtszunahme (siehe Abbildung 58) nehmen die Werte der Dickenquellung nach 24 Stunden im Vergleich zu 2 Stunden Wasserlagerung kaum noch zu. Bei dem Vergleich der beiden Kriterien Wasseraufnahme und Dickenquellung wird deutlich, dass relativ hohe Wasseraufnahmen und somit Gewichtszunahmen um 500 % bei Holzfaserdämmplatten keine hohe Zunahme der Plattendicken verursachen müssen. Da die Holzfaser in Dämmplatten mit einer geringen Rohdichte um 160 kg/m^3 im Verhältnis zur

Plattendimension und somit zur Plattendicke weniger kompakt orientiert sind als zum Beispiel bei Mitteldichten Faserplatten (MDF) mit Rohdichten von 550 kg/m^3 bis 800 kg/m^3 (siehe Kapitel 3.6), wird es ermöglicht, eine große Menge an Wasser aufzunehmen, ohne eine starke Plattendimensionsänderung zu verursachen.

Die Ergebnisse der Querkzugfestigkeitstests an den Dämmstoffplatten werden in Abbildung 60 gezeigt.

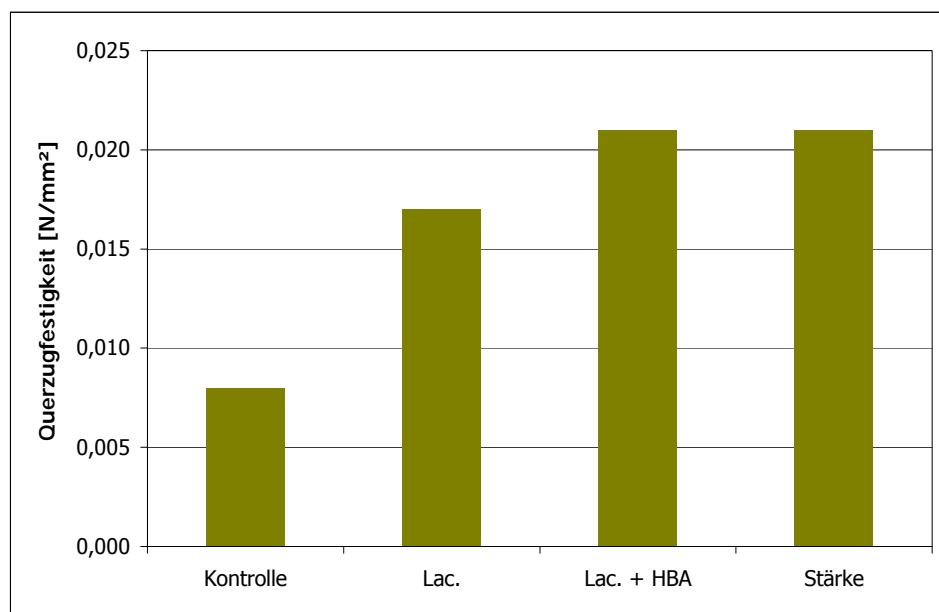


Abb. 60: Querkzugfestigkeit mit Normvorgabe aus EN 1607

Die Laccase und Laccase-Mediator behandelten Dämmplatten weisen mit $0,017 \text{ N/mm}^2$ und $0,021 \text{ N/mm}^2$ im Verhältnis zu der Kontrollplatte deutlich höhere Querkzugfestigkeiten auf ($0,008 \text{ N/mm}^2$). Die zusätzlich mit Mediator gebundene Dämmplatte erreicht dabei den gleichen Wert, wie die Kartoffel-Stärke gebundene Platte. Die Spezifikationsnorm EN 13171 („Werkmäßig hergestellte Produkte aus Holzfasern“) legt keine Anforderungsniveaus für eine vorgegebene Eigenschaft fest, die die Gebrauchstauglichkeit für einen bestimmten Anwendungsfall gewährleisten. Somit ist die Anforderung einer Dämmplatte stark nach ihrer Anwendung orientiert. Die nach der EN 1607 bestimmten Querkzugfestigkeiten gelten für Wärmedämmstoffe für das Bauwesen. Nach der Einteilung in Plattendicken zufolge sind nach dieser Norm bei 20 mm 20 kPa ($0,02 \text{ N/mm}^2$) erforderlich, um diese Norm zu erfüllen. Mit einer Querkzugfestigkeit von $0,021 \text{ N/mm}^2$ erfüllen die Laccase-Mediator gebundene und die Stärke gebundene MDF-Platten diese Vorgaben.

Wie bei den industriell gefertigten Holzfaserdämmstoffplatten werden die hier hergestellten Platten nach der Behandlung in der Inkubations- bzw. Kartoffel-Stärkelösung in einem

Gießformkasten entwässert und kalt gepresst (siehe Kapitel 4.1.9). Anstelle der Trocknung in Trockenöfen bei 170°C werden die Platten in einer Mikrowelle (siehe Kapitel 4.2.12) getrocknet. Diese Art der Trocknung hat den Vorteil, dass die in der Dämmplatte enthaltene Feuchte innerhalb von Minuten reduziert werden kann. Dagegen dauert ein Trocknungsvorgang im Konvektionsofen pro Zentimeter Plattendicke etwa eine Stunde (vgl. Kapitel 3.7). Weitere Vorteile der Mikrowellentrocknung sind nach MEREDITH (1998) die volumetrische Erwärmung direkt im Trocknungsgut, die fast gleichmäßige Feuchtigkeitsabnahme im gesamten Trockengut, ein niedriger spezifischer Energieverbrauch und ein geringer Platzbedarf der Mikrowellenanlage (siehe Kapitel 4.1.9.1).

Bei der Mikrowellentrocknung werden entscheidende Beobachtungen gemacht. Kurz nach dem Anschalten der Mikrowelle werden die Dämmplatten im Inneren 100 °C warm, wodurch das in den Platten enthaltene Wasser verdampft. Diese Temperatur bleibt solange erhalten bis die Plattenfeuchte oberhalb von 10 % liegt. Ab einer Feuchte von 10 % und steigt im Platteninneren die Temperatur auf etwa 150 °C an, da immer weniger Wasserdampf entweicht. Der Trocknungsvorgang wird daraufhin unterbrochen. Als optimale Trocknungsdauer für die in dieser Dissertation hergestellten Holzfaserdämmplatten mit 2 cm Dicke werden etwa 10 Minuten ermittelt.

Dabei ist die kurzzeitige Temperatur der Holzfaserdämmplatte von 150 °C von hoher Bedeutung für die Verklebung der Laccase bzw. Laccase und Mediator inkubierten Holzfasern. Berücksichtigt man einige analytische Ergebnisse dieser Arbeit (Kapitel 5.4, 5.6 bis 5.10), so kann festgestellt werden, dass durch die Einwirkung der Laccase bzw. Laccase und Mediator das Mittellamellenlignin auf der Holzfaseroberfläche aktiviert und radikalisiert wird, um neue Ligninbindungen einzugehen. Die Temperatur von 150 °C liegt über der Glasübergangstemperatur bei 123 °C (vgl. Kapitel 3.5.2), so dass neben dem mechanischen Druck beim Kaltpressen durch die thermische Einwirkung ein zusätzlicher Effekt in der Verklebung der Holzfasern stattfindet und der Holzfaserdämmplatte eine höhere Stabilität verleiht. Bei dem Vergleich der Querkzugfestigkeiten (siehe Abbildung 60) reichen die Festigkeitswerte der Laccase-Mediator behandelten Dämmplatten an die der Kartoffel-Stärke gebundenen heran. Auch die relativ guten Eigenschaftswerte der Kontrollplatten, bei denen die Holzfasern zuvor nur in Puffer inkubiert wurden, liegen ebenfalls in der Autoadhäsion (Kapitel 3.2.1) begründet, da sich die auf der Faser Oberfläche befindliche Ligninkruste durch die Überschreitung der Glasübergangstemperatur von den cellulotischen Bestandteilen löst und nach der Verdichtung durch den Pressdruck sowie dem Erkalten der Dämmplatte eine Verklebung der Holzfasern zueinander hervorruft.

Durch Herstellung und Überprüfung einiger mechanisch-technologischer Eigenschaften der Laccase bzw. Laccase und Mediator gebundenen Holzfaserdämmstoffen in dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass diese Form der Herstellung für eine Anwendung in der Dämmstoffindustrie in Frage kommen kann.

5.12 Mechanisch-technologische Eigenschaften Laccase gebundener MDF - Platten

5.12.1 Allgemeines

In den folgenden Tabellen und Abbildungen sind die Ergebnisse der mechanisch-technologischen Eigenschaften der Laccase bzw. Laccase und Mediator gebundenen MDF – Platten, sowie der Referenzplatten dargestellt. Bei den Daten handelt es sich um gemittelte Werte aus mehreren Wiederholungen sämtlicher Probenvarianten. Je nach Probenvariante wurden 5 bis 6 MDF-Platten an der MDF-Pilotanlage hergestellt (siehe Kapitel 4.1.9.2, Abbildung 13). Zusätzlich wurden bei einigen Probenvarianten in gesonderten Produktionsversuchen neben den Inkubationszeiten die Besprühungsverfahren, die Rohdichten, die Plattenstärken und die Presstemperaturen variiert. Jede Variante wurde mindestens zweimal wiederholt (vgl. Kapitel 4.2.13, Tabelle 6). Die Überprüfung der Quersugs- und Biegefestigkeiten erfolgte an der *Zwick-Roell*-Prüfmaschine (siehe Kapitel 4.1.11), die Überprüfung der Rohdichten an dem Rohdichteprofilmessgerät DA-X von *GreCon* (siehe Kapitel 4.1.11). Die Ermittlung der Dickenquellwerte nach 24 h Wasserlagerung wurde gemäß EN 317 durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.10.2).

Zur Interpretation der mechanisch-technologischen Eigenschaftswerte dienen die Maßgaben des DEUTSCHEN INSTITUTS FÜR NORMUNG (2005) (siehe Tabelle 11). In den Ergebnisdiagrammen sind die erforderlichen Eigenschaftswerte durch unterbrochene Linien und der dazugehörigen Bezeichnung der jeweils relevanten Europäischen Norm (EN) gekennzeichnet.

Tab. 11: Anforderungen an MDF-Platten für allgemeine Zwecke zur Verwendung im Trockenbereich (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG e. V., 2005)

Eigenschaft	Prüfverfahren	Einheit	Nennickenbereiche (mm)								
			1,8 bis 2,5	> 2,5 bis 4,0	> 4 bis 6	> 6 bis 9	> 9 bis 12	> 12 bis 19	> 19 bis 30	> 30 bis 45	> 45
Quersugsfestigkeit	EN 319	N/mm ²	0,65	0,65	0,65	0,65	0,60	0,55	0,55	0,50	0,50
Biegefestigkeit	EN 310	N/mm ²	23	23	23	23	22	20	18	17	15
Dickenquellung 24 h	EN 317	%	45	35	30	17	15	12	10	8	6

In dieser Übersicht (Tabelle 11) sind die drei wesentlichen mechanisch technologischen Eigenschaften aufgeführt, die Quersugsfestigkeit, die Biegefestigkeit und die Dickenquellung nach 24 h Wasserlagerung. Die Prüfverfahren für diese Eigenschaften sind den EN-Normen 319, 310 und 317 beschrieben. Sie gelten für MDF-Platten für allgemeine Zwecke zur

Verwendung im Trockenbereich. Die Mindestanforderungen bei der Querkzug- und Biegefestigkeit und die Höchstanforderung bei der Dickenquellung zum Erfüllen dieser Normen sind für bestimmte Nenndickenbereiche definiert und unterscheiden sich. Folglich sind hier neun Nenndickenbereiche von 1,8 mm bis 45 mm aufgelistet. Die für diese Arbeit relevanten Nenndickenbereiche sind 6 mm bis 9 mm und 9 mm bis 12 mm, da MDF-Platten mit 8 mm und 10 mm Dicke hergestellt wurden. Im Nenndickenbereich 6 mm bis 9 mm sind mindestens 0,65 N/mm² Querkzugfestigkeit, 23 N/mm² Biegefestigkeit und unter 17 % Dickenquellung notwendig, um die Normen zu erfüllen. Im Nenndickenbereich 9 mm bis 12 mm muss die Querkzugfestigkeit über 0,60 N/mm² und die Biegefestigkeit über 22 N/mm² liegen, der Dickenquellwert der MDF-Platten unter 15 %.

5.12.2 Voraussetzungen für die Herstellung Laccase und Laccase-Mediator gebundener MDF-Platten

Durch die analytischen Untersuchungen in dieser Dissertation wurden wichtige Ergebnisse gewonnen, die für die Herstellung Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundener MDF-Platten berücksichtigt werden konnten. So stellte sich beispielsweise in Ligninmodellversuchen mittels Gel-Permeations-Chromatographie heraus, dass sich bei dem Vergleich verschiedener Mediatoren in der Laccase-Pufferlösung der Mediator 4-Hydroxybenzoesäure (HBA) am besten eignete (vgl. Kapitel 5.4). Mit diesem wurden die höchsten Molekulargewichtsverteilungen des Lignins gemessen, als Folge einer hohen Radikalisierung der Ligninmoleküle. Somit fiel die Entscheidung, diesen Mediator für die Herstellung der MDF-Platten zu nutzen. Als Konzentrationen in der Inkubationslösung wurden 10 mM und 20 mM gewählt. Ebenso wurde mittels GPC, aber auch anderen Versuchen, wie die spectrophotometrische Bestimmung der phenolischen Hydroxyl-Gruppen (Kapitel 5.7), der Elektronenspin-Resonanz (Kapitel 5.8), Nuclear-Magnetischer-Resonanz (Kapitel 5.9) und Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (Kapitel 5.10) herausgefunden, dass mit einer Konzentration von 100 U/ml und besonders 200 U/ml der *Novozyme* Laccase 51003 gute Untersuchungsergebnisse zu erreichen waren. Diese Ergebnisse führten dazu, sich bei der MDF-Plattenherstellung auf beiden Laccasekonzentrationen zu konzentrieren. Der pH-Wert der Inkubationslösung sollte dabei 6,0 betragen, da sich bei der Analyse der *Novozyme* Laccase (Kapitel 5.3) herausgestellt hat, dass ihr pH-Optimum und ihre höchste pH-Stabilität bei diesem pH-Wert liegt. Darüber hinaus konnte die Abhängigkeit vom pH-Wert in der Inkubationslösung bei der Bestimmung der phenolischen Hydroxyl-Gruppen in der Suspension inkubierter Holzfasern verdeutlicht werden. Es stellte sich heraus, dass bei dem pH Wert 6,0 in einer Inkubationslösung mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA die

höchste Extinktion an phenolischen Hydroxyl-Gruppen erreicht werden (Kapitel 5.7). Ein weiteres Kriterium für die Herstellung der MDF-Platten war die Inkubationszeit der Fasern. Bei allen analytischen Untersuchungen wurde eine Inkubationszeit von 2 Stunden als optimale Dauer ermittelt. Für diese Zeitdauer sollten die Holzfasern für die MDF-Platten zunächst auch inkubiert werden.

Als Besprühungsverfahren wurde das für MDF-Platten typische Trockenverfahren gewählt (siehe Kapitel 3.6.1 und 3.8.1), wobei die Fasern im Mischer der *BINOS* Pilotanlage mit Inkubationslösung besprüht wurden. So wurde auf die Herstellung der Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen Platten nach dem Nassverfahren verzichtet. Die Gründe dafür sind, da sich beim Nassverfahren deutliche ökonomische und ökologische Nachteile gegenüber dem Sprühverfahren ergeben, was sich besonders in der hohen Trocknungsdauer und Trocknungsintensität, sowie in der Restwasserentsorgung deutlich macht (siehe Kapitel 3.8.2). Auf einen Einsatz eines Hydrophobierungsmittels (z.B. Wachse, Fette, Harze, Fettsäuren) zur Senkung der bei Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten erwartungsgemäß hohen Dickenquellwerte nach 24 h Wasserlagerung wurde verzichtet (Begründung siehe Kapitel 5.12.4.4).

5.12.3 Auswahl optimaler Herstellungsparameter für die MDF-Platten Produktion

Weitere Kriterien, wie die optimale Presstemperatur und Pressdauer, die optimale Rohdichte und Plattenstärke sollen im Folgenden ermittelt werden und neben den in Kapitel 5.12.3 genannten Voraussetzungen für den Herstellungsprozess der MDF-Platten mit einbezogen werden.

5.12.3.1 Ermittlung einer optimalen Presstemperatur

Als wichtiger Herstellungsparameter für MDF Platten gilt die Presstemperatur. Gerade für Laccase gebundene Platten ist die Temperatur von großer Bedeutung, da die durch Einwirkung der Laccase gebildeten Ligninfragmente an der Faseroberfläche durch den thermischen Prozess repolymerisiert werden können (KHARAZIPOUR, 2002). Dabei ist es von Bedeutung, dass die Presstemperatur für Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundene MDF-Platten optimiert ist. Eine zu geringe Presstemperatur kann den gewünschten Effekt der erneuten „Verklebung“ der Ligninfragmente nicht zur Genüge erfüllen und somit der MDF-Platte zu wenig Stabilität verleihen, eine zu hohe Temperatur kann eine zu starke

Verkrustung und Bräunung an der Plattenoberfläche hervorrufen, dass die MDF-Platte spröde und somit bruchempfindlicher wird. Zudem muss gewährleistet werden, dass durch die Temperatur und der damit verbundenen Pressdauer für die Erfüllung der mechanisch technologischen Eigenschaftstests eine gleichmäßig verteilte Festigkeit in der Faserplatte herrschen muss, also sowohl an der Plattenoberfläche, als auch im Inneren der Platte.

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der mechanisch technologischen Eigenschaftsprüfungen von den drei Plattenvarianten Kontrolle, Laccase und Laccase-Mediator gebunden für jeweils drei unterschiedliche Presstemperaturen dargestellt. Die Herstellung der aufgeführten Varianten bei unterschiedlichen Presstemperaturen ist mehrfach wiederholt worden. Die MDF-Platten sind 8 mm stark, die Presszeit betrug 37,5 s/mm Plattendicke.

Tab. 12: Mechanisch–technologische Eigenschaften verschiedener MDF-Platten bei unterschiedlichen Presstemperaturen

Probenbezeichnung	Kontrolle			100 U/ml Laccase gebunden			100 U/ml Laccase und 10 mM Mediator gebunden		
	190	200	210	190	200	210	190	200	210
Presstemperatur [°C]	190	200	210	190	200	210	190	200	210
Querzugfestigkeiten [N/mm ²]	0,03	0,08	0,06	0,15	0,29	0,28	0,26	0,39	0,36
Biegefestigkeiten [N/mm ²]	10,60	16,60	16,50	17,90	23,40	21,90	19,10	26,50	24,60
Dickenquellung [%]	264,00	113,00	120,10	187,00	77,00	110,30	153,40	64,00	77,90

Beim Vergleich der Querzugfestigkeiten bei verschiedenen Presstemperaturen fällt auf, dass die höchsten Festigkeitswerte bei allen drei Probenvarianten immer bei einer Temperatur von 200 °C vorliegen, wobei die Unterschiede von den mit 200 °C zu den mit 210 °C gepressten Platten geringer sind, als zu den mit 190 °C hergestellten Platten. Somit werden beispielsweise bei den Laccase-Mediator gebundenen Platten bei 200 °C Presstemperatur 0,39 N/mm² und bei 210 °C 0,36 N/mm² ermittelt, bei 190 °C lediglich 0,26 N/mm². Auch bei den Biegefestigkeiten ist diese Tendenz deutlich erkennbar. Die bei 200 °C gepressten MDF-Platten haben die höchsten Biegefestigkeiten. Während der Wert für die 200 °C gepressten Laccase-Mediator Platten 26,5 N/mm² beträgt, sind es bei 190 °C und 210 °C Presstemperatur 19,1 N/mm² und 24,6 N/mm². Beim Betrachten der Dickenquellung liegen die niedrigsten Quellwerte ebenfalls bei den MDF-Platten, die bei 200 °C hergestellt wurden. So quellen die bei 190 °C gepressten Platten um mehr als das Doppelte als die bei 200 °C hergestellten Platten. Beispielsweise beträgt die Dickenzunahme der bei 190 °C gepressten Laccase-Mediator Platten mit 153,4 % 2,4 mal so viel wie bei den bei 200 °C produzierten

Platten (64 %). Der Unterschied zwischen 200 °C und 210 °C fällt geringer aus, doch quellen die bei 210 °C gepressten Laccase-Mediator Platten um 13,9 % mehr (77,9 %). Vergleicht man die mechanisch-technologischen Eigenschaften der verschiedenen Plattenvarianten untereinander, so lässt sich eine Verbesserung der Ergebnisse von Kontrollplatten über Laccase gebundene MDF-Platten und Laccase-Mediator gebundene MDF-Platten erkennen, welche insgesamt die besten Eigenschaftswerte aufweisen.

Durch die Untersuchung der verschiedenen Presstemperaturen kann gezeigt werden, dass sich unter diesen Versuchsbedingungen eine Presstemperatur von 200 °C für Laccase gebundene MDF-Platten besser eignet als Temperaturen von 190 °C oder 210 °C. Die Ergebnisse der mechanisch technologischen Eigenschaftstests zeigen, dass bei der Herstellung Laccase bzw. Laccase und Mediator gebundener MDF-Platten mit 8 mm Nenndicke eine Temperatur von 190 °C nicht ausreicht, um hohe Querkzug- und Biegefestigkeiten sowie geringe Dickenquellwerte zu erhalten. Selbst die Kontrollplatten, die ohne Laccase und Laccase-Mediator-Lösung besprüht wurden, werden bei höheren Presstemperaturen stabiler und quellen weniger. Auch wenn in früheren Untersuchungen bei Laccase gebundenen MDF-Platten bei 190 °C respektable Festigkeits- und Quelleigenschaften erreicht wurden, so sind diese bei einer Plattenstärke von 5 mm getestet worden (KHARAZIPOUR, 1996, 2002, BERGMANN 1998). Bei WIDSTEN (2002) wurden Laccase inkubierte MDF-Platten zwischen 170 und 190 °C hergestellt, doch handelte es sich ebenfalls um andere Versuchsbedingungen (Rohdichten bis zu 950 kg/m³, Plattendicke 12 mm, Presszeiten über 6 Minuten). WIDSTEN (2002) stellte fest, dass bei 190 °C die besten mechanisch technologischen Eigenschaften erzielt werden konnten.

In diesem Fall gelten die Werte (siehe Tabelle 12) für 8 mm starke Platten. Die Plattenstärke könnte eine mögliche Ursache dafür sein, dass 190 °C Presstemperatur in Verbindung mit einer Pressdauer von 37,5 s/mm Plattendicke nicht ausreichen, um die auf der Faser Oberfläche durch die Laccase gebildeten Ligninfragmente durchgehend zu repolymerisieren. So könnte während des Pressvorgangs in der Plattenmitte eine zu geringe Temperatur erreicht worden sein, die für eine „Verklebung“ der Ligninfragmente unzureichend ist (FELBY et al., 2002). Die Folge wäre eine Destabilisierung der Faserplatte. Demnach könnte eine Verlängerung der Presszeit in Betracht gezogen werden, doch könnte sich eine längere Presszeit nachteilig auf den Produktionsablauf und die Produktionskosten auswirken. (Kapitel 5.12.3.2 beschäftigt sich mit einer Überprüfung von mechanisch-technologischen Platteneigenschaften zu unterschiedlichen Presszeiten.)

Bei einer Erhöhung der Presstemperatur um 10 °C auf 200 °C ist eine deutliche Steigerung der mechanisch-technologischen Eigenschaften erkennbar. Demnach muss die höhere Temperatur bei einer gleichen Pressdauer von 37,5 s/mm eine bessere Aktivierung und erneute Polymerisierung der Ligninfragmente im Platteninneren bewirkt haben. Somit besitzen die Laccase gebundenen MDF-Platten bessere Querkzugs- und Biegefestigkeiten,

sowie eine geringere Dickenquellung. Zu diesem Ergebnis kommen auch FELBY et al. (2002), die bei einer Presstemperatur von 200 °C eine ausreichende Aktivierung des Lignins zur Bindung der Fasern untereinander sehen. Durch die höhere Temperatur kann bei ausreichender Presszeit ein Erreichen der Glasübergangstemperatur des Lignins im Platteninneren gewährleistet werden (FELBY et al, 2002). Selbst bei den Kontrollplatten, die ohne jeglichen Einsatz von Laccase und/oder Mediator hergestellt wurden, ist eine Steigerung der Festigkeiten und eine Senkung der Dickenquellwerte zu erkennen. Dies kann auch an einer Aktivierung der Ligninkruste auf den Oberflächen der einzelnen Fasern liegen, die alleine durch die thermische Einwirkung hervorgerufen wurde (vgl. Kap. 3.2.1). So kann durch diese Ligninbestandteile eine „Verklebung“ der Fasern untereinander stattgefunden haben, welches auf die Autoadhäsion der Holzfasern zurückzuführen ist (siehe Kapitel 3.2.1).

Trotz der besseren Eigenschaftswerte bei den bei 200 °C gepressten MDF-Platten ist es denkbar, dass durch eine weitere Erhöhung der Presstemperatur auf 210 °C eine noch höhere Stabilität der Faserplatten erreicht werden kann. Doch wie die Untersuchungsergebnisse zeigen, ist eine Verschlechterung der Werte eingetreten. Die Ursache hierfür ist scheinbar eine zu starke Hitzeeinwirkung auf die Holzfasern an der Plattenoberfläche, was zu einer Destabilisierung geführt haben muss. Die MDF-Platten werden dunkel gefärbt, werden spröde und brüchig. Aufgrund der schlechten Ergebnisse der Eigenschaftstest und der rein optischen Betrachtung ist von einer Herstellung der MDF-Platten bei einer Presstemperatur von 210 °C abzuraten. Jedoch könnte eine Verkürzung der Presszeit ein Beibehalten dieser Presstemperatur und somit eine Verbesserung der mechanisch-technologischen Eigenschaften ermöglichen. Dies wird aber nach Betrachtung der Temperaturverlaufskurve (Abbildung 61) als unwahrscheinlich gehalten.

Temperaturverlauf in einer MDF-Platte während des Pressvorgangs

Eine Übersicht über den Temperaturverlauf in Abhängigkeit von der Pressdauer im Platteninneren während des Pressvorgangs bei 200 °C bietet die Abbildung 61.

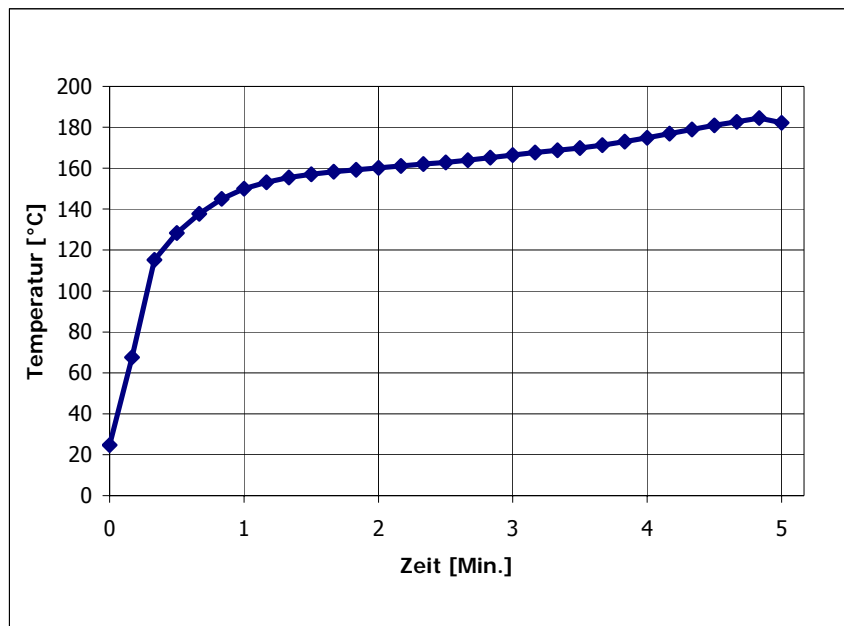


Abb. 61: Temperaturverlauf in der Plattenmitte einer 8 mm starken mit Laccase und Mediator gebundenen MDF-Platte während des Heißpressvorgangs bei 200 °C

Es handelt sich um eine MDF-Platte, aus der Serie mit einer Inkubationslösung aus 200 U/ml Laccase und 10 mM HBA im McIlvaine Puffer, die mit Temperaturfühlern versehen wurde. Innerhalb einer Presszeit von 5 Minuten wurden durch das Temperaturmessgerät 10-sekündlich Temperaturen erfasst, die den in Abbildung 61 aufgezeigten Verlauf ergaben.

In der ersten Minute des Pressvorganges steigt die Temperatur im Platteninneren zügig auf etwa 150 °C an, um danach sich langsam bis auf etwa 185 °C in der fünften Minute zu steigern. Diese Gradzahl stellt hier die Höchsttemperatur in der MDF-Platte dar, denn beim Öffnen der Heißpresse nach exakt 5 Minuten beträgt die Temperatur nur noch etwa 182 °C. Die Ursache hierfür muss sein, dass das in der 8 mm starken MDF-Platte enthaltene Wasser (in der Regel waren es 10 – 14 % Feuchte) innerhalb der ersten 1 bis 2 Minuten Presszeit so stark verdampfen muss, dass die Temperatur nur noch langsam zunimmt. SCHÖPPER (2006) schreibt, dass ein Großteil des in den MDF-Platten enthaltenen Wassers bereits in der ersten bis zweiten Minute verdampft ist und das Fasermaterial an sich die Hitze nicht mehr effektiv in die Plattenmitte transportieren kann. So werden kurz vor der Beendigung des Pressvorganges im Platteninneren lediglich 185 °C gemessen, während an der Plattenoberfläche, bedingt durch die Pressbacken der Heißpresse, eine Temperatur von 200 °C herrscht. Die leichte Temperatursenkung auf 182 °C beim Erreichen der 5-minütigen Presszeit kann ein Zeichen dafür sein, dass auch die letzten Wasseranteile aus den Fasern

verdampft sind und eine weitere Hitzeleitung in den Fasern unterbleibt. Somit scheinen unter diesen Versuchsbedingungen Presszeiten von unterhalb oder bzw. bis etwa 5 Minuten geeignet zu sein, um Laccase und auch Laccase-Mediator gebundene MDF-Platten herzustellen. Eine genauere Betrachtung zur Optimierung der Presszeit bieten die Untersuchungen im Kapitel 5.12.3.2.

5.12.3.2 Ermittlung einer optimalen Pressdauer

Neben der Ermittlung der für die Herstellung von Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten optimalen Parameter beim Verpressen der Platten, wie die Temperatur, ist die Presszeit von hoher Bedeutung, da sich diese entscheidend auf die mechanisch-technologischen Eigenschaften auswirkt.

I. Querzugfestigkeit in Abhängigkeit von der Pressdauer

In Abbildung (62) sind die Querzugfestigkeiten von Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten dargestellt. Hergestellt sind die 8 mm starken MDF-Platten mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA, einer vorherigen Inkubationszeit von 30 Minuten und einer Presstemperatur von 200 °C.

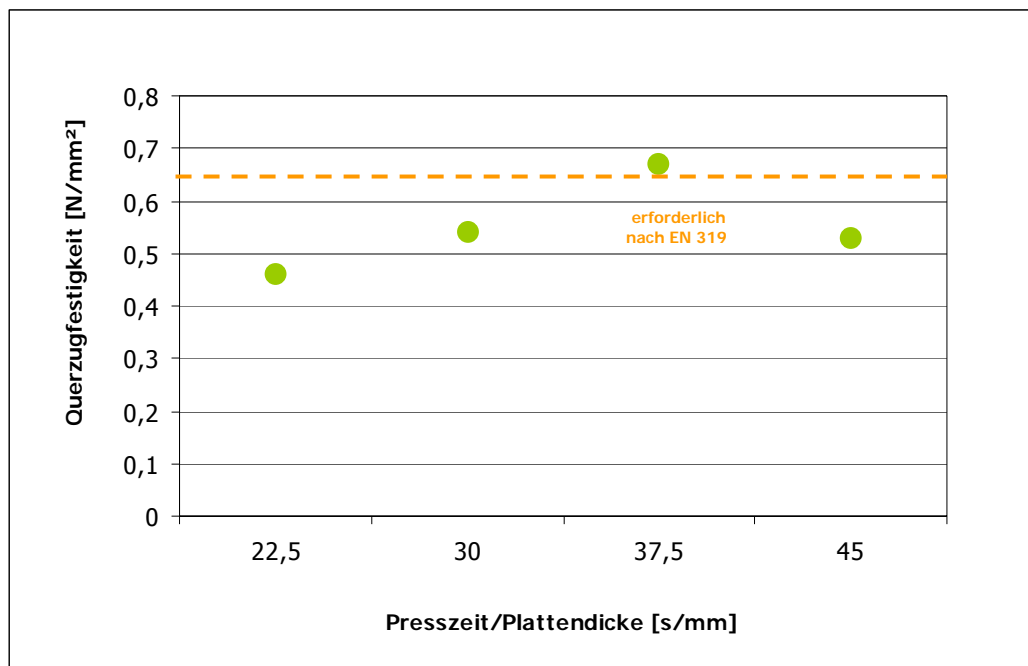


Abb. 62: Querzugfestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten in s/mm Plattendicke (22,5 s. entsprechen einer Gesamtpresszeit von 3 Min., 30 s. entsprechen 4 Min., 37,5 s. entsprechen 5 Min. und 45 s. entsprechen 6 Min.)

Bei der Betrachtung der Querzugfestigkeiten bei unterschiedlichen Presszeiten fällt auf, dass die Querzugfestigkeiten mit zunehmender Pressdauer ansteigen und bei 45 s/mm wieder absinken. So wird die höchste Querzugfestigkeit von 0,67 N/mm² bei 37,5 s/mm, was einer Zeit von 5 Minuten entspricht, erreicht. Dieser Wert erfüllt die Mindestanforderung für 8 mm starke MDF-Platten, die nach der EN-Norm 319 0,65 N/mm² beträgt. Die Querzugfestigkeit bei 22,5 s/mm liegt bei 0,46 N/mm², im Vergleich die Geringste. Bei einer Presszeit von 30 s/mm sind 0,54 N/mm² und bei 45 s/mm 0,53 N/mm² zu nennen.

Bei sämtlichen Varianten an Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten werden bei 37,5 s/mm oder 5 Minuten Presszeit jeweils die höchsten Querzugfestigkeiten erreicht. Bei kürzeren und auch einer längeren Presszeit liegen die Querzugfestigkeitswerte etwa im gleichen Verhältnis unterhalb des Höchstwertes. Die oben genannten Werte und deren Unterschied zu verschiedenen Presszeiten sind somit repräsentativ für alle Plattenvarianten (vgl. Anhang 3 bis 7).

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen aus der Temperaturverteilung (siehe Kapitel 5.12.3.1, Abbildung 61) in Abhängigkeit von der Pressdauer im Inneren einer MDF-Platte, so wurde im vorherigen Kapitel 5.12.3.1 festgestellt, dass eine Presszeit von etwa 5 Minuten für Laccase gebundene Platten geeignet ist, um eine höchstmögliche Temperierung beim Pressvorgang auch im Platteninneren zu erhalten. Dadurch wird gewährleistet, dass auch im Platteninneren genügend hohe Temperaturen vorherrschen, damit das aktivierte Lignin auf der Oberfläche der einzelnen Fasern untereinander erneut polymerisiert und die Glasübergangstemperatur des Lignins erreicht wird. Diese liegt zwar bei 123 °C, doch ist mit einer darüber liegenden Temperatur sichergestellt, dass im gesamten Faserverbund eine höchstmögliche Verklebung einsetzt (FELBY et al., 2002).

II. Dickenquellung in Abhängigkeit von der Pressdauer

Neben der Querzugfestigkeit wird bei der mechanisch-technologischen Eigenschaftsprüfung auch die Dickenquellung der Proben nach 24 h Wasserlagerung ermittelt. Wie sich die Dickenquellwerte bei unterschiedlichen Presszeiten auswirken ist in Abbildung 63 dargestellt. Es handelt sich hierbei um die Messdaten für die gleiche Probenvariante wie in Abbildung 62 (Probe L200 + HBA 10).

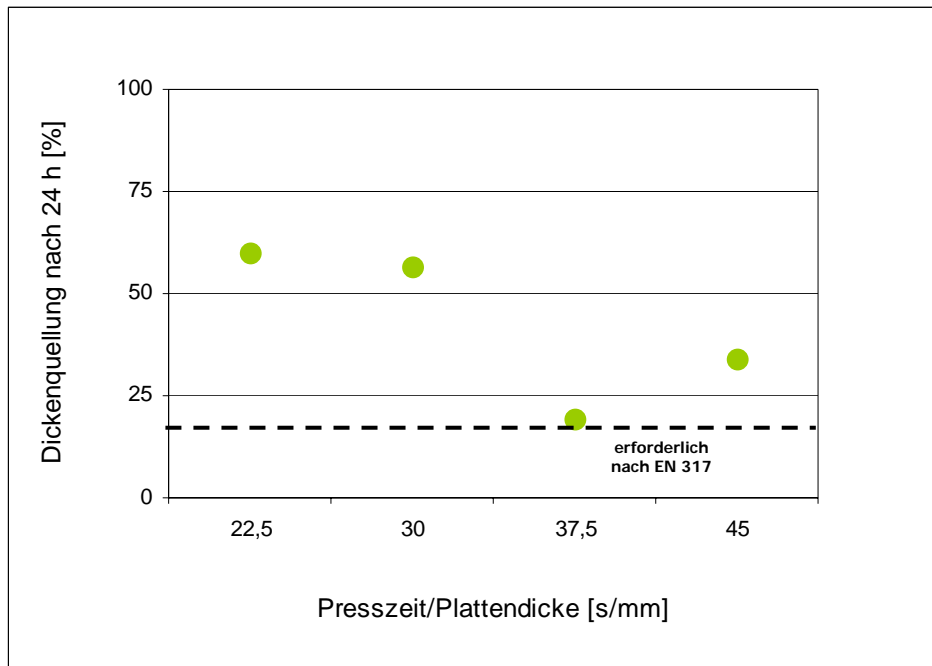


Abb. 63: Dickenquellwerte nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten in s/mm Plattendicke

Die gemessenen Dickenquellwerte besagen, in welchem Maße die Plattendicke – in diesem Fall 8 mm - nach der Wasserlagerung zunimmt. In der Norm EN 317 ist hierfür ein Maximalwert von 17 % vorgegeben. So liegt die Dickenquellung bei den Proben, die 22,5 s/mm lang gepresst wurden, bei 60 % - in diesem Vergleich der höchste Wert. Bei einer Dauer von 30 s/mm beträgt die Quellung 56 %. Die geringste und sehr nah an der Erfüllung der EN-Norm ist die Dickenquellung bei einer Presszeit von 37,5 s/mm. Sie beträgt 19 %. Bei der längeren Zeit von 45 s/mm in der Heißpresse quellen die Proben wiederum stärker, nämlich um 34 %.

Wie auch bei dem Vergleich der Quersugfestigkeiten zu unterschiedlichen Presszeiten (siehe Abbildung 62) sind die Dickenquellwerte bei allen getesteten Probenvarianten von Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei einer Pressdauer von 37,5 s/mm oder 5 Minuten Gesamtpresszeit am geringsten. Eine Übersicht hierzu bieten die Abbildungen im Anhang 8 bis 12.

Somit lässt sich eine Korrelation der beiden Kennwerte feststellen: Mit zunehmender Quersugfestigkeit sinkt der prozentuale Anteil bei der Dickenquellung.

III. Biegefestigkeit in Abhängigkeit von der Pressdauer

Als weitere wichtige mechanisch-technologische Eigenschaft für die in dieser Arbeit hergestellten MDF-Platten findet eine Überprüfung der Biegefestigkeiten statt. Wie bei der Ermittlung der Querkzugfestigkeit und der Dickenquellung (Abb. 62 und Abb. 63), sind in Abbildung 64 die Biegefestigkeiten der gleichen Probenvariante (L 200 + HBA 10) zu vier Presszeiten aufgeführt.

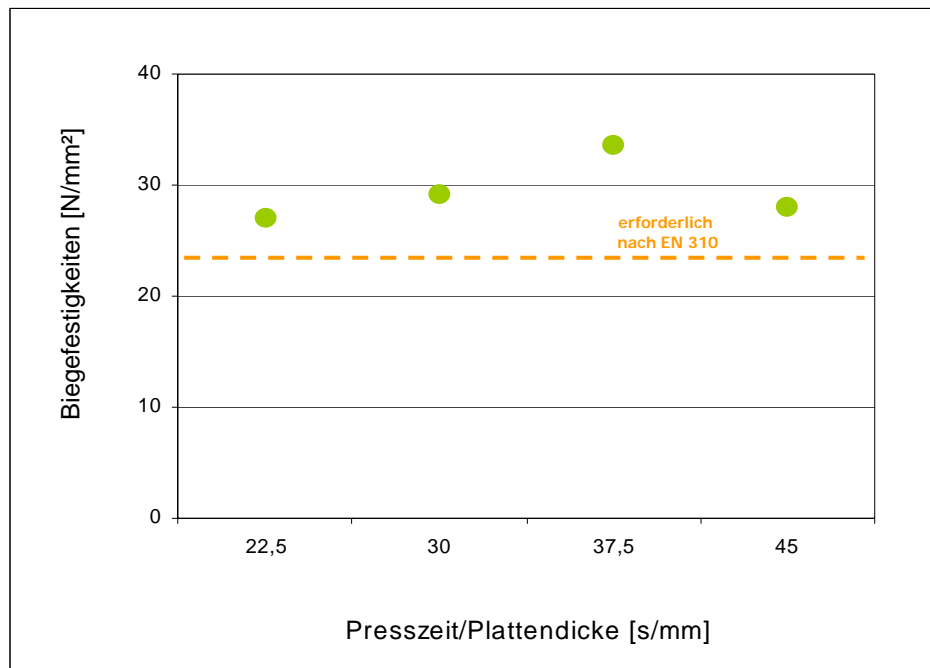


Abb. 64: Biegefestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten in s/mm Plattendicke

Anders als bei den Querkzugfestigkeiten (siehe Abbildung 62) und den Dickenquellungen (siehe Abbildung 63) wird bei allen Presszeiten der in der EN 310 für die Biegefestigkeit vorgegebene Normwert von 23 N/mm² erfüllt. Dennoch lassen sich auch hier Unterschiede feststellen. Die Biegefestigkeit bei einer Presszeit von 22,5 s/mm liegt bei 27 N/mm². Die Werte steigen bis auf maximal 34 N/mm² bei 37,5 s/mm an, da bei 30 s/mm Presszeit 29 N/mm² erreicht werden und bei 45 s/mm bereits wieder 28 N/mm². Im Anhang 13 bis 17 befinden sich weitere Untersuchungen zu den Biegefestigkeiten bei unterschiedlichen Presszeiten.

5.12.3.3 Vergleich von 8 mm und 10 mm starken MDF-Platten

In den Versuchen wurden MDF-Platten mit Dicken von 8 mm und 10 mm gepresst und anschließend die mechanisch-technologischen Eigenschaften ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 aufgeführt. Es handelt sich um die Werte der Kontrollplatten, Laccase gebundener und Laccase-Mediator gebundener Platten mit einer Rohdichte von 800 kg/m³. Für jede Variante sind jeweils die Querkzug- und Biegefestigkeiten sowie die Dickenquellwerte bei 8 mm und 10 mm Plattenstärke eingetragen. Die Laccase gebundenen Platten wurden mit 100 U/ml Laccaseaktivität hergestellt, bei der Variante mit Mediator wurden 10 mM HBA beigefügt. Die Inkubationszeit der Holzfasern betrug 2 Stunden. Anschließend wurden die MDF-Platten bei 200 °C für 5 Minuten (37,5 s/mm) verpresst.

Tab. 13: Vergleich Mechanisch-technologischer Eigenschaften zwischen 8 mm und 10 mm starken MDF Platten

Probenbezeichnung	Kontrolle		100 U/ml Laccase gebunden		100 U/ml Laccase und 10 mM Mediator gebunden	
	8	10	8	10	8	10
Sollstärke [mm]						
Querkzugfestigkeiten [N/mm ²]	0,08	0,03	0,29	0,14	0,39	0,23
Biegefestigkeiten [N/mm ²]	16,60	12,11	23,40	22,00	26,50	23,00
Dickenquellung [%]	113,00	197,00	77,00	146,00	64,00	84,00

Sowohl die Querkzugfestigkeiten der Kontrollproben, als auch die der Laccase und Laccase-Mediator gebundenen Proben sind bei einer Plattenstärke von 8 mm höher als bei einer Plattenstärke von 10 mm. So liegen die Querkzugfestigkeiten der 8 mm Kontrollproben bei 0,08 N/mm² und die der 10 mm starken Kontrollproben bei nur 0,03 N/mm². Bei den Laccase gebundenen Platten sind insgesamt höhere Werte ermittelt worden, doch wiederum mit 0,29 N/mm² bei den 8 mm starken Platten mehr als bei den 10 mm starken Platten, welche eine Festigkeit von 0,14 N/mm² haben. Mit der Verwendung des Mediators steigen die Festigkeiten auf 0,39 N/mm² bei 8 mm und 0,23 N/mm² bei den stärkeren Platten.

Auch bei den Biegefestigkeiten setzt sich der Trend fort, dass die dünneren Platten höhere Festigkeiten aufweisen als die 10 mm starken MDF-Platten. Bei den Kontrollproben stehen 16,6 N/mm² bei 8 mm Stärke 12,11 N/mm² bei 10 mm Stärke gegenüber. Die Laccase gebundenen Proben haben bei 8 mm Plattendicke eine Festigkeit von 23,4 N/mm² und erfüllen somit die EN-Norm 310. Der Wert für die 10 mm starken Platten ist geringer, er liegt bei 22 N/mm². Bei den Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten werden 26,5 N/mm² bei 8 mm und 23 N/mm² bei 10 mm Stärke erreicht.

Bei der Betrachtung der Dickenquellwerte wird deutlich, dass mit Abnahme der Querkzug- und Biegefestigkeiten bei den 10 mm starken MDF-Platten gegenüber den 8 mm starken MDF-Platten die Dickenquellwerte zunehmen. Dies zeigt sich, indem die Dickenquellung bei den 8 mm dicken Kontrollproben 113 % und bei den 10 mm dicken 197 % betragen. Bei den Laccase gebundenen MDF-Platten quellen die 8 mm starken Proben 77 %, die 10 mm starken Proben 146 %. Bei den Laccase-Mediator gebundenen Platten liegen die Quellwerte bei 64 % (8 mm) und 84 % (10 mm). In diesem Fall stellen 64 % Dickenquellung den niedrigsten Wert dar, doch ist dieser fast viermal zu hoch, um die EN-Norm 317 zu erfüllen, bei der für 8 mm starke MDF-Platten eine maximale Dickenquellung von 17 % maßgeblich sind (siehe Kapitel 5.12.1, Tabelle 11).

Um auf die oben genannte Feststellung zurückzukommen, dass mit Abnahme der Querkzug- und Biegefestigkeiten von 8 mm starken MDF-Platten zu 10 mm starken MDF-Platten die Dickenquellung zunimmt, so kann dies dadurch erklärt werden, dass trotz des identischen Vorganges bei Versuchsvorbereitung und Herstellung der MDF-Platten mit einer gleichen Rohdichte von 800 kg/m^3 beim Pressvorgang der 8 mm starken Platten durch Ligninbruchstücke eine bessere Verklebung der Holzfasern zueinander stattgefunden haben muss als bei den 10 mm starken MDF-Platten.

Dies könnte daran liegen, dass eine Presstemperatur von $200 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Pressdauer von $37,5 \text{ s/mm}$ für 8 mm Plattendicke geeigneter zu sein scheint als für 10 mm Plattendicke. Dies führte zu der Entscheidung, die Presstemperatur pro Millimeter Plattendicke für die 10 mm starken MDF-Platten auf $210 \text{ }^\circ\text{C}$ zu erhöhen, wobei die Pressdauer gleich blieb.

Wie in Tabelle 14 dargestellt, konnte dies jedoch zu keiner spürbaren Verbesserung der mechanisch-technologischen Eigenschaften beitragen.

Tab. 14: Vergleich der mechanisch-technologischen Eigenschaften 10 mm starker MDF Platten bei unterschiedlicher Presstemperatur

Probenbezeichnung	Kontrolle		100 U/ml Laccase gebunden		100 U/ml Laccase und 10 mM Mediator gebunden	
	200	210	200	210	200	210
Presstemperatur [°C]	200	210	200	210	200	210
Querzugfestigkeiten [N/mm ²]	0,03	0,04	0,14	0,15	0,23	0,25
Biegefestigkeiten [N/mm ²]	12,11	12,43	22,00	22,80	23,00	23,50
Dickenquellung [%]	197,00	195,00	146,00	145,80	84,00	83,80

Weder bei den Kontrollen, noch den Laccase und Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten mit 10 mm Plattendicke können durch eine höhere Presstemperatur von 210 °C die Querzugfestigkeiten, Biegefestigkeiten erhöht und Dickenquellwerte gesenkt werden. Die Werte sind nahezu identisch und unterscheiden sich teilweise lediglich durch Abweichungen im Nachkommastellenbereich. Zudem kann, wie schon in Kapitel 5.12.3.1 geschildert, durch optische Begutachtung der MDF-Platten nach dem Verpressen bei 210 °C eine starke Verdunkelung beobachtet werden, welche auf eine thermische Zerstörung der Holzfasern hindeutet.

Eine Senkung der Presstemperatur auf 190 °C wurde nach den Ergebnissen der mechanisch-technologischen Eigenschaften 10 mm starker MDF-Platten bei Presstemperaturen von 200 °C und 210 °C ausgeschlossen, da hier genauso wie bei den 8 mm starken MDF-Platten bei 190 °C deutlich schlechtere Querzug- und Biegefestigkeiten, sowie höhere Dickenquellwerte erwartet werden konnten (vgl. Kapitel 5.12.3.1, Tabelle 12). Eine Temperatur von 190 °C erscheint somit zu niedrig, eine ausreichende Verklebung der Ligninbruchstücke auf der Faseroberfläche zu gewährleisten (FELBY et al., 2002) (vgl. Kapitel 5.12.3.1).

In weiteren Versuchen, die mechanisch technologischen Eigenschaften der 10 mm starken MDF-Platten zu verbessern, wurde die Presszeit von 5 Minuten (30 s/mm) auf 4 Minuten (24 s/mm) herabgesetzt, um einer zu starken Bräunung der Plattenoberfläche vorzubeugen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 erfasst.

Tab. 15: Vergleich mechanisch-technologischer Eigenschaften 10 mm starker MDF-Platten bei einer Presstemperatur von 210 °C zu unterschiedlichen Presszeiten

Probenbezeichnung	Kontrolle		100 U/ml Laccase gebunden		100 U/ml Laccase und 10 mM Mediator gebunden	
	30	24	30	24	30	24
Pressdauer [s/mm]	30	24	30	24	30	24
Querzugfestigkeiten [N/mm ²]	0,04	0,03	0,15	0,13	0,25	0,19
Biegefestigkeiten [N/mm ²]	12,43	11,22	22,80	21,30	23,50	22,00
Dickenquellung [%]	195,00	201,00	145,80	156,90	83,80	89,80

Wie auch bei der Erhöhung der Presstemperatur von 200 °C auf 210 °C wirkt sich eine Verkürzung der Presszeit pro Millimeter Plattendicke nicht auf die Festigkeitseigenschaften und die Dickenquellung der 10 mm starken MDF-Platten aus. Unabhängig von der Zusammensetzung, also als Kontrolle, Laccase und Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten, sind keine wesentlichen Änderungen der Werte erkennbar, wobei die Querzug- und Biegefestigkeiten bei einer kürzeren Presszeit tendenziell leicht abnehmen und die Quellwerte zunehmen.

5.12.3.4 Ermittlung einer optimalen Rohdichte

Wie auch bei anderen Holzwerkstoffen sind Mitteldichte Faserplatten über bestimmte Merkmale wie die Rohdichte definiert. Wie bereits in Kapitel 3.6 genannt, sind MDF-Platten durch einen Rohdichtebereich von 550 kg/m³ bis 800 kg/m³ gekennzeichnet (ERNST, 1996). Die in Tabelle 16 aufgeführten Rohdichten von 600 kg/m³ bis 800 kg/m³ liegen in diesem Spektrum. Für alle drei Rohdichten sind die jeweilige Querzugfestigkeit, die Biegefestigkeit und der Dickenquellwert angegeben. Bei den Platten handelt es sich um 8 mm starke Laccase-Mediator gebundene Faserplatten. Zur Herstellung diente ein Puffergemisch mit Laccase mit einer Aktivität von 200 U/ml und 10 mM Mediator HBA, das mit einem Besprühungsgrad von 100 % auf die Fasern gesprüht wurde. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Anschließend wurden die Platten bei 200 °C für 5 Minuten (37,5 s/mm) verpresst.

Tab. 16: Mechanisch-technologische Eigenschaften 8 mm starker MDF-Platten mit unterschiedlicher Rohdichte

Rohdichte [kg/m^3]	600	700	800
Querzugfestigkeit [N/mm^2]	0,19	0,34	0,67
Biegefestigkeit [N/mm^2]	15,22	20,73	33,53
Dickenquellung [%]	73,00	53,30	19,10

Beim Vergleich der mechanisch-technologischen Eigenschaften der Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten fällt auf, dass die Querzugfestigkeit mit steigender Rohdichte zunimmt. So beträgt die Querzugfestigkeit bei einer Rohdichte von 600 kg/m^3 $0,19 \text{ N/mm}^2$, bei 700 kg/m^3 $0,34 \text{ N/mm}^2$ und bei 800 kg/m^3 $0,67 \text{ N/mm}^2$, welches den höchsten Wert darstellt. Vergleicht man diesen Wert mit der in der Norm 319 (siehe Kapitel 5.12.1, Tabelle 11) für 8 mm starke MDF-Platten vorgegebene Mindestanforderung von $0,65 \text{ N/mm}^2$, so wird deutlich, dass diese durch Laccase-Mediator gebundene MDF-Platten mit einer Rohdichte von 800 kg/m^3 erfüllt werden können.

Auch bei der Biegefestigkeit ist eine Verbesserung mit zunehmender Rohdichte zu erkennen. Während bei einer Rohdichte von 600 kg/m^3 eine Biegefestigkeit von $15,22 \text{ N/mm}^2$ erreicht wird, sind es bei 700 kg/m^3 $20,73 \text{ N/mm}^2$. Beide Biegefestigkeitswerte sind nicht hoch genug, um die EN-Norm 310 zu erfüllen, in der für diese Plattenstärke mindestens 23 N/mm^2 erforderlich sind. Beim Erhöhen der Rohdichte auf 800 kg/m^3 ist mit einer Festigkeit von $33,53 \text{ N/mm}^2$ ein deutlicher Unterschied erkennbar. Der Wert für die Biegefestigkeit steigt nicht nur um 120 % bzw. etwa 60 % gegenüber den beiden niedrigeren Rohdichten, sondern erfüllt auch den Mindestwert für das Erreichen der EN-Norm.

Bei der Betrachtung der Dickenquellwerte nach 24 h Wasserlagerung ist mit steigender Rohdichte eine Abnahme der Quellwerte zu erkennen. Bei der Rohdichte von 600 kg/m^3 quellen die MDF-Platten 73 %, bei einer Rohdichte von 700 kg/m^3 53,3 % und bei 800 kg/m^3 19,1 %, welches den niedrigsten Dickenquellwert in diesem Vergleich darstellt. In der Norm 317 ist eine Dickenquellung von maximal 17 % gefordert. Mit 19,1 % liegt dieser geringfügig über dem Normwert.

Unter Berücksichtigung aller Eigenschaftswerte lässt sich festhalten, dass unter identischen Versuchsbedingungen mit steigender Rohdichte eine Zunahme der Festigkeiten und eine Senkung der Dickenquellwerte stattfindet. Diese Korrelation wird besonders bei den MDF-Platten mit einer Rohdichte von 800 kg/m^3 deutlich, da die Querzug- und Biegefestigkeit wesentlich höher ist als bei den anderen beiden, niedrigeren Rohdichten und darüber hinaus

der Dickenquellwert stark abgenommen hat. Dabei ist es nicht von Belang, ob bei dem Herstellungsprozess der MDF-Platten nur die reine Pufferlösung (Kontrolle) oder eine Laccase-Pufferlösung ohne Mediator verwendet wurde. Entsprechende Tabellen befinden sich im Anhang 1 und 2.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im weiteren Verlauf dieser Dissertation alle MDF-Platten nur noch mit Rohdichten von 800 kg/m^3 hergestellt.

5.12.3.5 Fazit zur Auswahl optimaler Herstellungsparameter für die MDF-Platten Produktion

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen führen zu dem Entschluss, sich für die weitere Produktion von Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten im Pilotmaßstab auf eine Plattendicke von 8 mm zu konzentrieren, da mit dieser bei der Auswahl der Herstellungsparameter Presstemperatur und Presszeit die Ergebnisse der mechanisch-technologischen Eigenschaftsprüfung in dem Maße ausfallen, dass problemlos eine oder mehrere EN-Normen gleichzeitig erfüllt werden können. Als geeignete Presstemperatur werden $200 \text{ }^\circ\text{C}$ und eine Presszeit von $37,5 \text{ s/mm}$ Plattendicke angesehen. Eine Erhöhung der Plattenstärke auf 10 mm bringt von jetzigem Standpunkt aus keine Verbesserung der mechanisch-technologischen Eigenschaften, sondern (eher) eine Verschlechterung. Eine Optimierung der Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten mit Nenndicken unterhalb 8 mm sollte außer Betracht gelassen werden, da die herkömmlich im industriellen Maßstab produzierten MDF-Platten Plattendicken bis zu 45 mm aufweisen (vgl. Kapitel 3.6). Eine Orientierung zu stärkeren enzymgebundenen MDF-Platten hin erscheint somit sinnvoller.

5.12.3.6 Überprüfung der Kontrollproben zum Ausschluss der Einwirkung des Mediators HBA auf die mechanisch-technologischen Eigenschaften ohne das Vorhandensein vom Enzym Laccase

Um zu überprüfen, ob sich ein Vorhandensein von Mediator im McIlvaine Puffer ohne den Einsatz von Laccase auf die mechanisch-technologischen Eigenschaften der MDF-Platten auswirken kann, wurden im gleichen Herstellungsverfahren sämtliche Kontrollplatten ohne und mit Mediator HBA Platten produziert, die anschließend nach den Vorschriften der EN-Normen getestet wurden.

Weder bei Variation der vorherigen „Inkubationszeit“ (hier ohne Laccase), der Presszeiten, Presstemperaturen, Plattenstärken, Rohdichten, noch der Besprühungsart können bei der Überprüfung der mechanisch-technologischen Eigenschaften Unterschiede zwischen den Kontrollproben in McIlvaine Puffer und den Kontrollproben mit 10 mM Mediator HBA im McIlvaine Puffer festgestellt werden. Dies macht eine tabellarische Übersicht (Tabelle 17) deutlich, in welcher die Eigenschaften für die ermittelten Werte der Kontrollproben ohne und mit Mediator HBA dargestellt sind. Die Herstellungsparameter für die verglichenen Proben sind durch eine Besprühungsart von 100 % und eine Pressdauer von 5 Minuten bei 200 °C gekennzeichnet. Die Rohdichte der MDF-Platten beträgt 800 kg/m³, die Plattenstärke 8 mm. Die Querkzugfestigkeit beider Kontrollen liegt bei 0,08 N/mm². Die Abweichungen der Biegefestigkeitswerte und der Dickenquellwerte von 0,05 N/mm² und 0,2 % sind sehr gering und somit vernachlässigbar.

Tab. 17: Mechanisch-technologische Eigenschaften der Kontrollproben mit und ohne HBA

Probenvariante	Kontrolle	Kontrolle + HBA (10 mM)
Querkzugfestigkeit [N/mm²]	0,08	0,08
Biegefestigkeit [N/mm²]	16,60	16,55
Dickenquellung [%]	113,00	112,80

Der Grund für die gleichen mechanisch-technologischen Eigenschaften bei den Kontrollplatten, liegt darin, dass der Mediator HBA alleine keine Aktivierung des Holzfaserflächenlignins bewirken kann. Nur in Verbindung mit der Laccase werden Ligninbestandteile oxidiert. Es bilden sich Ligninradikale, die untereinander wieder reagieren können (vgl. Kapitel 3.3.2). So kann der Mediator HBA nur im System mit der Laccase verwendet werden. Der Zusammenhalt der Holzfasern in der MDF-Platte liegt wiederum in der Autoadhäsion begründet, da die Holzfasern aufgrund ihrer eigenen Adhäsionskräfte „verkleben“. Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben liegt der Grund in der erneuten Überschreitung der Glasübergangstemperatur des Lignins (123 °C) beim Heißverpressen der Holzfasern.

5.12.4 Ergebnisse der Laccase und Laccase – Mediator gebundenen MDF-Platten unter optimierten Herstellungsparametern

Die in den Ergebnisdarstellungen für die Probenserien verwendeten Probenbezeichnungen und deren Bedeutung sind in folgender Tabelle (18) aufgelistet. Zur Vereinfachung werden im weiteren Verlauf der Ausführungen nur noch die Probenbezeichnungen genannt.

Tab. 18: Probenbezeichnung und Probenzusammensetzung der hergestellten MDF-Platten

Probenbezeichnung	Proben (Varianten)
K	Kontrolle, Holzfasern mit Puffer besprüht
L 100	Holzfasern mit 100 U/ml Laccase im Puffer besprüht
L 100 + HBA 10	Holzfasern mit Laccase-Mediator Puffergemisch besprüht: 100 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA
L 100 + HBA 20	Holzfasern mit Laccase-Mediator Puffergemisch besprüht: 100 U/ml Laccase und 20 mM Mediator HBA
L 200	Holzfasern mit 200 U/ml Laccase im Puffer besprüht
L 200 + HBA 10	Holzfasern mit Laccase-Mediator Puffergemisch besprüht: 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA
L 200 + HBA 20	Holzfasern mit Laccase-Mediator Puffergemisch besprüht: 200 U/ml Laccase und 20 mM Mediator HBA

5.12.4.1 Mechanisch-technologische Eigenschaften Laccase oder Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten nach 2 h Inkubationszeit (50 % : 50 % Besprühung)

In Abbildung 65 sind die Querzugfestigkeiten und Dickenquellungen nach 24 h Wasserlagerung verschieden behandelter 8 mm MDF-Platten mit einer Rohdichte von 800 kg/m^3 dargestellt.

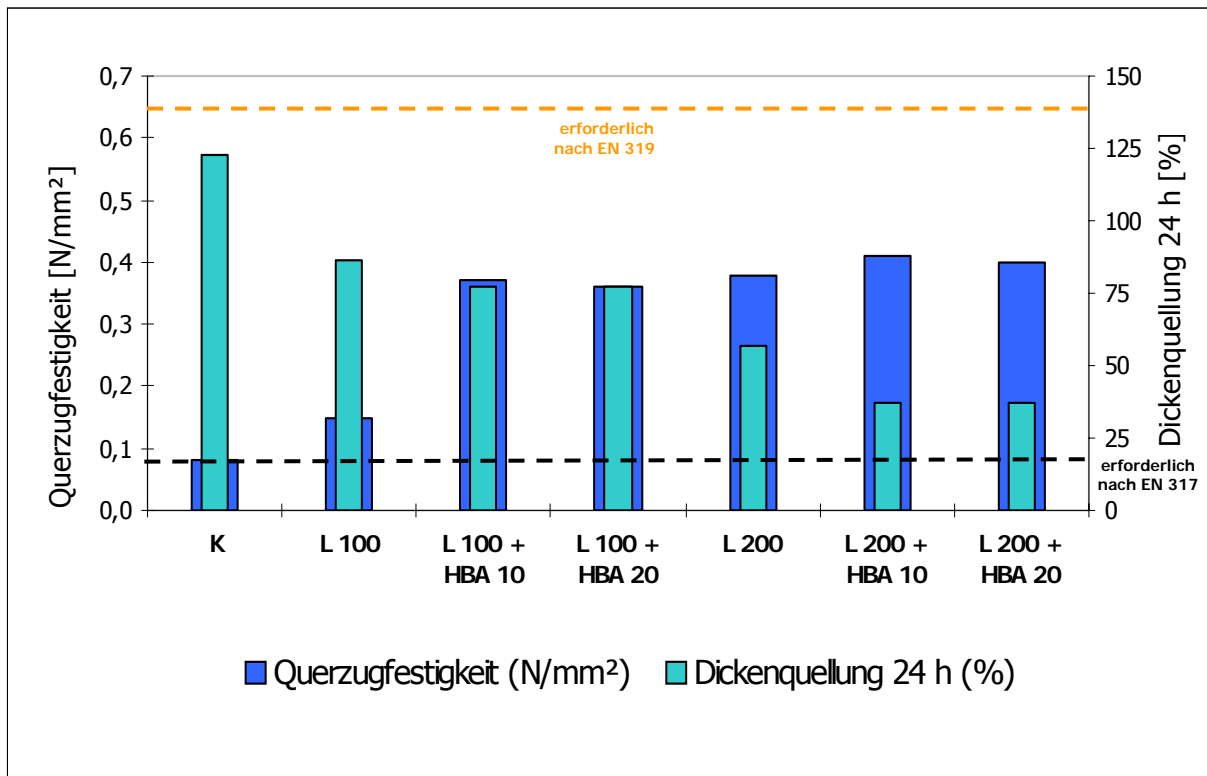


Abb. 65: Querzugfestigkeiten und Dickenquellungen nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 50 % : 50 % und 5 Min. Presszeit bei $200 \text{ }^\circ\text{C}$, Rohdichte 800 kg/m^3 (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)

Die Herstellung dieser MDF-Platten ist durch die zweifache Besprühung mit jeweils 50 % der Gesamtmenge, 2 h Inkubationszeit, 5 Minuten Presszeit und $200 \text{ }^\circ\text{C}$ Presstemperatur gekennzeichnet. Der nach der Europäischen Norm (EN 319) erforderliche Mindestwert von $0,65 \text{ N/mm}^2$ für die Querzugfestigkeit von 8 mm starken MDF-Platten bzw. der Maximalwert von 17% (EN 317) für die Dickenquellung nach 24 h Wasserlagerung kann von keiner der oben aufgeführten Platten erfüllt werden (vgl. Kapitel 5.12.1, Tabelle 11).

Dennoch sind deutliche Unterschiede der Querzugfestigkeiten zwischen den Kontrollplatten K und den Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen Platten erkennbar.

Während die Platten K eine Querzugfestigkeit von $0,08 \text{ N/mm}^2$ aufweisen, werden mit den Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten Querzugfestigkeiten von

0,15 N/mm² bis 0,41 N/mm² erreicht. Dazu ist anzumerken, dass sowohl bei den Platten mit 100 U/ml Laccase (L 100, L 100 + HBA 10 und L 100 + HBA 20) als auch bei den Platten mit 200 U/ml Laccase (L 200, L 200 + HBA 10 und L 200 + HBA 20) die Proben mit 10 mM Mediator jeweils die höchsten Querszugfestigkeiten besitzen: L 100 + HBA 10 mit 0,37 N/mm² und L 200 + HBA 10 mit 0,41 N/mm². Eine Erhöhung des Mediatoranteils auf 20 mM bringt keine Verbesserung der Querszugfestigkeit. Im Gegenteil: die Werte sinken um jeweils 0,01 N/mm² zu den Werten der Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten mit 10 mM Mediator. Die Zunahme der Querszugfestigkeiten der mit 200 U/ml Laccase gebundenen MDF-Platten gegenüber den mit 100 U/ml Laccase gebundenen liegt je nach Variante zwischen 10 % und 15,3 %.

Bei der Betrachtung der Dickenquellwerte nach 24 h Wasserlagerung wird deutlich, dass die Werte durch die Verwendung von Laccase bzw. Laccase und Mediator im Vergleich zu den Kontrollplatten K stark abnehmen. Zwar liegen die Quellwerte aller getesteten Plattenvarianten wie bereits erwähnt oberhalb des in der EN 317 erforderlichen Höchstwertes für die Dickenquellung von MDF-Platten von 17 % (siehe Kapitel 5.12.1, Tabelle 11), doch reduzieren sich die Werte durch den Einsatz von Laccase und Mediator von den Platten K mit 123 % auf 37 % bei den Platten L 200 + HBA 10 und L 200 + HBA 20 deutlich. Die Dickenquellwerte aller Varianten mit 100 U/ml Laccase liegen ohne Mediator bei 86 %, mit Mediator bei 77 %. Eine Verdoppelung der Laccasekonzentration auf 200 U/ml bewirkt demnach eine Reduzierung der Quellung um 40 % bei den Laccase-Mediator gebundenen Plattenvarianten L 200 + HBA 10 und L 200 + HBA 20. Beim Vergleich der Plattenvarianten mit 200 U/ml Laccase wird ein Effekt durch Verwendung des Mediators bemerkbar. Es handelt sich um die Absenkung des Quellwertes von 57 % bei L 200 auf 37 % bei beiden Laccase-Mediator (10 mM und 20 mM) gebundenen MDF-Platten.

Bei der Interpretierung aller in Abbildung 65 dargestellten Ergebnisse lässt sich folgende Korrelation feststellen: Mit zunehmenden Querszugfestigkeiten sinken die Werte für die Dickenquellung. Im weiteren Sinn bewirkt der Einsatz von Mediatoren und die Verdoppelung der Laccasekonzentrationen eine Verbesserung der Querszugfestigkeiten und eine Reduzierung der Dickenquellwerte.

Neben der Bestimmung der Querzugfestigkeiten und der Dickenquellwerte nach 24 h Wasserlagerung werden im Rahmen der mechanisch-technologischen Eigenschaftsprüfung auch die Biegefestigkeiten getestet. In folgender Abbildung (66) sind diese für die gleichen Probenvarianten (vgl. Abbildung 65) aufgeführt.

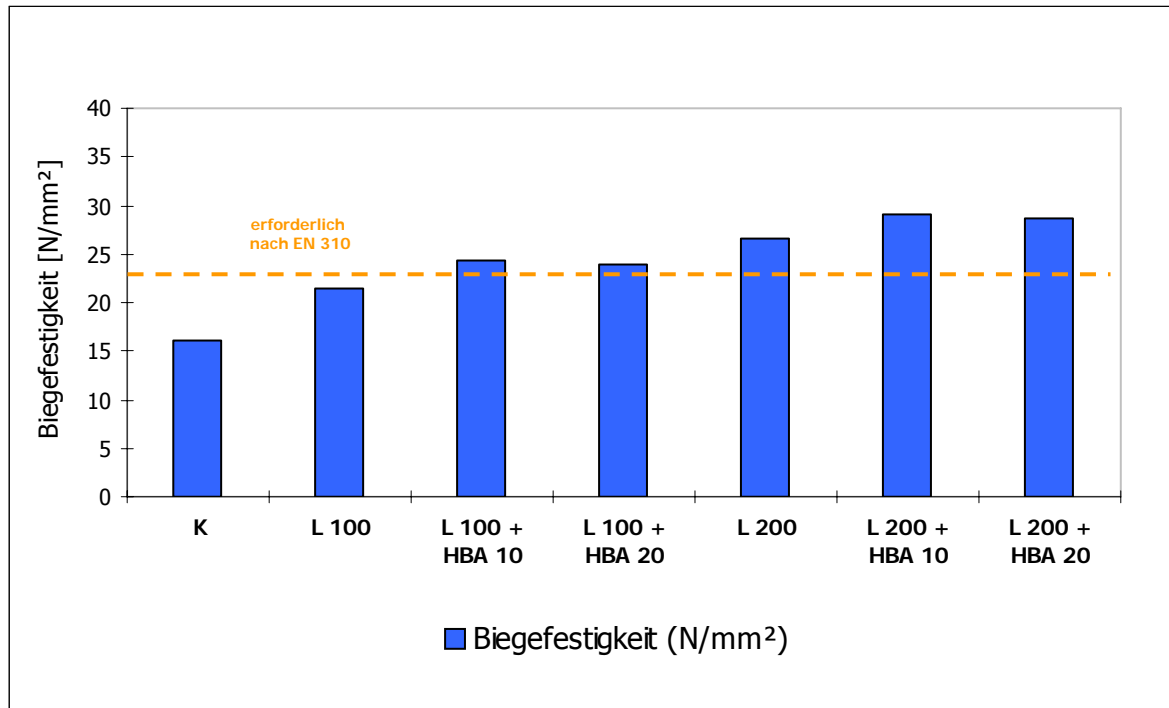


Abb. 66: Biegefestigkeiten von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 50:50 % und 5 Min. Presszeit bei 200 °C (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)

Mit allen Laccase und Laccase-Mediator gebundenen Platten wird der nach der EN-Norm 310 erforderliche Mindestwert für die Biegefestigkeit von 23 N/mm² erreicht (vgl. Kapitel 5.12.1, Tabelle 11). Die Kontrollplatten K liegen mit 16,0 N/mm² unterhalb dieses Normwertes. Mit dem Hinzunehmen des Mediators HBA ist sowohl bei den Platten mit 100 U/ml Laccase als auch mit 200 U/ml Laccase eine Steigerung der Biegefestigkeiten erkennbar. Die Unterschiede zwischen den mit 100 U/ml und 200 U/ml Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten liegen darin, dass die Biegefestigkeitsprüfung bei den mit 200 U/ml Laccase gebundenen Platten 19 % bis 25 % höhere Biegefestigkeitseigenschaften haben. So wird der Höchstwert von 29,1 N/mm² mit der Plattenvariante L 200 + HBA 10 erreicht, die Variante L 100 + HBA 10 hat eine Biegefestigkeit von 24,4 N/mm². Bei der Erhöhung des Mediatoranteils auf 20 mM liegen die Biegefestigkeitswerte sowohl für die mit 100 U/ml, als auch die mit 200 U/ml Laccase gebundenen MDF-Platten unter den Werten bei der Verwendung von 10 mM Mediator: 23,9 N/mm² bei L 100 + HBA 20 und 28,7 N/mm² bei L 200 + HBA 20.

Der mit 20 mM Mediator HBA ausbleibende Effekt bei der Inkubation von Ligninen oder Holzfasern, konnte auch durch Methoden, wie die FTIR-Spektroskopie (Kapitel 5.10), die photometrische Messung freigesetzter Hydroxyl-Gruppen (Kapitel 5.7) und die Gel-Permeations-Chromatographie (Kapitel 5.4) nachgewiesen werden. Dort wurden ebenfalls keine Verbesserungen in der Aktivierung des Lignins (alleine oder auf der Holzfaseroberfläche) mehr erzielt, sondern vielmehr eine Gleichheit der Untersuchungsergebnisse mit denen der mit 10 mM HBA behandelten Proben festgestellt.

5.12.4.2 Vergleich von mechanisch-technologischen Eigenschaften bei unterschiedlichen Besprühungsarten

Neben der zweistufigen Besprühung im Verhältnis 50 % : 50 %, d. h. das Auftragen von jeweils der Hälfte des Volumens an Pufferlösung (reine Pufferlösung, Laccase- bzw. Laccase-Mediator Pufferlösung) in zwei Besprühungsvorgängen an der MDF-Pilotanlage soll auch das Aufsprühen der gesamten Pufferlösung auf die Holzfasern in einem Schritt erfolgen, um die möglichst optimale Benetzung der Faser zu erreichen (100 %ige Besprühung). Beim Vergleich der ursprünglich 10 % bis 13 % feuchten Holzfasern nach den beiden Besprühungsarten fällt auf, dass die Inkubationsfeuchten mit 47 % bis 58 % nach dem Besprühen der Fasern mit Pufferlösung bei der 100 %igen Besprühung höher liegen als bei der 50 % : 50 %igen Besprühung mit 34 bis 42 % (Tabelle 19).

Tab. 19: Faserfeuchten bei unterschiedlichen Besprühungsarten

Besprühungsart [%]	50 : 50	100
Faserfeuchte vor der Besprühung [%]	10 - 13	10 - 13
Inkubationsfeuchte [%]	34 - 42	47 - 58

Ob die Art der Besprühung und die daraus resultierenden höheren Faserfeuchten nach dem Auftragen der Inkubationslösung (Inkubationsfeuchten) Auswirkungen auf die mechanisch-technologischen Eigenschaften der Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten und deren Referenzen (Kontrollen) haben, soll in Tabelle 20 deutlich gemacht werden.

In Tabelle 20 sind die mechanisch-technologischen Eigenschaften für die Plattenvarianten „Kontrolle“, „Laccase“ und „Laccase-Mediator“ gebunden nach den zwei unterschiedlichen

Besprühungsarten 50 % : 50 % und 100 % aufgeführt. Es handelt sich um 8 mm starke MDF-Platten, die für 5 Minuten (37,5 s/mm) bei 200 °C gepresst wurden. Die Laccasekonzentration bei beiden Laccase gebundenen Varianten beträgt 100 U/ml, bei der Variante mit Mediator sind 10 mM Mediator HBA enthalten. Die vorherige Inkubationszeit der Fasern betrug 2 Stunden.

Tab. 20: Vergleich mechanisch-technologischer Eigenschaften 8 mm starker MDF-Platten bei unterschiedlichen Besprühungsarten

Probenbezeichnung	Kontrolle		100 U/ml Laccase gebunden		100 U/ml Laccase und 10 mM Mediator gebunden	
	50 : 50	100	50 : 50	100	50 : 50	100
Besprühungsart [%]	50 : 50	100	50 : 50	100	50 : 50	100
Querzugfestigkeiten [N/mm ²]	0,08	0,08	0,15	0,29	0,37	0,39
Biegefestigkeiten [N/mm ²]	16,00	16,60	21,40	23,40	24,40	26,50
Dickenquellung [%]	123,00	113,00	86,00	77,00	77,00	64,00

Bei dem Vergleich der Querzugfestigkeiten bei unterschiedlicher Besprühungsart fällt auf, dass bei allen Probenvarianten durch das Verfahren des 100 %igen Auftragens der Sprühlösungen höhere Querzugfestigkeiten erreicht werden, als bei der zweistufigen Besprühung (50 % : 50 %). Dies wird besonders bei den Laccase gebundenen MDF-Platten deutlich, wo sich die Querzugfestigkeit von 0,15 N/mm² bei der Besprühung 50 % : 50 % auf 0,29 N/mm² bei der Besprühungsart 100 % steigern lässt. Auch bei der Laccase-Mediator gebundenen Platte werden 0,37 N/mm² und 0,39 N/mm² ermittelt. Letztere ist die höchste Querzugfestigkeit in diesem Vergleich. Bei den Kontrollplatten sind keine Unterschiede feststellbar. Auch profitieren die Biegefestigkeitseigenschaften von einer Besprühung in einem Durchgang (100 %). Bei der Laccase gebundenen Platte liegt diese beim zweistufigen Verfahren bei 21,4 N/mm², beim einstufigen Verfahren bei 23,4 N/mm². Bei den Laccase-Mediator gebundenen Platten betragen die Biegefestigkeiten 24,4 N/mm² und 26,5 N/mm², ebenfalls ein Vorteil für die 100 %ige Besprühung. Somit kann mit den Biegefestigkeiten der Laccase gebundenen MDF-Platte bei 100 %iger Besprühung und bei der Laccase-Mediator gebundenen Variante sowohl bei 50 % : 50 %iger als auch bei 100 %iger Besprühung die EN-Norm 310 erfüllt werden (siehe Tabelle 20). Auch bei den Kontrollplatten kann die Biegefestigkeit bei der einstufigen Besprühung geringfügig gesteigert werden.

Bei den Dickenquellwerten ist bei allen Varianten eine Absenkung zwischen 10 % und 13 % zu erkennen, wenn anstelle der zweistufigen Besprühung die einstufige Besprühung Anwendung findet.

Unter Berücksichtigung der hier aufgelisteten Ergebnisse kann festgehalten werden, dass durch eine Besprühungsart von 100 %, bei der die gesamte Menge an Pufferlösung bzw. Inkubationslösung auf die Fasern in einem Durchgang aufgesprüht wird, die Quersugs- und Biegefestigkeit gesteigert und die Dickenquellung reduziert werden kann. Entscheidend für diese Erkenntnis ist, dass insbesondere bei den Laccase gebundenen MDF-Platten durch das Aufsprühen der Inkubationslösung zu 100 % eine höhere Inkubationsfeuchte der Fasern resultiert. Durch die höhere Menge an aufgesprühter Lösung auf die Fasern pro Minute (z. B. 1000 ml/min Inkubationslösung auf 1000 g/min Faserzufuhr) können die einzelnen Fasern im Mischer besser benetzt werden, wodurch die Inkubationsfeuchte mit 47 % bis 58 % deutlich höher liegt als bei der Besprühung in zwei Schritten (50 % : 50 %ige Besprühung) mit einer Inkubationsfeuchte von 34 % bis 42 % (siehe Tabelle 19). Eine Verbesserung der mechanisch-technologischen Eigenschaften durch eine höhere Inkubationsfeuchte konnte auch durch KHARAZIPOUR (1996, 2002) nachgewiesen werden. Demnach haben Laccase gebundene MDF-Platten mit einer vorangehenden höheren Inkubationsfeuchte höhere Quersugsfestigkeitseigenschaften und geringere Dickenquellwerte. Ein Grund dafür liegt nahe: Durch die höhere Inkubationsfeuchte wird dem Enzym Laccase ermöglicht, eine höhere Reaktivität auf der Faseroberfläche zu erreichen, da das Aktivierungspotential besser ausgenutzt werden kann. Die Holzfasern befinden sich durch die 100 %ige Besprühung in einem wässrigerem Medium als es bei der zweistufigen Besprühung (50 % : 50 %) der Fall war.

Für das weitere Verfahren bei der Herstellung Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundener MDF-Platten kann unter Beibehaltung der bisherigen optimierten Parameter die einstufige, also 100 %ige Besprühung, als die besser geeignete Besprühungsart für den zukünftigen Herstellungsprozess der MDF-Platten angesehen werden. Auch unter ökonomischen Gesichtspunkt ist eine einstufige Besprühung sinnvoll, da eine Besprühungsart von 50 % : 50 % die doppelte Zeit beansprucht und den Herstellungsprozess hinauszögert. Ungeachtet der Besprühungsart sollte das Faservlies nach dem Trocknen der Fasern eine Feuchte zwischen 10 % und 14 % besitzen (FELBY et al, 2002). Bei enzymatisch behandelten Holzfasern ist dieser Feuchtebereich für die Verklebung bzw. Autoadhäsion der Fasern geeigneter, als die Feuchten zwischen 5 % und 10 % bei der herkömmlichen, industriellen MDF-Produktion.

5.12.4.3 Mechanisch-technologische Eigenschaften Laccase oder Laccase-Mediator gebundener MDF-Platten nach 2 h Inkubationszeit (100 % Besprühung)

Resultierend aus den vorherigen Ausführungen zur Besprühungsart wurden die gleichen Probenvarianten mit einer 100 %igen Besprühung hergestellt. Dabei sind alle Versuchsparameter beibehalten worden, außer der einstufigen Besprühung, in der die komplette Menge an Puffer- bzw. Inkubationslösung in einem Besprühungsdurchgang aufgetragen wurde.

Die Ergebnisse der mechanisch-technologischen Eigenschaftsprüfungen sind in den folgenden Abbildungen 67 und 68 aufgeführt. Es handelt sich wiederum um Mittelwerte, die sich aus mehreren Wiederholungen ergeben (siehe Kapitel 4.2.13, Tabelle 6 und Kapitel 5.12.1).

Abbildung 67 zeigt die Querzugfestigkeiten und Dickenquellungen nach 24 h Wasserlagerung. Die unterbrochenen Linien zeigen wieder die zum Erreichen der jeweiligen EN-Norm erforderlichen Mindest- bzw. Höchstwerte an.

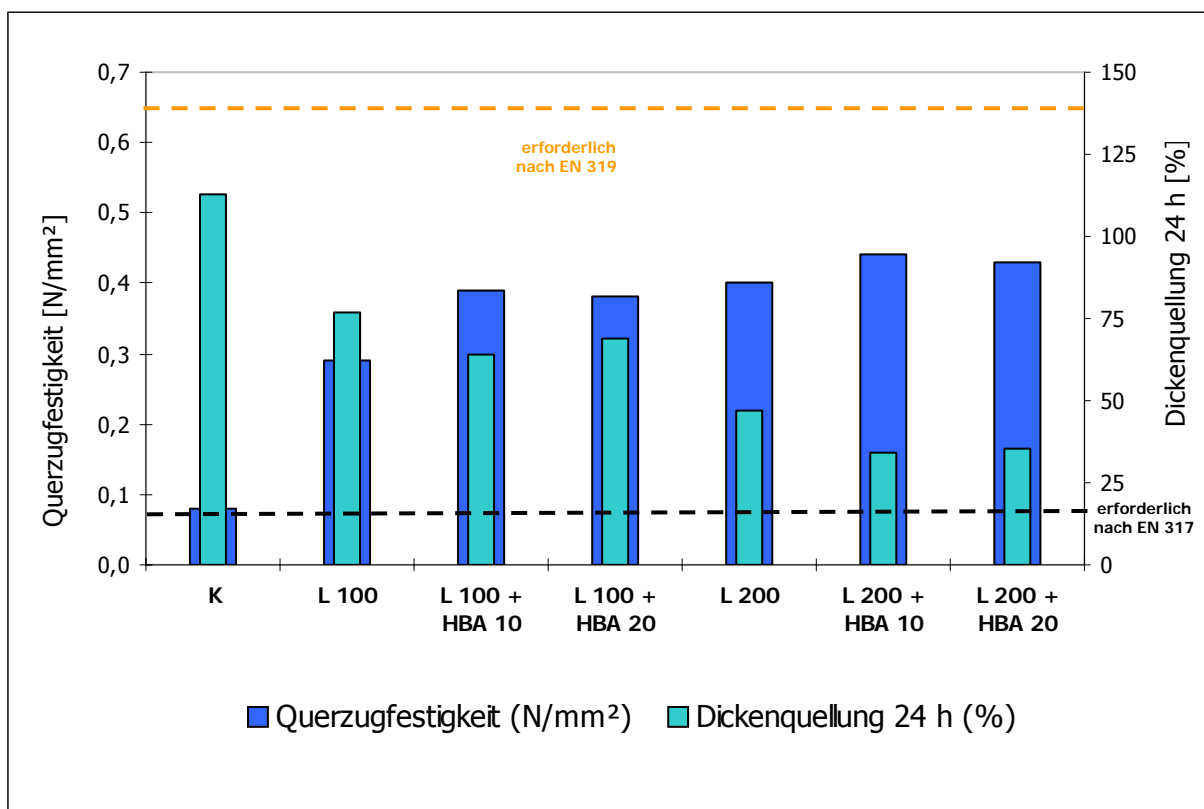


Abb. 67: Querzugfestigkeiten und Dickenquellungen nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 100 % und 5 Min. Presszeit bei 200 °C, Rohdichte 800 kg/m³ (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)

Wie auch schon bei der Betrachtung der Querzugfestigkeitswerte in Abbildung 65 (Kapitel 5.12.4.1) kann der in der EN 319 erforderliche Wert von $0,65 \text{ N/mm}^2$ (siehe Kapitel 5.12.1, Tabelle 11) mit keiner der sieben Plattenvarianten erreicht werden. Auffällig ist auch hier, dass durch die Verwendung des Mediators bei der jeweiligen Laccasekonzentration höhere Querzugfestigkeiten vorliegen, als bei den Platten, die ohne Mediator hergestellt wurden. Die Verdoppelung der Laccasekonzentration von 100 U/ml auf 200 U/ml bringt ebenfalls eine Verbesserung der Festigkeitswerte. Beim genaueren Vergleich der Querzugfestigkeiten bei der $50 \% : 50 \%$ Besprühung (siehe Kapitel 5.12.4.1, Abbildung 65) und der 100% Besprühung lassen sich jedoch Unterschiede feststellen, die zugunsten der 100% besprühten Fasern ausfallen. Die Ergebnisse zeigen, dass besonders bei der Plattenvariante L 100 eine Steigerung der Festigkeitswerte von $0,15 \text{ N/mm}^2$ auf $0,29 \text{ N/mm}^2$ bei der einstufigen Besprühung zu verzeichnen ist. Dies bedeutet eine Festigkeitszunahme von 93% . Auch bei den anderen Plattenvarianten nehmen die Querzugfestigkeiten gegenüber der Besprühungsart $50 \% : 50 \%$ zu, doch fällt hier die Zunahme mit 5% bis $7,5 \%$ geringer aus. So wird zum Beispiel mit der Plattenvariante L 200 + HBA 10 bei der $50 \% : 50 \%$ igen Besprühung eine Querzugfestigkeit von $0,41 \text{ N/mm}^2$ erreicht, bei der 100% igen Besprühung eine Querzugfestigkeit von $0,44 \text{ N/mm}^2$. Einen Unterschied bei den Kontrollplatten K gibt es nicht, bei beiden Besprühungsarten besteht eine Querzugfestigkeit von $0,08 \text{ N/mm}^2$.

Bei den Dickenquellwerten ist beim Vergleich der Plattenvarianten eine Abnahme der Quellwerte mit dem Ansteigen der Querzugfestigkeiten erkennbar. Dies gilt sowohl für die Besprühungsart $50 \% : 50 \%$ als auch für die 100% ig besprühten Faserplatten. Die Kontrollplatten K quellen um 113% . Durch die Verwendung von Laccase bzw. Laccase und Mediator haben die mit 100 U/ml gebundenen Plattenvarianten Dickenquellwerte zwischen 64% (L 100 + HBA 10) und 77% (L 100). Bei den mit 200 U/ml Laccase produzierten MDF-Platten nehmen die Dicken nach 24 h Wasserlagerung um $34,2 \%$ (L 200 + HBA 10) bis $47,2 \%$ (L 200) zu.

Um die Unterschiede der Dickenquellwerte zwischen den Plattenvarianten der zweistufigen und einstufigen Besprühungsart zu erörtern, kann festgehalten werden, dass diese auch aufgrund der nur leichten Zunahme der Querzugfestigkeiten bei der einstufigen Besprühung wenig abnehmen. Alleine bei den Kontrollplatten K, sowie bei den mit 100 U/ml Laccase gebundenen MDF-Platten wurden etwa 8% bis 13% geringere Quellwerte ermittelt. Bei den Plattenvarianten L 200, L 200 + HBA 10 und L 200 + HBA 20 sind nur geringe Unterschiede feststellbar.

Gestetet werden auch die Biegefestigkeiten der Plattenvarianten, die mit der 100 %igen Besprühungsart hergestellt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 68 dargestellt.

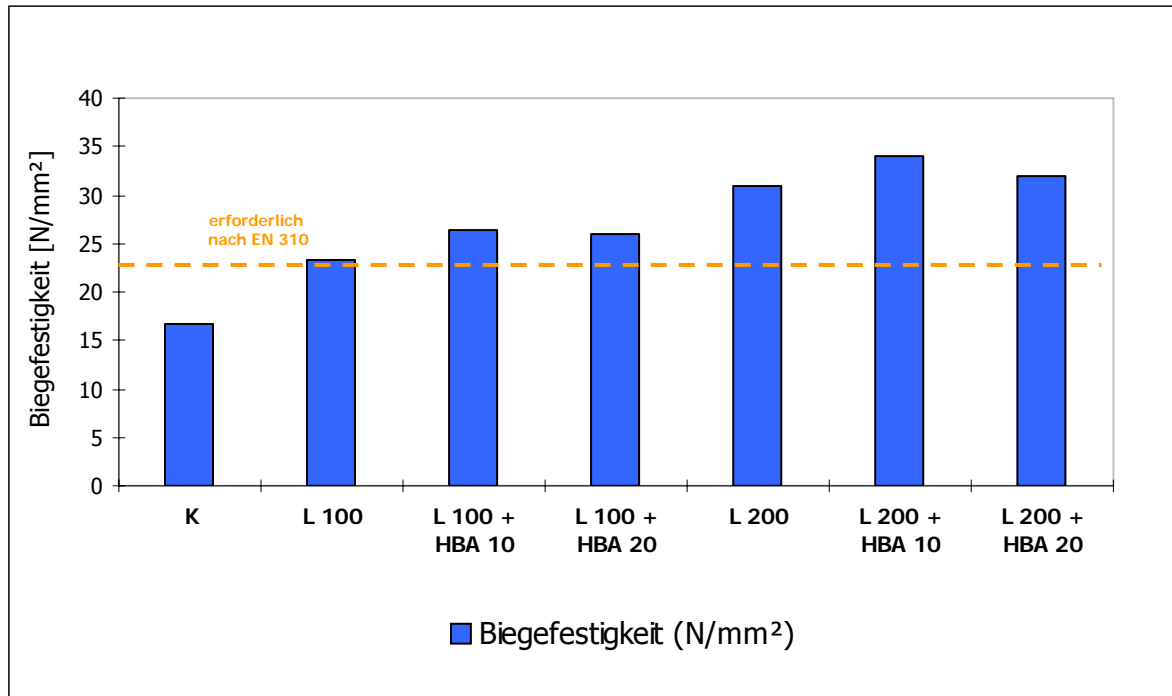


Abb. 68: Biegefestigkeiten von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühungsart von 100 % und 5 Min. Presszeit bei 200 °C (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)

Bei der Betrachtung der Biegefestigkeitswerte für die Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten fällt auf, dass diese zum Erfüllen der EN-Norm 310 hoch genug sind. Alleine die Kontrollplatten K haben eine Biegefestigkeit von 16,6 N/mm², womit die Mindestanforderung von 23 N/mm² verfehlt wird (siehe Kapitel 5.12.1, Tabelle 11). Im Gegensatz zu der 50 % : 50 %igen Besprühungsart (vgl. Kapitel 5.12.4.1, Abbildung 66) wird hier bei der Plattenvariante L 100 mit 23,4 N/mm² die EN-Norm erfüllt. Bei der vorher behandelten Besprühungsart betrug der Wert nur 21,4 N/mm². Deutlich erkennbar sind die jeweils höheren Biegefestigkeiten bei der Verwendung des Mediators. Die Plattenvarianten L 100 + HBA 10 und L 200 + HBA 10 besitzen die jeweils höchsten Festigkeiten in Abhängigkeit von der Laccasekonzentration. 34 N/mm² bei der Variante L 200 + HBA 10 markieren in diesem Vergleich den Höchstwert.

Beim Vergleich dieser Festigkeitswerte mit denen der Plattenvarianten, die im zweistufigen Besprühungsverfahren hergestellt wurden (siehe Kapitel 5.12.4.1, Abbildungen 65 und 66), können um 4 % bis 17 % höhere Biegefestigkeiten erreicht werden und erfüllen somit alle, bis auf die Kontrollplatten, die EN-Norm.

Das Ändern der Besprühungsarten von 50 % : 50 % auf 100 % hat gezeigt, dass die mechanisch-technologischen Eigenschaften aller Plattenvarianten verbessert werden konnten. Die Querkzugfestigkeiten nehmen bei allen Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten zu, wenn auch die Werte zur Erfüllung der EN-Norm 319 nicht erreicht werden. Gleichzeitig ist die Dickenquellung bei den Plattenvarianten im einstufigen Besprühungsverfahren etwas geringer. Deutlichere Unterschiede ergeben sich in den Biegefestigkeitswerten. Nicht nur, dass mit den Laccase und Laccase-Mediator gebundenen Plattenvarianten die erforderliche EN-Norm 310 erfüllt werden kann, sondern die Werte gegenüber den der 50 % : 50 %ig besprühten Platten bis zu 17 % zunehmen.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich, wie in den Ausführungen in Kapitel 5.12.4.2 beschrieben, durch das 100 %ige Besprühen eine höhere Inkubationsfeuchte entsteht, die für die Einwirkung der Laccase bzw. des Laccase-Mediator-Systems auf den Fasern zugute kommt. Die Repolymerisation der Ligninkruste auf den Faseroberflächen wird somit positiv durch die höhere Substratfeuchte unterstützt.

5.12.4.4 Mechanisch-technologische Eigenschaften Laccase oder Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten nach 30 Min. Inkubationszeit (100 %ige Besprühung)

In den analytischen Untersuchungen zu dem Laccase-Mediator-System (Kapitel 5.6 bis 5.10) konnte festgestellt werden, dass gerade durch die Verwendung des Mediators eine Steigerung der Reaktivität zwischen der Laccase und den Ligninmolekülen auf der Holzfaseroberfläche stattfindet. Grundsätzlich benötigt ein „biologisches System“ eine gewisse Zeit, um wirken zu können. Dies soll bedeuten, dass das Enzym Laccase eine bestimmte Zeit zum Inkubieren benötigt, um das gewünschte Aktivieren der Ligninkruste auf der Holzfaseroberfläche zu erreichen. Dieser Effekt kann durch das Hinzugeben eines Mediators verstärkt und vor allem beschleunigt werden. So wurde bei den analytischen Untersuchungen festgestellt, dass eine Inkubationszeit von 2 Stunden als nahezu optimal für die Einwirkung der Laccase auf die Holzfasern sein kann, jedoch unter Zugabe von Mediatoren auch schon zu früherem Zeitpunkt gute Analysewerte ergaben. So war z. B. schon nach einer Inkubationszeit unter 2 Stunden eine starke Aufrauhung oder Fragmentierung von Ligninmolekülen auf der Faseroberfläche erfolgt, welches z. B. durch die Extinktionsmessungen freigesetzter phenolischer Hydroxyl-Gruppen von Holzfasern in Kapitel 5.7 oder bei der Gel-Permeations-Chromatographie anhand einiger Ligninmodelle in Kapitel 5.4 festgestellt werden konnte.

Infolgedessen wurden die im Folgenden aufgeführten Plattenvarianten nach allen bisher optimierten Herstellungsparametern, aber nur 30 Minuten Inkubationszeit hergestellt. Es handelt sich um 8 mm starke MDF-Platten mit einer Rohdichte von 800 kg/m^3 , die bei einer Presszeit von $37,5 \text{ s/mm}$ (5 Minuten) und einer Temperatur von $200 \text{ }^\circ\text{C}$ verpresst wurden (Abbildung 69).

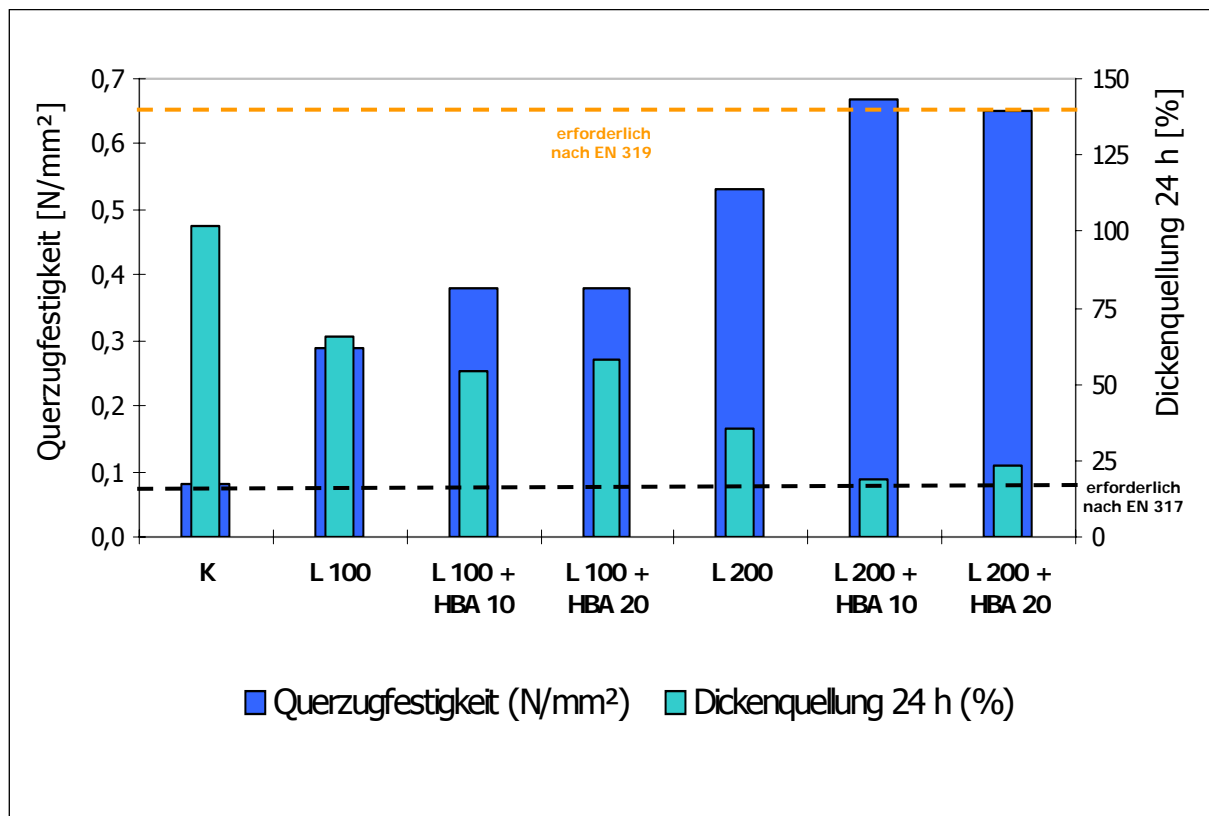


Abb. 69: Querzugfestigkeiten und Dickenquellungen nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 100 % und 5 Min. Presszeit bei $200 \text{ }^\circ\text{C}$, Rohdichte 800 kg/m^3 (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)

Bei der Betrachtung der Ergebnisse nach der Querzugfestigkeitsprüfung und der Ermittlung der Dickenquellwerte nach 24 Stunden Wasserlagerung wird deutlich, dass bei den Plattenvarianten L 200 + HBA 10 und L 200 + HBA 20 gegenüber 2 Stunden Inkubationszeit bei 30-minütiger Inkubation entscheidende Verbesserungen eintreten. Mit durchschnittlich $0,67 \text{ N/mm}^2$ und $0,65 \text{ N/mm}^2$ Querzugfestigkeit sind diese Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten in der Lage, die Mindestanforderung von $0,65 \text{ N/mm}^2$ gemäß der EN 319 zu erfüllen (vgl. Kapitel 5.12.1, Tabelle 11). Bei einer zweistündigen Inkubationszeit betragen die Querzugfestigkeiten für beide Varianten lediglich $0,44 \text{ N/mm}^2$ und $0,43 \text{ N/mm}^2$ (vgl. Kapitel 5.12.4.3, Abbildung 67). Und auch die Dickenquellwerte liegen mit 19 % und 23 % nahe an den Vorgaben der EN 317, in der für 8 mm starke MDF-Platten maximal 17 %

Dickenquellung erreicht werden dürfen (vgl. Kapitel 5.12.1, Tabelle 11). Bei 2 Stunden Inkubation werden 34,2 % (L 200 + HBA 10) und 35,5 % (L 200 + HBA 20) ermittelt (vgl. Kapitel 5.12.4.3, Abbildung 67). Auch mit der Plattenvariante L 200 sind bessere Ergebnisse erzielt worden, als bei den Platten L 200, deren Fasern vor dem Verpressen für 2 Stunden inkubiert wurden. So stehen 0,53 N/mm² Querkzugfestigkeit (30 Minuten Inkubationszeit) 0,40 N/mm² Querkzugfestigkeit (2 Stunden Inkubationszeit) gegenüber. Die Dickenquellwerte dieser Variante betragen 35,6 % (30 Minuten) und 47,2 % (2 Stunden). Bei den Plattenvarianten Laccase und Laccase-Mediator, die mit einer Konzentration von 100 U/ml Laccase gebunden sind, können dagegen lediglich im Schnitt nur um 11 % bessere Quelleigenschaften erzielt werden. Die Querkzugfestigkeiten sind identisch (vgl. Kapitel 5.12.4.3, Abbildung 67). Auch bei den Kontrollproben K bleiben die Querkzugfestigkeiten trotz unterschiedlicher Inkubationszeiten mit 0,08 N/mm² gleich, die Dickenquellung beträgt 102 % (113 % bei 2 Stunden Inkubationszeit).

In der Abbildung (70) sind die Biegefestigkeiten der Plattenvarianten mit einer vorherigen Inkubationszeit von 30 Minuten aufgeführt.

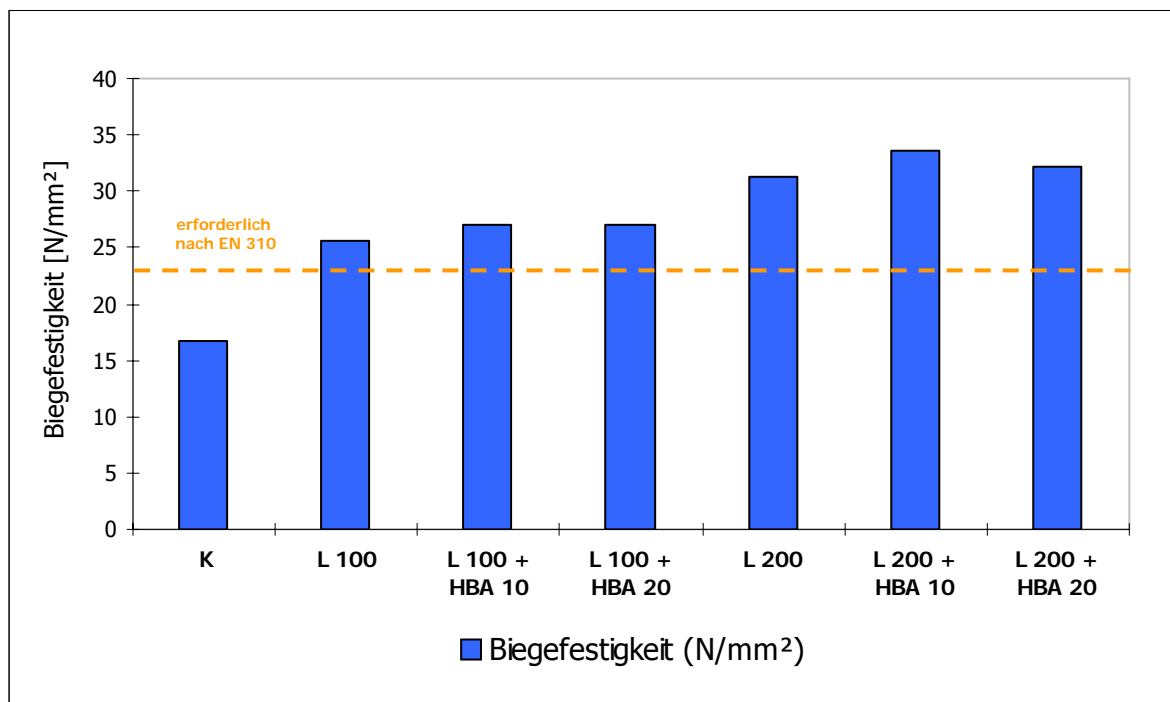


Abb. 70: Biegefestigkeiten von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 100 % und 5 Min. Presszeit bei 200 °C (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)

Bei allen Laccase und Laccase-Mediator gebundenen Plattenvarianten liegen die Biegefestigkeitswerte oberhalb der Mindestanforderung von 23 N/mm² (EN 310). Die höchste Biegefestigkeit wird mit der Plattenvariante L 200 + HBA 10 erreicht. Sie beträgt knapp 34 N/mm². Dieser Wert wird jedoch von der gleichen Variante bei 2 Stunden Inkubationszeit ermittelt. Auch die anderen Platten L 200 und L 200 + HBA 20 behalten unabhängig von der Inkubationszeit die jeweils identischen Werte (31 N/mm² und 32 N/mm²). Alleine bei den Plattenvarianten mit 100 U/ml Laccase sind Steigerungen der Biegefestigkeiten von 2 N/mm² zu erkennen.

Trotz der nahezu gleich bleibenden Biegefestigkeiten bei allen Plattenvarianten werden bei den MDF-Platten, deren Fasern mit 200 U/ml Laccase und für 30 Minuten inkubiert wurden, deutlich bessere Querzugfestigkeiten und geringere Dickenquellwerte erreicht, als bei einer zweistündigen Inkubation. Die Ergebnisse der Querzug- und Biegefestigkeitsprüfung reichen bei den Varianten L 200 + HBA 10 und L 200 HBA 20 aus, um die entsprechenden EN-Normen zu erfüllen. Dabei ist wiederum auffällig, dass auch wie bei den Ausführungen in Kapitel 5.12.4.1 und 5.12.4.3 beschrieben, ein Effekt der Erhöhung der Mediatormenge auf 20 mM ausbleibt. Weder die Querzug- und Biegefestigkeiten können durch 20 mM Mediator verbessert noch die Dickenquellungen verringert werden. Die Werte liegen im Vergleich zu den Plattenvarianten, die mit 10 mM Mediator hergestellt wurden, gleichauf oder haben geringfügig schlechtere mechanisch-technologische Eigenschaften. Somit kann festgehalten werden, dass eine Erhöhung der Mediatormenge keine Verbesserungen im Hinblick auf die Stabilität und somit Dickenquellwerte der Platten hervorruft, da das Aktivierungspotential des Mediators HBA als Redoxmolekül im Laccase-Mediator-System unter diesen Bedingungen zur Herstellung von MDF-Platten mit 10 mM voll ausgeschöpft zu sein scheint. Diese Erkenntnis deckt sich auch mit den Ergebnissen in den analytischen Untersuchungen in Kapitel 5.4 an Ligninmodellen und in Kapitel 5.10 bei der FTIR-Spektroskopie. Daher wurden auch die jeweils besten Eigenschaftswerte mit 10 mM Mediator HBA erreicht. In Ergänzung hierzu kann als Vorteil angesehen werden, dass die Kosten für den Einsatz des Mediators in halber Menge (10 mM anstatt 20 mM) geringer sind.

Die Norm EN 317, in der die Dickenquellwerte festgelegt sind, wird von den beiden diskutierten Plattenvarianten nicht ganz erfüllt. Eine Verringerung der Dickenquellung der Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten wäre durch die Verwendung eines Hydrophobierungsmittels (Wachse, Fette, Harze, Fettsäuren) (siehe Kapitel 4.2.13 und 5.12.2) bei der Besprühung der Fasern denkbar, doch muss laut BACK (1987) daran gedacht werden, dass sich oleophilische Bestandteile, wie z. B. Fette, Wachse und Harze neben der Laccase bzw. Laccase-Mediator Lösung die Holzfasern benetzen und sich nachteilig auf die Faser-zu-Faser Bindung auswirken. Die mechanisch-technologischen Eigenschaften der enzymgebundenen MDF-Platten würden verschlechtert, da gerade hier eine möglichst starke

Aufräumung auf der Faseroberfläche notwendig ist, um die Fasern miteinander zu „verkleben“. Eine zusätzliche Fett- oder Wachsschicht auf der Faseroberfläche würde die fasereigenen Bindekräfte erheblich einschränken (BACK, 1987). Auch FELBY et al. (2002) schreiben über eine Beeinträchtigung beim „Verkleben“ der Fasern und schlechte Festigkeitseigenschaften der enzymgebundenen MDF-Platten durch den Gebrauch von Wachs als Hydrophobierungsmittel.

Um auf die Wahl der Inkubationszeit zurückzukommen, so kann geschlussfolgert werden, dass sich eine kürzere Inkubationszeit bei der Herstellung besonders von Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten positiv auf die mechanisch technologischen Eigenschaften auswirkt. Besonders in der Kombination von einer Laccasekonzentration von 200 U/ml und einem Mediatoranteil von 10 mM konnte dieser Effekt nachgewiesen werden. FELBY et al. (2002) kamen bei der Produktion von Laccase gebundenen MDF-Platten im Pilotmaßstab zu ähnlichen Resultaten, da sie in einer kürzeren Inkubationszeit eine effektivere Nutzung radikalierter Ligninmoleküle auf der Holzfaseroberfläche vermuteten.

5.12.4.5 Mechanisch-technologische Eigenschaften Laccase oder Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten nach kurzer (< 2 Min.) Inkubationszeit (100 % Besprühung)

Entgegen der Ergebnisse bei den Inkubationsversuchen von technischen Ligninen und Kiefernfasern im Labormaßstab (Kapitel 5.4 bis 5.10), bei denen festgestellt wurde, dass bei der Verwendung von Laccase und Laccase-Mediator zur Aktivierung des Lignins bzw. der Ligninschicht auf der Holzfaseroberfläche dem Enzym mit oder ohne Mediator eine Inkubationszeit von 2 Stunden gegeben werden sollte, um eine höchstmögliche Radikalisierung der Ligninmoleküle zu erreichen, stellte sich bei der Herstellung Laccase und Laccase-Mediator behandelte MDF-Platten im Pilotmaßstab heraus, dass Inkubationszeiten weit unter 2 Stunden bessere mechanisch-technologische Eigenschaften der MDF-Platte zur Folge hatten. So wurden bei einer vorherigen Einwirkzeit der Laccase bzw. der Laccase und des Mediators von 30 Minuten bei den MDF-Platten mit den besten mechanisch technologischen Eigenschaften (L 200 + HBA 10) bis zu 52 % höhere Querkzugfestigkeiten als bei den Fasern erreicht, die zuvor 2 Stunden inkubiert wurden. Auch die Biegefestigkeiten stiegen deutlich an und die Quellwerte verringerten sich aufgrund der höheren Festigkeiten (vgl. Kapitel 5.12.4.3 und 5.12.4.4).

In weiteren Experimenten wurde nun überprüft, welche mechanisch technologischen Eigenschaften bei Laccase und Laccase-Mediator behandelten Mitteldichten Faserplatten gemessen werden können, deren Fasern im Endeffekt eine nur sehr kurze Inkubationszeit vor dem Verpressen zur Verfügung stand. So wurden die Fasern nach sonst identischen

Versuchsbedingungen mit einem Laccase bzw. Laccase-Mediator Puffergemisch 100 %ig besprüht, aber nach der Besprühung direkt in der Rohrtrocknungsanlage auf Holzfaserfeuchten von 11 % bis 14 % heruntergetrocknet, um unmittelbar hiernach zu MDF-Platten verpresst zu werden. Der Laccase bzw. dem Laccase-Mediator-System wurde somit nur eine Einwirkzeit von wenigen Minuten (< 2 Minuten) gegeben, bevor die Laccase durch die Brenntemperatur von 100 °C bis 120 °C denaturiert wurde. Man konnte demnach erwarten, dass die mechanisch-technologischen Eigenschaften der auf diese Weise hergestellten MDF-Platten deutlich schlechter waren, als bei einer vorherigen Inkubationszeit von 2 Stunden oder mindestens 30 Minuten. Doch wie sich zeigte, wurden überraschende Ergebnisse gewonnen, die in den beiden Abbildungen 71 und 72 aufgeführt sind.

Es handelt sich um die Eigenschaften der Kontrollplatten, sowie der durch 200 U/ml Laccase und 200 U/ml Laccase + 10 mM HBA gebundenen MDF-Platten. Eine Herstellung der MDF-Platten L 100, L 100 + 10 mM HBA, L 100 + 20 mM HBA und L 200 + 20 mM (vgl. Kapitel 5.12.1, 5.12.4.1, 5.12.4.3 und 5.12.4.4) unterblieb, da sich in dieser Untersuchung auf die Plattenvariante konzentriert werden sollte, die bisher immer die besten mechanisch-technologischen Eigenschaften aufwies, die Variante mit einer Laccasekonzentration von 200 U/ml und einer Mediatorkonzentration von 10 mM HBA.

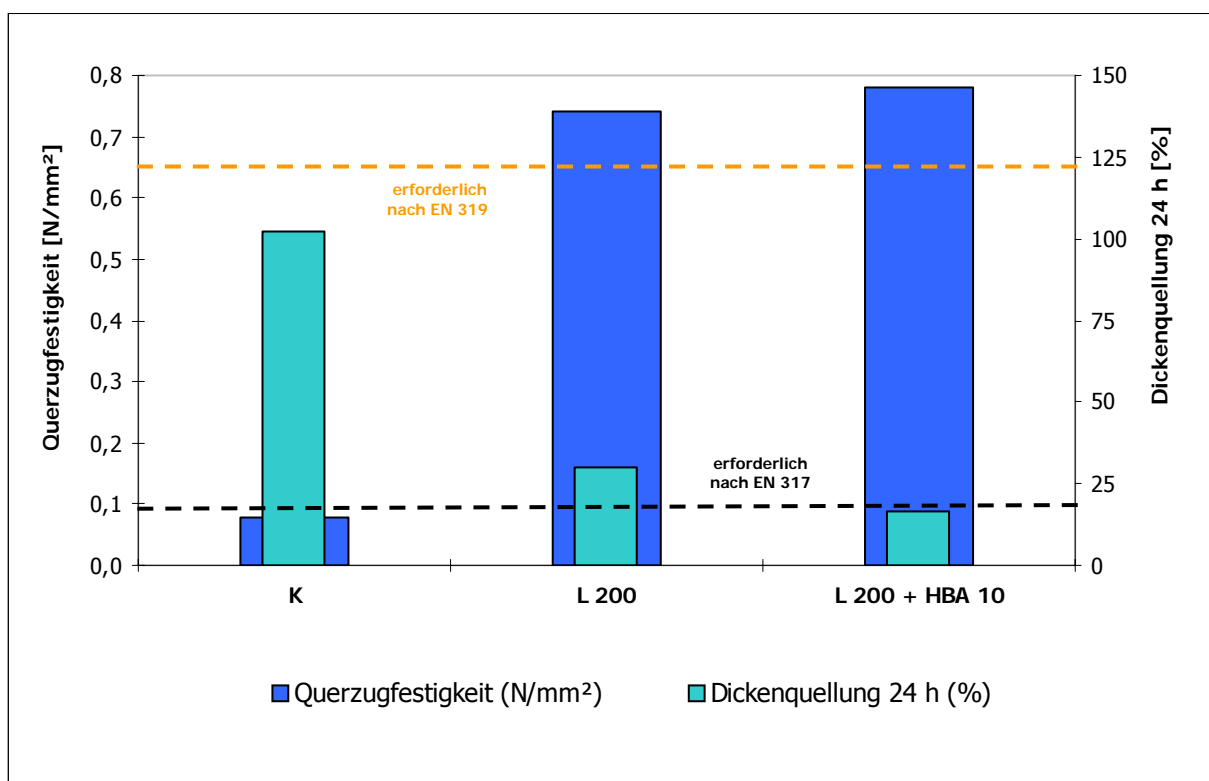


Abb. 71: Querzugfestigkeiten und Dickenquellungen nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 100 % und 5 Min. Presszeit bei 200 °C, Rohdichte 800 kg/m³ (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)

Bei der Betrachtung des Diagramms (Abbildung 71) fällt auf, dass sich die Querkzugfestigkeiten trotz einer sehr geringen Inkubationszeit der Holzfasern signifikant erhöht haben. Dies trifft sowohl auf die Laccase als auch auf die Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten zu. So werden mit den Platten L 200 und L 200 + HBA 10 Querkzugfestigkeiten von 0,74 und 0,79 N/mm² erreicht, eine deutliche Erfüllung der EN-Norm 319, in der 0,65 N/mm² erforderlich sind (vgl. Kapitel 5.12.1, Tabelle 11). Auch die Dickenquellwerte konnten mit 16,8 % bei der Platte L 200 + HBA 10 knapp unter den nach der EN 317 erforderlichen Höchstquellwert von 17 % gesenkt werden. Bei den Platten L 200 liegt der Quellwert mit etwa 30 % jedoch zu hoch, um die Norm zu erfüllen.

Die nochmalige Steigerung der Querkzugfestigkeiten bei den MDF-Platten L 200 und L 200 + HBA 10 gegenüber denen der Platten, deren Fasern zuvor 2 Stunden (Kapitel 5.12.4.1 und 5.12.4.3) und 30 Minuten (Kapitel 5.12.4.4) inkubiert wurden, beläuft sich auf bis zu 80 %. Dabei sinken die Quellwerte bis zu 50 %.

Bei den Kontrollplatten dagegen sind durch die sofortige Trocknung nach dem Besprühen mit McIlvaine Pufferlösung keine Verbesserungen der Querkzugfestigkeiten und Reduzierungen der Dickenquellwerte eingetreten. Die Querkzugfestigkeit liegt bei 0,08 N/mm², die Dickenquellung bei 105 % (vgl. Kapitel 5.12.4.1, 5.12.4.3 und 5.12.4.4)

Neben der Ermittlung der Querkzugfestigkeiten und der Dickenquellungen wurden auch die Biegefestigkeiten der eben erwähnten MDF-Platten getestet (Abbildung 72).

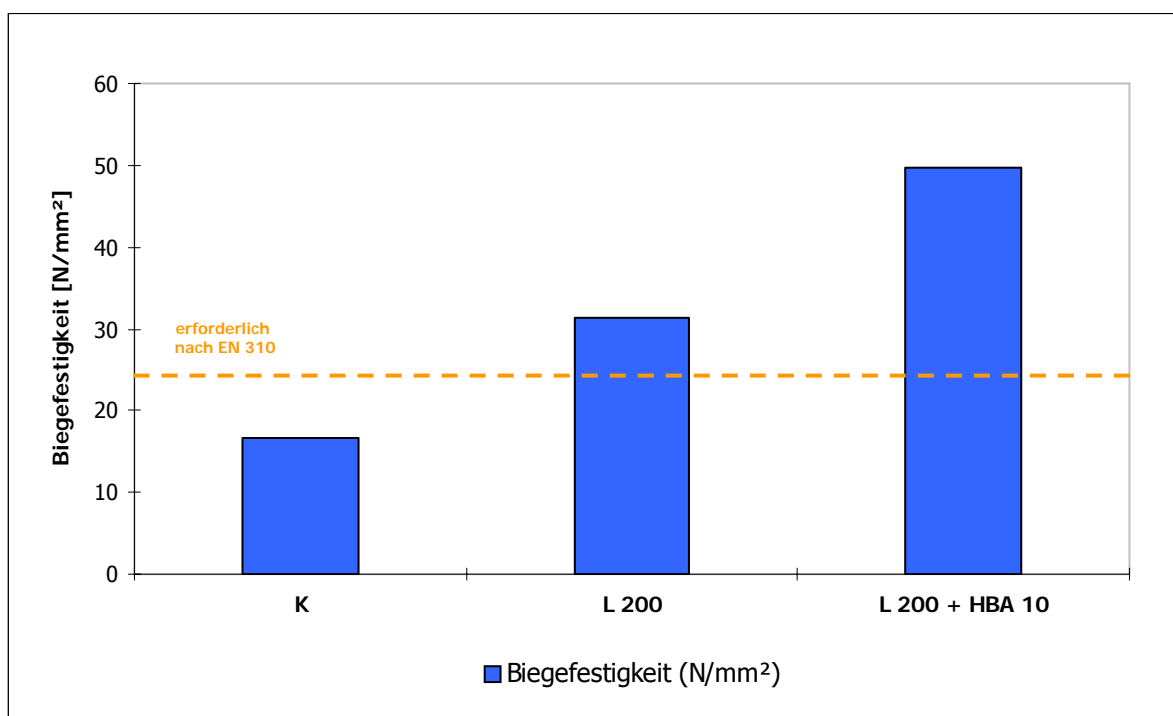


Abb. 72: Biegefestigkeiten von 8 mm starken MDF-Platten bei einer Besprühung von 100 % und 5 Min. Presszeit bei 200 °C (Probenbezeichnung siehe Tab. 18)

Wie in Abbildung 72 zu erkennen, erfüllen die beiden Laccase und Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten die für die Biegefestigkeiten erforderliche EN-Norm 310 (vgl. Kapitel 5.12.1, Tabelle 11). Dabei wird deutlich, dass die Biegefestigkeit bei der Verwendung von 10 mM HBA mit etwa 52 N/mm² wesentlich höher ist als ohne Mediator (29 N/mm² bei der Probe L 200). Bei den bisherigen Untersuchungen mit einer Inkubationszeit von 2 Stunden (siehe Kapitel 5.12.4.1 und 5.12.4.3) und 30 Minuten (siehe Kapitel 5.12.4.4) lagen die Biegefestigkeiten der besten MDF-Platten (L 200 + HBA 10) um die 35 N/mm². Dies bedeutet eine Steigerung der Festigkeit um 33 %. Die Biegefestigkeit der Kontrollprobe bleibt mit 17 N/mm² unterhalb dem nach EN-Norm 310 erforderlichen Wert von 23 N/mm².

Aus den in diesem Kapitel gewonnenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass im Pilotmaßstab bei der MDF-Plattenproduktion eine äußerst knappe Inkubationszeit der Fasern einen erheblichen Effekt bewirken muss. Die Aktivierung des Lignins auf der Oberfläche der Holzfasern muss unter diesen Umständen demnach wenigen Minuten (< 2 Minuten) ablaufen und in einer solchen Intensität, dass die mechanisch technologischen Eigenschaften der Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten deutlich besser sind, als bei einer vorherigen 2-stündigen oder 30-minütigen Inkubation. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass entgegen der Analysen im Labormaßstab, bei denen die für die Aktivierung des Mittellamellenlignins auf der Holzfaseroberfläche geeignetste Inkubationszeit 2 Stunden betrug, die Fasern durch die Besprühung im Mischer hohen physikalisch-mechanischen Kräften ausgesetzt werden. Die Fasern werden unter Luftdruck mit der Inkubationslösung besprüht und durch den Mischer stark umhergewirbelt, was eine sehr schnelle Aktivierung und Radikalisierung des Lignins auf der Holzfaseroberfläche bewirken könnte. Durch die sofortige Trocknung und Verpressung der Fasern, könnte das aktivierte Lignin unmittelbar im physikalischen (Aktivierung, Polymerisation) und chemischen (Adhäsions- und Kohäsionskräfte) Prozess durch Druck- und Temperatureinwirkung eine rasche Vernetzung der Fasern untereinander herbeigeführt haben. Von ähnlichen Ergebnissen berichten FELBY et al. (2002), die allerdings Inkubationszeiten von 30 Minuten zur Herstellung Laccase gebundener Faserplatten untersuchten. Doch auch selbst über eine Inkubationszeit unter 30 Minuten wurde diskutiert (FELBY et al. 2002).

Ein weiterer positiver Effekt bei der direkten Trocknung nach dem Besprühen der Holzfasern mit Inkubationslösung im Mischer kann in der erheblich verkürzte Herstellungsdauer der enzymgebundenen MDF-Platten gesehen werden. Die Inkubation findet innerhalb weniger Minuten statt, eine Inkubation der Holzfasern im Faserbunker (bei 30 Minuten und 2 Stunden Inkubationszeit) sowie der erneute Transport durch die gesamte Produktionsanlage zum Trocknen der inkubierten Fasern ist nicht mehr notwendig.

5.12.5 Fazit der Herstellung enzymgebundener, bindemittelfreier MDF-Platten

Abschießend kann man aus dem Kapitel der Laccase bzw. Laccase und Mediator gebundenen MDF-Platten mehrere Schlüsse ziehen.

1. Bei der Überprüfung optimaler Herstellungsparameter beim Verpressen der Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten wurde festgestellt, dass eine Presstemperatur von 200 °C zu den besten mechanisch-technologischen Eigenschaften führt. Eine Presstemperatur von 190 °C war zu niedrig, um eine ausreichende Festigkeit der MDF-Platten zu gewährleisten. Zudem war die Dickenquellung der Platten nach 24 Stunden Wasserlagerung deutlich höher, als bei den bei 200 °C gepressten MDF-Platten. Eine Temperatur von 210 °C verursachte nach wenigen Minuten Pressdauer eine Zerstörung der Holzfasern auf der Plattenober- und -unterseite. Die Platten wiesen eine starke Bräunung auf, ihr Zustand war spröde, die mechanisch-technologischen Eigenschaften waren schlechter, als die der bei 200 °C gepressten MDF-Platten.
2. Ein weiterer Parameter zur Optimierung der Platteneigenschaften war die Pressdauer. Die Presszeiten wurden hierbei zwischen 3, 4, 5 und 6 Minuten variiert. Zu jeder Presszeit wurden die Querzugfestigkeiten, Biegefestigkeiten und Dickenquellungen nach 24 Stunden Wasserlagerung der in dieser Dissertation dazu hergestellten MDF-Platten ermittelt. Es stellte sich heraus, dass bei einer Presszeit von 5 Minuten die besten mechanisch-technologischen Eigenschaften erreicht werden konnten. Eine kürzere, aber auch längere Presszeit wirkte sich nachteilig auf die Platteneigenschaften aus. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die MDF-Platten eine Dicke von 8 mm besaßen, womit sich eine Presszeit von 37,5 s/mm Plattenstärke ergab.
3. Die Plattendicke war unter Berücksichtigung der anderen Herstellungsparameter ein weiteres Kriterium, Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundene MDF-Platten herzustellen, die sich durch gute mechanisch-technologische Eigenschaften auszeichnen sollten. Dabei wiesen die Platten mit einer Dicke von 8 mm unter gleichen Herstellungsbedingungen bessere Eigenschaften auf, als die MDF-Platten mit einer Dicke von 10 mm. Eine Erhöhung der Presstemperatur auf 210 °C bei gleich bleibender Presszeit von 5 Minuten konnte bei den 10 mm starken Platten keine Verbesserung der mechanisch-technologischen Eigenschaften erbringen. Vielmehr waren die Platten wieder zu stark gebräunt und spröde wirkend, was auf eine Zerstörung der Holzfasern durch Hitze zurückzuführen war. Eine Verkürzung der Presszeit von 5 Minuten auf 4 Minuten bewirkte

zwar keine so starke Verbräunung der Platten, doch verschlechterten sich wieder die mechanisch-technologischen Eigenschaften.

4. Ein weiterer Aspekt bei der Herstellung der Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten spielte die Rohdichte. Als mögliche Dichten wurden 600 kg/m^3 , 700 kg/m^3 und 800 kg/m^3 ausgewählt. Die Herstellung der Platten erfolgte bereits nach den bisher optimierten Parametern statt. So wurden die Platten mit 8 mm Dicke bei $200 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 Minuten gepresst und anschließend den mechanisch-technologischen Eigenschaftsprüfungen unterworfen. Wie sich herausstellte, nahmen die Festigkeiten der MDF-Platten mit steigender Rohdichte zu, die Dickenquellwerte ab. Doch waren nur die Eigenschaften der MDF-Platten mit 800 kg/m^3 so gut, um die Anforderungen der jeweiligen EN-Normen zu erfüllen.

5. Die Ergebnisse der Herstellungsparameteroptimierung wurden für die Produktion verschiedener Plattenvarianten verwendet. Es handelte sich um mit verschiedenen Laccase- und Mediatorkonzentrationen behandelte Holzfasern. Bei den einen Plattenvarianten wurde nur Laccase verwendet, bei den anderen Laccase und Mediator. Als Kontrollplatten dienten Holzfasern, die im Puffer ohne Laccase und Mediator behandelt wurden. Aufgrund der analytischen Untersuchungen in dieser Dissertation wurde eine Inkubationszeit von 2 Stunden ausgewählt, um eine optimale Aktivierung und Radikalisierung des Lignins auf der Holzfaseroberfläche zu erhalten und somit eine bestmögliche „Verklebung“ der Fasern zueinander zu bewirken. Während der MDF-Plattenproduktion wurden zusätzlich kürzere Inkubationszeiten ausgewählt, 30 Minuten und wenige Minuten (< 2 Minuten). Bei der sehr kurzen Inkubationszeit von < 2 Minuten wurden die mit Laccase bzw. Laccase-Mediator Pufferlösung besprühten Fasern direkt weiterverarbeitet und zu MDF-Platten verpresst. Bei der Plattenherstellung mit 2-stündiger Inkubationszeit wurden zwei Besprühungsarten untersucht. So wurden die Fasern zu 50 % : 50 % (zweistufige Besprühung) und zu 100 % (einstufige Besprühung) besprüht. Dabei stellte sich heraus, dass die Besprühung der Holzfasern in einem Schritt (100 %) bei den MDF-Platten bessere mechanisch-technologische Eigenschaftswerte bewirkte, da die Fasern daraus resultierend eine höhere Inkubationsfeuchte hatten, was für die Aktivierung der Holzfaseroberfläche von Bedeutung war. Eine zweistufige Besprühung wurde hiernach nicht mehr durchgeführt. Bei dem Vergleich der Plattenvarianten stellte sich heraus, dass die MDF-Platten mit einer Laccasekonzentration von 200 U/ml bessere Eigenschaftswerte erreichten, als die mit 100 U/ml. Darüber hinaus war unabhängig von der Laccasekonzentration eine deutliche Steigerung der Eigenschaftswerte durch die Verwendung des Mediators 4-Hydroxybenzoesäure (HBA) eingetreten. Als optimale Mediatorkonzentration eigneten

sich 10 mM. Bei einer Konzentration von 20 mM HBA war keine Verbesserung der mechanisch-technologischen Eigenschaften mehr zu erkennen. Zwar konnten zahlreiche MDF-Platten nach 2-stündiger Inkubation die Anforderungen des Biegefestigkeitstests (nach EN 310) erfüllen, die Querzugfestigkeiten (nach EN 319) waren jedoch zu gering und die Dickenquellwerte (nach EN 317) zu hoch.

6. Nach der Plattenherstellung mit einer vorherigen 2-stündigen Inkubation wurden in weiteren Untersuchungen MDF-Platten verpresst, deren Fasern zuvor nur für 30 Minuten inkubierten. Bei der Überprüfung der mechanisch-technologischen Eigenschaften stellte sich heraus, dass alle Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten gute Biegefestigkeiten erreichten. Die Plattenvarianten mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA sowie mit 200 U/ml und 20 mM Mediator HBA erfüllten bei der Bestimmung der Querzugfestigkeiten gegenüber den MDF-Platten nach zweistündiger Inkubation den nach der EN-Norm 319 erforderlichen Mindestwert. Die Ermittlung der Dickenquellwerte nach 24 Stunden Wasserlagerung ergab, dass die Plattenvariante mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA sehr nah an der Erfüllung der EN-Norm 317 war, die Plattenvariante mit 20 mM lag jedoch wieder deutlich über dem Grenzwert.

7. Diese Ergebnisse führten dazu, sich auf die Plattenvariante mit 200 U/ml Laccase sowie 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA zu konzentrieren, um für die folgenden Versuche mit einer vorherigen Inkubationszeit von wenigen Minuten (< 2 Minuten) getestet zu werden. Trotz der sehr kurzen Einwirkzeit der Inkubationslösung auf die Fasern im Mischer mit anschließender, sofortiger Trocknung und Verpressung der Fasern ergaben sich deutlich bessere Querzugfestigkeiten und Biegefestigkeiten als bei einer vorherigen Inkubation von 30 Minuten. Selbst die nur mit 200 U/ml Laccase gebundenen MDF-Platten erfüllten den Mindestwert für die Querzugfestigkeit der EN 319. Bei der Dickenquellung nach 24 Stunden Wasserlagerung lagen die Werte bei dieser Plattenvariante dennoch über dem Grenzwert der EN-Norm 317. Bei der Plattenvariante mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA dagegen wurden die Vorgaben zur Erfüllung der entsprechenden Norm erfüllt. Eine Reaktion zwischen der Inkubationslösung und dem auf der Faseroberfläche befindlichen Mittellamellenlignin muss innerhalb weniger Minuten bei der Besprühung im Mischer stattgefunden haben, welche zu einer ausreichenden Aktivierung und Radikalisierung des Lignins geführt haben muss, um bei den MDF-Platten so gute mechanisch-technologische Eigenschaftswerte zu bewirken, die zur Erfüllung der in dieser Dissertation verwendeten Normen (EN 310, EN 317, EN 319) genügen. Diese Methode verkürzt erheblich die Produktionszeit der enzymgebundenen MDF-Platten. Eine Inkubationszeit im Faserbunker der MDF-Anlage ist nicht mehr notwendig.

8. Das Fazit dieser Untersuchungen unter Einbeziehung aller optimierten Herstellungsparameter kann demnach lauten:

Mit der Verwendung von 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA ist es möglich, im Pilotmaßstab 8 mm starke MDF-Platten mit einer Rohdichte von 800 kg/m³ bei einer Presstemperatur von 200 °C und einer Pressdauer von 5 Minuten herzustellen, die so hohe Querzug- und Biegefestigkeiten, sowie niedrige Dickenquellwertenach 24 h Wasserlagerung erreichen, um die entsprechenden EN-Normen zu erfüllen. Dazu sollten die Fasern in einem Schritt besprüht (100 %), direkt getrocknet und verpresst werden. Die Ergebnisse aus den Laboruntersuchungen zum Laccase-Mediator-System, bei der eine optimale Inkubationszeit von 2 Stunden ermittelt wurde, dienen zur modellhaften Interpretation des Laccase-Mediator-Systems. In der praktischen Anwendung des Laccase-Mediator-Systems zur Herstellung enzymgebundener, bindemittelfreier MDF-Platten stellte sich heraus, dass eine Inkubationszeit von 2 Stunden nicht erforderlich ist, sondern die Inkubation nur wenige Minuten betragen kann.

6 Zusammenfassung

6.1 Holzwerkstoffe und Bindemittel

Die Holzwerkstoffindustrie ist heute in Deutschland nach der Sägeholzindustrie das zweitwichtigste Segment der Rohholznutzung. Dabei lag die Produktionsmenge der Holzwerkstoffe im Jahre 2006 bei Spanplatten bei ca. 8,2 Mio. m³ (57 % der in Deutschland insgesamt produzierten Holzwerkstoffe) und bei Faserplatten bei ca. 5 Mio. m³ (34,4 % der gesamten deutschen Holzwerkstoffproduktion) (VHI, 2008). Die vielfältigen Einsatzgebiete von Span- und Faserplatten im Baugewerbe und der Möbelindustrie deuten auf eine weitere Produktionssteigerung in den kommenden Jahren hin. Dabei ist besonders auffällig, dass die Produktionsmengen der Mitteldichten Faserplatten gegenüber denen der Spanplatten überproportional steigen, so dass neben dem amerikanischen Markt auch für Europa eine weitere Substitution der Spanplatte und Massivholz durch die Mitteldichte Faserplatte zu erwarten ist (EPF, 2007; VHI, 2008).

Aufgrund ihrer Produktionsmengen ist die Holzwerkstoffindustrie weltweit einer der größten Abnehmer für Bindemittel. Diese sind vor allem konventionelle Bindemittel auf petrolchemischer Basis, wozu überwiegend die Harnstoff-Formaldehyd-Harze (UF), Melamin verstärkte Harnstoff-Formaldehyd-Harze (MUF), Phenol-Formaldehyd-Harze (PF) und polymere Diisocyanate (PMDI) gehören. Beispielsweise entfallen auf die Bindemittel bei der MDF-Plattenproduktion etwa 20 % der Endherstellungskosten (KHARAZIPOUR, 2004). Durch die ständig steigenden Rohölpreise, sowie die Abhängigkeit der Holzwerkstoffindustrie von diesen petrolchemischen Bindemitteln, verteuerten sich die hergestellten Holzwerkstoffe seit den letzten Jahren deutlich (SCHÖPPER, 2006). Ein weiterer Aspekt ist, dass zudem der Gehalt an Formaldehyd in den oben genannten konventionellen Bindemitteln als problematisch angesehen wird (ROFFAEL, 1982; SUNDIN und ROFFAEL, 1989; ROFFAEL et al., 1993). In Verbindung mit Holzwerkstoffen ist Formaldehyd vor allem als Inhalationsstoff von Bedeutung. Im Jahre 2004 wurde Formaldehyd aufgrund einiger durchgeführter Untersuchungen in den USA von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als karzinogen eingestuft (IARC, 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Reklassifizierung des Formaldehyds von „krebsverdächtig“ zu „krebserregend“ durch das IARC empfohlen (THOLE, 2006).

So kann als wichtiges Kriterium für die Holz be- und verarbeitenden Betriebe, insbesondere die Holzwerkstoffindustrie, eine Entwicklung von naturnahen Bindemitteln gesehen werden (SCHÖPPER, 2006). So bietet die Verwendung naturnaher Bindemittel den Holzwerkstoffunternehmen die Chancen, durch den Verkauf ihrer gesundheitlich

unbedenklichen, formaldehydfreien Produkte eine breite Akzeptanz in der Bevölkerung zu gewinnen. Eine Substitution der konventionellen Bindemittel würde daraus resultierend zukünftig vor allem aus ökologischer, aber auch ökonomischer Sicht für die Holzwerkstoffindustrie mehr Bedeutung gewinnen.

6.2 Zielsetzung

Angesichts dieser Problematik und die Suche nach Alternativen in Form von naturnahen Bindemitteln bei der Holzwerkstoffproduktion war das Hauptziel dieser Dissertation die Entwicklung Enzym und Mediator gebundener, bindemittelfreier Holzwerkstoffe, insbesondere Mitteldichter Faserplatten (MDF) im Pilotmaßstab. Diese sollten ohne eine weitere Zugabe der in Kapitel 6.1 genannten Bindemittel die Vorgaben aller relevanten Normen erfüllen können und somit für eine industrielle Applikation geeignet sein.

Zu diesem Zweck sollten verschiedene Enzym-Mediator-Systeme untersucht und optimiert werden, um eine höhere Reaktivität bei der Aktivierung der fasereigenen Bindekräfte zu erreichen. Als Enzym sollte die Phenoloxidase (Laccase) angewandt werden. Aus chemischer Sicht versteht man unter Mediatoren meist Redoxmediatoren, wobei es sich um Verbindungen mit elektronenübertragenden Eigenschaften handelt (POTTHAST, 1998). So versteht man im Zusammenhang mit dem Laccase-Mediator-System (LMS) unter Mediatoren niedermolekulare Substanzen, welche unter gegebenen Bedingungen Reaktionen bewirken, die ansonsten nicht ablaufen würden (POTTHAST, 1998). Das Laccase-Mediator-System wurde erstmals durch BOURBONNAIS und PAICE (1990) beschrieben. Während es zum Beispiel schon für einige biochemische Verfahren eingesetzt wird, ist die Verwendung von Mediatoren bei der Herstellung enzymgebundener MDF-Platten völlig neu. Daher lag das Hauptaugenmerk in dieser Dissertation darauf, die Wirkung von Mediatoren in der Kombination von Holzfasern und Laccase zu untersuchen.

Als wichtige Voraussetzung für die Herstellung enzymgebundener MDF-Platten galt es, die bestmöglichen Bedingungen zur Aktivierung der fasereigenen Bindekräfte zu ermitteln. Dazu gehörten die Optimierung der Laccase-Mediator-Konzentration, sowie das Bestimmen eines optimalen pH-Wertes für die Inkubation der Holzfasern. Weiterhin mussten ideale Bedingungen für die Inkubation der Holzfasern im Laccase-Mediator-System geschaffen werden. Hierbei war die Laccase- und Mediatorkonzentration, sowie die Inkubationszeit von großer Bedeutung.

Für die angesprochenen wichtigen Bedingungen fanden analytische Untersuchungen im Labor statt. Die gewonnenen Ergebnisse sollten dann bei der MDF-Plattenherstellung im technischem Maßstab verwendet und überprüft werden.

6.3 Eigene Laccaseherstellung und Industrielaccase

In Laboruntersuchungen wurde zunächst auf die Grundlagen der biotechnologischen Laccaseproduktion eingegangen. Dazu fanden nach Vorversuchen mit Laccase produzierenden Weißfäuleerregern in Schüttelkulturen einige Fermentationen im Labormaßstab statt. Dabei stellte sich heraus, dass besonders mit dem Weißfäulepilz *Trametes versicolor* durch die Induktion mit Kraftlignin (Indulin) gute Ergebnisse hinsichtlich der Laccaseaktivitäten erzielt werden konnten, doch waren die Aktivitätswerte für eine Anwendung zur Inkubation der Holzfasern im Pilotmaßstab zu gering, so dass auf eine Industrielaccase mit hoher Aktivität ausgewichen wurde.

Die Industrielaccase wurde vor ihrer Verwendung bei der MDF-Produktion eingehend analysiert. Es wurden der optimale pH-Wert und die pH-Stabilität der Laccase für ihren Einsatz zur Aktivierung der holzeigenen Bindekräfte bestimmt. Darüber hinaus erfolgte die Ermittlung ihres Temperaturoptimums und ihrer Temperaturstabilität.

6.4 Laboranalytische Untersuchungen zum Laccase-Mediator-System

Erste Untersuchungen zum Laccase-Mediator-System erfolgten anhand von Ligninmolekulargewichtsbestimmungen mittels Gel-Permeationschromatografie (GPC). Im Zusammenhang mit unterschiedlichen Ligninen wurden variierende Laccasekonzentrationen und verschiedene Mediatoren getestet. Ein wichtiges Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass bei der Verwendung von Mediatoren immer deutlich höhere Molekulargewichte des Lignins gemessen wurden, als bei der alleinigen Behandlung mit Laccase. Der Grund dafür war eine effektivere Ligninaktivierung und Radikalisierung, hervorgerufen durch die Mediatoren. Am besten eignete sich der Mediator 4-Hydroxybenzoesäure (HBA), mit dem die höchsten Ligninmolekulargewichte überhaupt gemessen werden konnten. In einer Konzentration von 10 mM und in Verbindung mit 200 U/ml Laccase konnte dieser erfolgreich als Laccase-Mediator-System eingesetzt werden.

Durch chemische Analysen wurden die Lignin-, Pentosan- und Extraktstoffgehalte der für die MDF-Plattenproduktion verwendeten TMP-Kiefernfasern ermittelt. Durch die chemische Charakterisierung vor und nach einer Behandlung mit Laccase bzw. Laccase und Mediator konnten Unterschiede in der chemischen Struktur der Holzfasern deutlich gemacht werden.

Mit Hilfe der Aufnahmen mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) konnten wesentliche Erkenntnisse über die Einwirkung von Laccase bzw. Laccase und Mediator auf die

Holzfaseroberflächenstruktur gewonnen werden. Grundsätzlich wurde bestätigt, dass das auf der Faser befindliche, verkrustete Mittellammellenlignin der Laccase als Substrat dient. Nach KHARAZIPOUR (1996) liefen dabei auf der Grundlage der Reaktionen zwischen Laccasen und Ligninen folgende Reaktionen parallel ab: Aktivierung des Lignins, Oxidation, Polymerisation, Teilabbau des freigelegten Lignins und Lösung der Bindungen zwischen Lignin und Cellulosefibrillen des Lignocellulosekomplexes. Die deutlichsten Veränderungen der Holzfaseroberfläche der mit unterschiedlichen Laccase- und Laccase-Mediatorkonzentrationen inkubierten Fasern ergaben sich bei den Proben, die mit 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA behandelt wurden.

Mittels spectrophotometrischer Extinktionsmessungen wurden die gelösten phenolischen Hydroxyl-Gruppen mit Laccase bzw. Laccase und Mediator inkubierter Holzfasern bestimmt. Es wurde untersucht, welche Rollen der pH-Wert und die Zeit bei der Inkubation der Fasern spielen. Neben dem Ergebnis, dass die höchste Ablösung der phenolischen Hydroxyl-Gruppen von den Fasern bei einem pH-Wert von 6,0 nach 2 Stunden Inkubationszeit ermittelt wurde, konnte wiederum eine deutliche Aussage über die Laccase- und Mediatorkonzentration getroffen werden. Die beste Variante war nach wie vor eine Inkubationslösung aus 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA.

Die Untersuchungen der Laccase bzw. Laccase-Mediator inkubierten Holzfasern mittels Elektronenspin-Resonanz (ESR) haben gezeigt, dass mit der Verwendung des Mediators bessere Ergebnisse erzielt werden konnten, als bei der alleinigen Inkubation mit Laccase. Dabei wurde bei einer Laccasekonzentration von 200 U/ml und einer Mediatorkonzentration von 10 mM die höchste Intensität an freien Radikalen gemessen. Für die spätere Verpressung der inkubierten Holzfasern waren dann diese Radikale von Bedeutung, um sich mit anderen freien Radikalen zu vernetzen bzw. miteinander zu „verkleben“.

Das Ergebnis der Nuklear-Magnetischen-Resonanz-Spektroskopie (NMR) zeigte, dass durch die Einwirkung des Mediators deutlich mehr Strukturänderungen an den Holzfasern stattgefunden haben, als nur mit Laccase inkubierte Fasern.

Als letzte analytische Untersuchung wurde die Fourier-Transform-Infrared-Spektroskopie (FTIR) angewandt. Auch diese Methode diente zur Strukturaufklärung der inkubierten Holzfasern. Hier konnte besonders der Effekt der Aktivierung des Lignins auf der Holzfaseroberfläche dargestellt werden. Während sich die Absorptionen der für Lignin typischen Absorptionsbanden deutlich änderten, waren kaum Unterschiede der für Polysaccharide typischen Banden zwischen Laccase und Laccase-Mediator behandelten Holzfasern zu erkennen.

6.5 Herstellung von enzymgebundenen Dämmstoffplatten

Neben dem Hauptziel dieser Dissertation, der Herstellung enzymgebundener, bindemittelfreier MDF-Platten, wurde in einem weiteren Kapitel versucht, die bisher gewonnenen Ergebnisse aus den Laboranalysen auf eine weitere Art von Faserplatten auszuweiten: die Holzfaserdämmstoffplatten. Die Inkubation der Holzfasern erfolgte im so genannten Nassverfahren. Nach dem Entwässern der Fasern, dem Kaltpressen und der Mikrowellentrocknung entstanden mit Laccase bzw. Laccase und Mediator gebundene Dämmplatten, die anschließend mechanisch-technologischen Eigenschaftstests unterzogen wurden. Eine Neuerung hierbei war die Mikrowellentrocknung, die eine für die Zukunft erstzunehmende Alternative gegenüber der konventionellen, lang anhaltenden Trocknung der Dämmstoffplatten in Konvektionsöfen darstellt. Mit der Mikrowellentrocknung konnte die in der Dämmplatte enthaltene Feuchte innerhalb von etwa 10 Minuten reduziert werden, wogegen ein Trocknungsvorgang in Konvektionsöfen pro Zentimeter Plattendicke etwa eine Stunde benötigt.

6.6 Herstellung von enzymgebundenen, bindemittelfreien Mitteldichten Faserplatten (MDF)

Die Herstellung der MDF Platten erfolgte nach dem Trockenverfahren in der MDF-Pilotanlage der Arbeitsgruppe Chemie und Verfahrenstechnik von Verbundwerkstoffen, Büsgen-Institut der Universität Göttingen. Für die Besprühung stand ein Einachs-Mischer zur Verfügung, in dem die Sprühinkubationslösung auf die Holzfasern aufgetragen wurde. Die Inkubation der Fasern sollte in dem Faserbunker der Anlage stattfinden. Auf eine anschließende Trocknung der Fasern folgte das Streuen des Faservlieses und der eigentliche Heißpressvorgang zu einer Mitteldichten Faserplatte. Für die Herstellung der MDF-Platten wurden sämtliche Ergebnisse der analytischen Untersuchungen dieser Dissertation berücksichtigt. Darüber hinaus war es von enormer Bedeutung, die Herstellungsparameter an der Pilotanlage aufeinander abzustimmen, um die bestmögliche Qualität an enzymgebundenen,

bindemittelfreien Mitteldichten Faserplatten zu erhalten. Die Ergebnisse der mechanisch-technologischen Eigenschaftstests nach der Entwicklung und Optimierung des Laccase-Mediator-Systems zur Herstellung von MDF-Platten mussten ausreichend sein, um die in den Europäischen Normen enthaltenen Anforderungen erfüllen zu können.

Es stellte sich heraus, dass eine Presstemperatur von 200 °C beim Verpressen der Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten zu den besten mechanisch-technologischen Eigenschaften führte. Ein weiterer Parameter zur Optimierung der Platteneigenschaften war die Pressdauer. Die Presszeiten wurden hierbei zwischen 3, 4, 5 und 6 Minuten variiert. Es stellte sich heraus, dass bei einer Presszeit von 5 Minuten die besten mechanisch-technologischen Eigenschaften erreicht werden konnten. Eine kürzere, aber auch längere Presszeit wirkte sich nachteilig auf die Platteneigenschaften aus.

Die Plattendicke war ein weiteres Kriterium, um Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundene MDF-Platten unter Berücksichtigung der anderen Herstellungsparameter herzustellen. Bei Überprüfung der Plattendicken von 8 mm und 10 mm wiesen die Platten mit einer Dicke von 8 mm unter gleichen Herstellungsbedingungen bessere Eigenschaften auf, als die MDF-Platten mit einer Dicke von 10 mm. Eine weitere Rolle bei der Herstellung der Laccase bzw. Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten spielte die Rohdichte. Als Dichten wurden 600 kg/m³, 700 kg/m³ und 800 kg/m³ ausgewählt. Die Herstellung der Platten erfolgte bereits nach den bisher optimierten Parametern. So wurden die Platten mit 8 mm Dicke bei 200 °C für 5 Minuten gepresst und anschließend den mechanisch-technologischen Eigenschaftsprüfungen unterzogen. Wie sich herausstellte, nahmen die Festigkeiten der MDF-Platten mit steigender Rohdichte zu, die Dickenquellwerte dagegen ab. Doch waren nur die Eigenschaften der MDF-Platten mit 800 kg/m³ so gut, um die Anforderungen der jeweiligen EN-Normen zu erfüllen.

Unter Berücksichtigung der eben aufgeführten optimalen Herstellungsparameter wurden Laccase- bzw. Laccase-Mediator gebundene MDF-Platten mit verschiedenen Laccase- und Mediatorkonzentrationen hergestellt. Aufgrund der analytischen Untersuchungen in dieser Dissertation wurde eine Inkubationszeit von 2 Stunden ausgewählt. Doch wurden während der MDF-Plattenproduktion zusätzlich kürzere Inkubationszeiten gewählt, 30 Minuten und wenige Minuten (< 2 Minuten). Bei dieser sehr kurzen Inkubationszeit wurden die mit Laccase bzw. Laccase-Mediator Pufferlösung besprühten Fasern direkt weiterverarbeitet und zu MDF-Platten verpresst. Es stellte sich heraus, dass die MDF-Platten, deren Fasern vorher 2 Stunden inkubiert wurden, wesentlich schlechtere mechanisch-technologische Eigenschaften aufwiesen als die MDF-Platten, deren Fasern 30 Minuten lang behandelt wurden. Während die Biegefestigkeiten der Laccase-Mediator gebundenen MDF Platten

immer hoch genug waren, um die entsprechende Norm zu erfüllen, waren die Querkzugfestigkeiten zu niedrig und / oder die Dickenquellwerte zu hoch. Bei Versuchen, die mit Laccase bzw. Laccase-Mediator Lösung besprühten Holzfasern nur sehr kurz zu inkubieren (< 2 Minuten), direkt zu trocknen und zu MDF-Platten zu verpressen, erbrachten mechanisch-technologische Eigenschaften, die alle in dieser Dissertation verwendeten Normen erfüllen konnten.

6.7 Schlussfolgerung

Das Fazit der Untersuchungen zum Einsatz von Mediatoren bei der enzymatischen Aktivierung der fasereigenen Bindekräfte zur Herstellung enzymgebundener, bindemittelfreier MDF-Platten lautet:

Mit der Verwendung von 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA ist es möglich, im Pilotmaßstab 8 mm starke MDF-Platten mit einer Rohdichte von 800 kg/m^3 bei einer Presstemperatur von $200 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Pressdauer von 5 Minuten herzustellen, die so hohe Querkzug- und Biegefestigkeiten, sowie niedrige Dickenquellwerte erreichen, um die entsprechenden EN-Normen zu erfüllen. Dazu sollten die Fasern in einem Schritt besprüht (100 %), kurz inkubiert, danach unmittelbar getrocknet und verpresst werden. Die Ergebnisse aus den analytischen Untersuchungen (z. B. GPC, REM, ESR, NMR und FTIR) zum Laccase-Mediator-System, bei der eine optimale Inkubationszeit von 2 Stunden ermittelt wurde, dienen zur modellhaften Interpretation des Laccase-Mediator-Systems. In der praktischen Anwendung des Laccase-Mediator-Systems zur Herstellung enzymgebundener, bindemittelfreier MDF-Platten stellte sich heraus, dass eine Inkubationszeit von 2 Stunden nicht erforderlich ist, sondern die Inkubation nur wenige Minuten betragen kann.

Als weiterer Schritt sollte eine Übertragung der in dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse und Erfahrungen vom Pilotmaßstab in den Industriemaßstab erfolgen. Eine mögliche industrielle Applikation und zukünftige Vermarktung von enzymgebundenen, bindemittel- und emissionsfreien MDF-Platten sollte als besonderer Anreiz für die Holzwerkstoffindustrie gesehen werden.

7 Ausblick

Die Untersuchungen in dieser Dissertation haben gezeigt, dass es möglich ist, durch den Einsatz von Mediatoren die enzymatische Aktivierung der fasereigenen Bindekräfte so zu unterstützen, dass es möglich ist bindemittelfreie MDF-Platten herzustellen, die wesentlich bessere mechanisch-technologische Eigenschaften aufwiesen als die MDF-Platten, bei denen das Enzym ohne Mediator verwendet wurde. Letztlich konnten mit den Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten alle Vorgaben der hier behandelten Europäischen Normen erfüllt werden.

Als sehr geeigneter Mediator erwies sich die organische, aromatische Verbindung 4-Hydroxybezoessäure (HBA). Bei dem Vergleich verschiedener Mediatoren wurden die besten Resultate mit HBA erzielt. Dennoch sollten für zukünftige Untersuchungen des Laccase-Mediator-Systems bei der Herstellung von MDF-Platten weitere Mediatoren ausgewählt werden, die eine nochmalige Steigerung der Effektivität des hier erprobten Systems bewirken könnten. Als geeignete Laccase- und Mediatorkonzentrationen erwiesen sich 200 U/ml Laccase und 10 mM Mediator HBA. Hier könnten weitere Versuche stattfinden, die jeweiligen Konzentrationen so aufeinander abzustimmen, dass unter guten ökonomischen Bedingungen die bestmögliche Leistungsfähigkeit des Laccase-Mediator-Systems gewährleistet wird. Die enzymgebundenen MDF-Platten wurden im Trockenverfahren an der MDF-Pilotanlage der Arbeitsgruppe Chemie und Verfahrenstechnik von Verbundwerkstoffen des Büsgen-Institutes der Universität Göttingen hergestellt. Dort sollte der Produktionsablauf der MDF-Platten weiterhin optimiert werden. Besonderes Augenmerk ist hierbei auf die Besprühungstechnik, die Inkubationszeit und die Pressbedingungen zu werfen. In weiteren Versuchen sollte eine Erhöhung der Plattenstärke von 8 mm auf 10 mm bis zu 20 mm vorgenommen werden, ohne dass die guten mechanisch-technologischen Eigenschaften der Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten verloren gehen.

Eine Übertragung der Plattenproduktion vom Pilot- in den Industriemaßstab wird als wichtiges Vorhaben angesehen. Sind die Ergebnisse des Pilotmaßstabs auch im Industriemaßstab reproduzierbar, kann in einem weiteren Schritt eine industrielle Applikation Laccase-Mediator gebundener, bindemittelfreier MDF-Platten angestrebt werden.

Als Alternative zu den hier verwendeten Kiefernholzfasern bietet sich auch der Einsatz von Fasern anderer Holzarten, wie z. B. Buchen-, Fichten- oder Küstentannenholz an.

Desweiteren könnte neben dem erfolgreichen Einsatz des Laccase-Mediator-Systems bei der Produktion von MDF-Platten auch über eine Anwendung in der Holzfaserdämmstoffindustrie nachgedacht werden. Entsprechende Versuche in dieser Dissertation haben gezeigt, dass durch die enzymatische Aktivierung der fasereigenen Bindekräfte Holzfaserdämmplatten mit guter Qualität hergestellt werden können. Eine ausführliche Untersuchung für diesen weiteren Einsatzbereich sollte somit unbedingt erfolgen.

8 Literaturverzeichnis

- ADLER, E. (1977): Lignin Chemistry – Past, Present and Future, Wood Sci. Technol. 11, pp. 169-218.
- ANDER, P.; ERIKSSON, K.E. (1976): The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Arch. Microbiol. 109 (1-2): 1-8.
- ANDERSEN, S.O. (1985): Sclerotization and tanning cuticle. In: KERKUT, G.A.; GILLERT, L.I. (Hrsg.): Comparative insect physiology, biochemistry and pharmacology, Vol. 3. Oxford: Pergamon Press, pp. 59-64.
- BACK, E.L. (1987): The Bonding Mechanism in Hardboard Manufacture. Holzforschung 41, pp. 247-258.
- BALDRIAN, P. (2006). Fungal laccases – occurrence and properties. FEMS Microbiology Reviews, 30, pp. 215-242.
- BALAKSHIN, M.; CAPANEMA, E.; CHEN, C.-L.; GRATZL, J.; KIRKMAN, A.; GRACZ, H. (2001): Biobleaching of pulp with dioxygen in the laccase-mediator system – reaction mechanism for degradation of residual lignin. J. Mol. Cat. B: Enzymatic 13, pp. 1-16.
- BARRECA, A.M., SJORGEN, B., FABBRINI, M., GALLI, C. GENTILI, P. (2004): Catalytic efficiency of some mediators in laccase-catalyzed alcohol oxidation. Biocat. Biotrans. 22, pp. 105-112.
- BARISKA, M., PÖHLER-ROTACH, E., SEUBERT-HUNZIKER, H. (2001): Holzchemie. Holzkunde Teil 2 Vorlesungsskript des Departements Forstwissenschaften, Professur Holzwissenschaften. Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.
- BERGMANN, K. (1998): Enzymatische Aktivierung der holzeigenen Bindekräfte zur Herstellung einer bindemittelfreien Mitteldichten Faserplatte, Dissertation an der Forstwissenschaftlichen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen, Tectum Verlag.
- BERTRAND, G., (1894): C.R. Hebd. Acad. Sci. (Paris) 118, S. 1215.
- BERTRAND, G., (1896): C.R. Hebd. Acad. Sci. (Paris) 123, S. 463-465.
- BLECHSCHMITD, J., BLOSZFELD, O., BÄURICH, C., ENGERT, P., GRAF, M., WURDINGER (1988): Eigenschaften von CTMP aus einheimischen Holzarten (Teil II). Zellstoff und Papier 37 (2), S. 43-46.
- BOURBONNAIS, R., PAICE, M.G. (1990): Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Lett. 267, pp. 99 – 102.

- BOURBONNAIS, R., PAICE, M.G. (1992): Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of ABTS. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, S. 823-827.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G.; REID, I.D.; LANTHIER, P.; YAGUCHI, M. (1995): Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in Kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (5), pp. 1876-1880.
- BRUSS, M.L., BLACK, A.L. (1978): *Anal. Biochem.* 84, pp. 309-312.
- CALL, H.P., STRITTMATTER, G. (1992): Einsatz von Lignolytischen Enzymen in der Papier und Zellstoffindustrie – Neuere Ergebnisse. In: *Das Papier*, Heft 10 A.
- CALL, H.P.; MÜCKE, I. (1994): Die enzymatische Bleiche mit dem Laccase-Mediator System (LMS): Labor- und Pilotversuche. In: MILETZKY, F.; BORCHERS, B.; BAUMGARTEN, H. L. (Hrsg.): *Enzymtechnik in der Papierindustrie*. München: PTS. 5.1-5.9.
- CALL, H.P., MÜCKE, I. (1997): History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym-process). *J. Biotechnol.* 53, pp. 163–202
- CAMARERO, S., IBARRA, D., MARTINEZ, M.J., MARTINEZ, A.T. (2004): Lignin-derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Realcitrant Dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, April 2005, pp. 1775-1784.
- CASTRO, A.I.R.P., EVTUGUIN, D.V., XAVIER, A.M.B. (2003): Degradation of biphenyl lignin model compounds by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and heteropolyanion [SIW11VO40](5). *J. Mol. Catal. B –Enz.* 22, pp. 13-20.
- CHAKAR, F.S., RAGAUSKAS, A.J. (2004): Biobleaching Chemistry of laccase-mediator systems on high-lignin-content kraft pulps. *Can. J. Chem.* 82, pp. 344-352.
- CHANDRA, R.P., FELBY, C., RAGAUSKAS, A.J. (2004): Improving laccase-facilitated grafting of 4-hydroxybenzoic acid to high –kappa kraft pulps. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 24, 69-81.
- CHEFETZ, B.; CHEN, Y.; HADAR, Y. (1998): Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Appl. Environm. Microbiol.* 63, pp. 3444-3450.
- CHILDS, R.E., BARDSLEY, W.G. (1975): *Biochem. J.* 145, pp. 93-103.
- CLAUS, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*, 179, pp. 145-150.
- CLAUS, H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35, pp. 93-96.

- CRESTINI, C., JURASEK, L., ARGYROPOULOS, D.S. (2003): On the Mechanism of the Laccase-Mediator System in the Oxidation of Lignin. *Chem. Eur. J.* 9, 2003, pp. 5371-5378.
- D'ACUNZO, F., GALLI, C. (2003): First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models. *Eur. J. Biochem.* 270, pp. 3634-3640.
- D'ACUNZO, F., BAIOTTO, P., GALLI, C. (2003): A study of the oxidation of ethers with the enzyme laccase under mediation by two N-OH-type compounds. *New J.Chem.* 27, pp. 329-332.
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG e. V. (2005): Holzwerkstoffe Band 1 Holzfaserplatten. Spanplatten, Sperrholz, Massivholzplatten, Paneele. Normen, Richtlinien. 7. Auflage, März 2005. Beuth Verlag GmbH Berlin, Wien, Zürich.
- DENCE, C.W. (1992): The determination of lignin. In: Lin, S.Y., Dence, C.W. (eds.) *Methods in Lignin Chemistry*, Springer Verlag, Berlin, pp. 33-61.
- DEPPE, H.-J., ERNST, K (1996): MDF – Mitteldichte Faserplatten. DRW Verlag, Leinfelden-Echterdingen.
- DURAN, N., ESPOSITO, E (2000): Potential applications of oxidative enzymes and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B-Environ.* 28, pp. 83-99.
- EGGERT, C. (1997): Laccase-catalyzed formation of cinnabaric acid responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Microbiol. Res.* 152, pp. 315-318.
- EUROPEAN PANELBOARD FEDERATION (EPF) (2004): Opening 4th European wood based panel symposium, 15. – 17. September in Hannover.
- EUROPEAN PANELBOARD FEDERATION (EPF) (2007): http://www.mdf-info.org/website_epf/, aktuelle Mitteilungen und Statistiken. Datum: 17.12.2008.
- European standard EN 310 (1993): Wood-based panels; determination of modulus of elasticity in bending and of bending strength. European Committee for Standardization, Brussels, Belgium.
- European standard EN 317 (2003): Particleboard and fiberboards; determination of swelling in thickness after immersion in water. European Committee for Standardization, Brussels, Belgium.
- European standard EN 319 (1993): Particleboard and fiberboards; determination of tensile strength perpendicular to the plane of the board. European Committee for Standardization, Brussels, Belgium.
- European standard EN 323 (1993): Wood-based panels; determination of density. European Committee for Standardization, Brussels, Belgium.

- European standard EN 326-1 (1994): Holzwerkstoffe - Probenahme, Zuschnitt und Überwachung. Teil 1: Probenahme und Zuschnitt der Prüfkörper sowie Auswertung der Prüfergebnisse
- European standard EN 350-1 (1994): Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz, Teil 1: Grundsätze für die Prüfung und Klassifikation der natürlichen Dauerhaftigkeit von Holz.
- European standard EN 350-2 (1994): Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz, Teil 2: Leitfaden für die natürliche Dauerhaftigkeit und Tränkbarkeit von ausgewählten Holzarten von besonderer Bedeutung in Europa.
- European standard EN 1602 (1997): Wärmedämmstoffe für das Bauwesen. Bestimmung der Rohdichte. Deutsche Fassung 1997.
- European standard EN 1607 (1996): Wärmedämmstoffe für das Bauwesen. Bestimmung der Zugfestigkeit senkrecht zur Plattenebene. Deutsche Fassung 1996.
- European standard EN 1609 (1997): Wärmedämmstoffe für das Bauwesen. Bestimmung der Wasseraufnahme bei kurzzeitigem teilweisem Eintauchen. Deutsche Fassung 1997.
- European standard EN 13171 (2001): Werkmäßig hergestellte Produkte aus Holzfasern. Deutsche Fassung 2001.
- FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. (2002): Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 16, pp. 231-240.
- FAEHRAEUS, G., REINHAMMAR, B., (1967): Large Scale Production and Purification of Laccase from Cultures of the Fungus *Polyporus versicolor* and some Properties of Laccase A. *Acta Academica Scandinavia* 21, pp. 2367-2378.
- FELBY, C., NIELSEN, P.O., OELSEN, L. H., SKIBSTED, L.H. (1997): Identification and quantification of radical reaction intermediates by electron spin resonance spectrometry os laccase-catayzed oxidation of wood fibres fromm beech. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, pp. 459 – 464.
- FELBY, C., HASSIGBOE, J., LUND, M. (2002): Pilot-scale production of fiberboard´s made by laccase oxidized wood fibres: board properties and evidence for cross-linking of lignin. *Enz. Microbial Technol.* 31, pp. 736 – 741.
- FELBY, C., THYGESEN, L.G., SANADI, A., BARSBERG, S. (2004). Native lignin for bonding of fiber boards – evaluation of bonding mechanisms in boards made from laccase-treated fibers if beach (*Fagus sylvatica*). *Industrial Crops and Products* 20, pp. 181-189.

- FENGEL, D., PRZYKLENK, M. (1983): Vergleichende Extraktbestimmung zum Ersatz von Benzol durch Cyclohexan. Holz Roh Werkst. 41, pp. 193-194.
- FENGEL, D., WEGENER, G. (1984): Wood - chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter, Berlin.
- GALANTE, Y.M., FORMANTICI, C. (2003): Enzyme Applications in Detergency and in Manufacturing Industries. Current Organic Chemistry, Vol. 7, No. 13, pp. 1399-1422
- GAWEHN, H., WIELINGER, H., WERNER, Z. (1970): Anal. Chem. 272, p. 222.
- GEIGER, J.P.; HUGUENIN, B.; NICOLE, M.; NANDRIS, D. (1986): Laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*: II. Effect of *Rigidoporus lignosus* laccase L1 on thioglycolic lignin of *Hevea*. Appl. Biochem. Biotechnol. 13, pp. 97-110.
- GESTIS-Stoffdatenbank (2008): Gefahrstoffinformationssystem
<http://www.dguv.de/bgia/de/gestis/stoffdb/index.html>. Datum: 14.02.2008.
- GLASSER, W.G., KELLEY, S.S. (1987): Lignin. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. Bd. 8, 2. Auflage. S. 795-852.
- GOMEZ-ALARCON, G., FIGUERAS, M.J., SAIZ-JIMENEZ, C. (1991): Degradation of pine Kraft-Lignin by *Coriopsis gakkica* growing on a fiber-glass support. Wood Sci. Technol. 24, pp. 91-97.
- GOODELL, B., LIU, J., JELLISON, L.J., PASZCZYNSKI, A., FEKETE, F. (1996): Chelation activity and hydroxyl radical production mediated by low molecular weight phenolate compounds isolated from *Gleophyllum trabeum*. In MESSNER, K, SEBROTNIK, E. (Herausgeber): Biotechnology in Pulp and Paper Industry, pp. 591-594.
- GOODELL, B., JELLISON, J., LIU, J., DANIEL, G., PASZCZYNSKI, A., FEKETE, F. KRISHNAMURTHY, S., JUN, L., XU, G. (1997): Low molecular weight chelators an phenolic compounds isolated from wood decay fungi an their role in the fungal biodegradation of wood. J.Biotechnol. 53., S. 133-162.
- GRE CON (2008): <http://www.grecon.de>, Produktportfolio. Datum: 27.01.2008.
- HAARS, A., HÜTTERMANN, A. (1980): Function of Laccase in White-Rot Fungus *Formes annosus*. Arch. Microbiol. 125, S. 233-237.
- HAARS, A., HÜTTERMANN, A. (1984): Microbiological transormation of technical Organosolv lignins. In: FERRERO, FERRANT, NAVEAU (eds.): Aerobic digestion and carbohydrate hydrolysis of waste. Elsevier, London, New York, pp. 467-469.
- HAARS, A., HÜTTERMANN, A. (1984): Process for producing a binder for woo materials. U.S. Patent 4432921.
- HAARS, A., TROJANOWSKY, J., HÜTTERMANN, A (1987): Lignin conversation and its technical use. In: Bioenvironmental systems, Vol. 1. ED. Wise, Boca Raton, CRC-Press, S. 89-129.

- HAGER, A. (2003): Zum Effekt von Laccasen beim Altpapier-Deinking, Dissertation, Fachbereich Biologie, Universität Hamburg.
- HABENICHT, G (1986): Kleben. Springer Verlag, Berlin.
- HAEMMERLI, S.D., MATTI, S.A., LEISOLA, M., FIECHTER, A. (1986): Polymerisation of lignins by ligninases from *Phanerochaete chrysosporium*, FEMS Microbiology Letters 35, pp. 33-36.
- HÄGGLUND, E., 1939: Holzchemie, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig
- HALSE, O.M., (1926): Bestimmung von Zellstoff und Holzstoff im Papier. Papier-Journalen 14, Nr. 10, S. 121-123.
- HIGUCHI, T. (1990): Lignin biochemistry – biosynthesis and biodegradation. Wood Sci. Technol. 24, pp. 23-63.
- HIROI, T., ERIKSSON, K.E. (1976): Microbiological degradation of lignin. Part 1 and Part 2, Svensk Papperstidning 5, pp. 157-166.
- HON, D.N.S.; FEIST, W.C. (1981): Free radical Formation in Wood: The Role of Water. Wood Science 14 (1), pp. 107-110.
- HON, D.N.S. (1983): Mechanochemical reactions of Lignocellulosic Materials. Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium 37, pp. 461-481.
- HOEGGER, P.J., KILARU, S., JAMES, T., THACKER, J. & KÜES, U. (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multi-copper oxidase protein sequences. FEBS Journal, 273, pp. 2308-2326.
- HOEGGER, P.J., MAJCHERCZYK, A., DWIVEDI, R.C., SVOBODA, K., KILARU, S., KÜES, U. (2007): Enzymes in Wood Degradation. In KÜES, U. (Ed.): Wood Production, Wood Technology, and Biotechnological Impacts. Universitätsverlag Göttingen. Chapter 17, pp. 383-432.
- HÜTTERMANN, A., VOLGER, C. (1973): Cellobiose phosphorylase in *Fomes annosus*. Nature New Biology, 245, p. 64.
- HÜTTERMANN, A., GEBAUER, M., VOLGER, C., RÖSGER, C. (1977): Polymerisation und Abbau von Natrium-Ligninsulfonat. In Holzforschung 31 (3), S. 83-89.
- HÜTTERMANN, A.; HERCHE, C.; HAARS, A. (1980): Polymerization of water-insoluble lignins by *Fomes annosus*. Holzforschung 34 (2), pp. 64-66.
- HÜTTERMANN und HAARS (1981): Mikrobielle Transformation von Ligninsulfonsäure. In: Hüttermann, A. (Ed.), Der Wald als Rohstoffquelle. Sauerländer Verlag, Frankfurt a. M., S. 184-194.

- HÜTTERMANN, A., LOSKE, D., BRAUN-LÜLLEMANN, A., MAJCHERCZYK, A. (1988): Der Einsatz von Weißfäulepilzen bei der Sanierung kontaminiertes Böden. *Bio Engineering* 3, S. 156-160.
- HÜTTERMANN, A. (1989 a): Verwendung von Weißfäulepilzen in der Biotechnologie, *GIT Fachz. Lab.* 10/89, S. 943-950.
- HÜTTERMANN, A., MILSTEIN, O., NICKLAS, B., TROJANOWSKY, A., HAARS, A., KHARAZIPOUR, A. (1989 b): Enzymatic Modification of Lignin for technical use. In *New Polymeric Materials from Lignin*, Eds. Glasser, Sarkanen, ACS-Symposium, pp. 361-371.
- HÜTTERMANN, A., MILSTEIN, O., NICKLAS, B., TROJANOWSKY, A., HAARS, A., KHARAZIPOUR, A. (1989 c): Methods for the evaluation of lignin properties suitable for conversion. In: *Physico- and chemical characterisation of plant residues for industrial and feed use*, London, New York, S. 147-157.
- HÜTTERMANN, A., MAJCHERCZYK, A., ZEDDEL, A., KELSCHBACH, M. (1992): Biologische Reinigung verseuchter Böden. *BADK-Informationen* 4, S. 95-98.
- HÜTTERMANN, A., MAI, C. & KHARAZIPOUR, A. (2001). Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55, pp. 387-394.
- HOLZLEXIKON (2003): Band 1 - 3. DRW-Verlag Stuttgart.
- IFJU, G.; FEIST, W.C. (1980): Characteristics of free radicals in wood. *Wood and Fiber* 12, pp. 121-130.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH OF CANCER (IARC) (2004): IARC classifies Formaldehyde as carcinogenic to humans. Press release nr. 153. 15.04.2004.
- JAHN, H. (1979): Pilze die an Holz wachsen. Bussesche Verlagshandlung, Herford.
- JAYME, G., Büttel, H. 1968: Vergleich verschiedener Verfahren zur Pentosanbestimmung einschließlich einer neuen ISO-Methode. *Das Papier*, 22. Jahrgang, Nr. 5, S. 249-253
- JOHANNES, C., MAJCHERCZYK, A. (1999): Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. *App. Environm. Microbiol.* 66, pp. 524-528.
- KANG, K.H., DEC, J., PARK, H., BOLLAG, J.M. (2002): Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *Trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid. *Water Res.*, pp. 151-156.
- KAWAI, S.; UMEZAWA, T.; SHIMADA, M.; HIGUSHI, T.; MOROHOSHI, N; HARAGUSHI, T.; KOIDE, T.; NISHIDA, T. (1987): C-C cleavage of phenolic -1 lignin substructure model compound by laccase of *Coriolus versicolor*. *Mokuzai Gakkaishi* 33 (10), pp. 792-797.
- KAWAI, S., UMEZAWA, T.; HIGUCHI, T. (1989): Oxidation of methoxylated benzyl alcohol by *Coriolus versicolor* in the presence of syringaldehyde. *Wood Res.* 76, pp. 10-16.

- KEILIN, D., MANN, T. (1939): Nature 143. S. 23.
- KERR, T., BAILEY, I.W. (1934): The cambium and its derivative tissues. X. Structure, optical properties and chemical composition of the so-called middle lamella. J. Arnold Arbor. 15, pp. 327–349.
- KHARAZIPOUR, A. (1983): Optimierung eines Verfahrens zur Herstellung von Bindmitteln für Holzwerkstoffe auf der Basis von Ligninsulfonat und Laccase. Dissertation an der Forstwissenschaftlichen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen.
- KHARAZIPOUR, A., HAARS, A., SHEKHOESLAMI, M., HÜTTERMANN, A. (1991): Enzymgebundene Holzwerkstoffe auf der Basis von Lignin und Phenoloxidasen. Adhäsion 5, S. 30-36.
- KHARAZIPOUR, A., HÜTTERMANN, A. (1993) Enzymatische Behandlung von Holzfasern als Weg zu vollständig bindemittelfreien Holzwerkstoffen. In HÜTTERMANN, A., KHARAZIPOUR, A (Herausgeber): Die pflanzliche Zellwand als Vorbild für Holzwerkstoffe, naturorientierte Herstellung von Span- und Faserplatten. Stand der Technik und Perspektiven. Pp. 83 – 98, J. D. Sauerländer´s Verlag, Frankfurt/Main.
- KHARAZIPOUR, A., HÜTTERMANN, A., KÜHNE, G., RONG, M. (1993): Verfahren zur Herstellung von bindemittelfreien Formkörpern. DE-Patent 4305411.
- KHARAZIPOUR, A., HÜTTERMANN, A., KÜHNE, G., RONG, M. (1994): Verfahren zum Verkleben von Holzfragmenten und nach dem Verfahren hergestellte Formkörper. EU-Patent 94103099.
- KHARAZIPOUR, A. (1996): Enzyme von Weißfäulepilzen als Grundlage für die Herstellung von Bindmitteln für Holzwerkstoffe. Sauerländer´s Verlag Frankfurt/Main.
- KHARAZIPOUR, A., Hüttermann, A., Lüdemann, H.D. (1997): Enzymatic activation of wood fibres as a mean for the production of wood composites, J. Adhes, Sci. Technol. 11, pp. 419–427.
- KHARAZIPOUR, A., HÜTTERMANN, A. (1998): Biotechnological production of wood composites. In BRUCE, A. and PALFREYMAN, J. W. (Eds.), Forest products biotechnology. Taylor and Francis, London, pp. 141 – 150.
- KHARAZIPOUR, A., BERGMANN, K., NONNINGER, K., HÜTTERMANN, A. (1998 a). Properties of fibre boards obtained by activation of the middle lamella lignin of wood fibres with peroxidase and H₂O₂ before conventional pressing. Journal of Adhesion Science and Technology, 12, pp. 1045- 1053.
- KHARAZIPOUR, A., SCHINDEL, K., HÜTTERMANN, A. (1998 b). Enzymatic activation of wood fibers for wood composite production. ACS Symposium Series, 687, pp. 99-115.

- KHARAZIPOUR, A. (2002): Herstellung bindemittelfreier MDF-Platten mittels enzymatischer Aktivierung. Tagungsband des C.A.R.M.E.N Symposiums „Im Kreislauf der Natur – Naturstoffe für die moderne Gesellschaft, Würzburg im Juli 2002.
- KHARAZIPOUR, A. (2004): Holz als Werkstoff. Im Jahrbuch 2004/2005 Nachwachsende Rohstoffe, Wirtschaftsfaktor Biomasse, pp. 335 – 337. C.A.R.M.E.N.
- KIRK, T.K. (1980): Physiology of Lignin Metabolism by White-rot Fungi. In Kirk, T.K., Higuchi, T., Chang, H. (Eds.): Ligin Biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, Florida. Volume II, pp. 51-63.
- KIRK, T.K.; FARRELL, R.L. (1987): Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, pp. 465-505.
- KILARU, S., HOEGGER, P.J., MAJCHERZYK, A., BRUNS, C., SHISHIDO, K., BAILEY, A., FOSTER, G.D. & KÜES, U. (2006). Expression of laccase gene *lcc1* in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycete promoters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, pp. 200-210.
- KLOESER, L., KÜES, U., SCHÖPPER, C., HOSSEINKHANI, H., SCHÜTZE, S., DANTZ, S., MALIK, I., VOS, H., BARTHOLME, M., MÜLLER C., POLLE, A., KHARAZIPOUR, A. (2007): Panel Boards and Conventional Binders. In KÜES, U. (Ed.): *Wood Production, Wood Technology, and Biotechnological Impacts*. Universitätsverlag Göttingen. Chapter 15, pp. 297-347.
- KRUSENBAUM, J. (1991): Versuche zur Optimierung eines Substrates auf Basis von Kartoffelpülpe und Kartoffelfruchtwasser für die Anzucht von Pilzen. Als Diplomarbeit der forstwirtschaftlichen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen.
- KÜES, U., BOHN, C., EURING, M., MÜLLER, C., POLLE, A., KHARAZIPOUR, A. (2007): Enzymatically Modified Wood in Panel Board Production. In KÜES, U. (Ed.): *Wood Production, Wood Technology, and Biotechnological Impacts*. Universitätsverlag Göttingen. Chapter 18, pp. 433-468.
- KURTZ, B.; CHAMPE, S.P. (1982): Purification and characterization of the conidial laccase of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 151 (3), pp. 1338-1345.
- LABORDE, J., (1896): *C.R. Hebd. Acad. Sci. (Paris)* 123, S. 1074-1075.
- LAMPERT, H., 1967: *Faserplatten*, VEB Fachbuchverlag Leipzig.
- LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, D.; ZIEGENHAGEN, M.; WOJTASAWASILEWASKA, M.; CHO, N.-S.; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. (1999): Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genet. Biol.* 27 (2-3), pp. 175-185.
- LENOWICZ, A., CHO, N-S, LUTEREK, J., WILKOLAZKA, A., WOITAS-WASILEWSKA, M., MATUZEWSKAS, A., HOFRICHTER, M., WESENBERG, D., ROGALSKI, J. (2001): Fungal Laccase: Properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* 41, pp. 185 – 227.

- LEONTIEVSKY, A.A, VARES, T. LANKINEN, P., SHERGILL, J.K., POZDNYAKOVA, N.N., MYASOEDOVA, N.M. KALKKINEN, N., GOLOVLEVA, L.A. CAMMACK, R. und THURSTON, C.F. (1997): Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. FEMS Microbiol. Lett. 156, pp. 9-14.
- LITVINTSEVA, A.P.; HENSON, J.M. (2002): Cloning, Characterization, and Transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, the take-all fungus. Appl. Environm. Microbiol. 68 (3), pp. 1305-1311.
- LITTLE, B. F. P. (1991): Recent developments in the application of lignins, in proc. first workshop on lignocellulosis and pulp, Hamburg, pp. 15 – 22
- LUND, M., FELBY, C. (2001): Wet Strength improvement of unbleached Kraft pulp through laccase catalyzed oxidation. Enz. Microbial Technol. 28, S. 760-765.
- MAI, C., KÜES, U., MILITZ, H. (2004): Biotechnology in the wood industry. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63, pp. 477 – 494.
- MAJCHERCZYK, A., HÜTTERMANN, A. (1996): Size-exclusion chromatography of lignin as ion-pair complex. J. Chromatogr. A 764, pp. 183–191.
- MÄKINEN, K.K., TENOVUO, J. (1982): Anal. Biochem. 84, pp. 309-312.
- MALMSTRÖM, B.G. (1982): Enzymology of oxygen. Ann. Rev. Biochem. 51, pp. 21-59.
- MARUTZKY, R. (2004): Biomassen auf Basis von Holz als Brennstoffe für Österreich, der Schweiz und Deutschland. Nutzungssituation – Theroretische und reale Produktion – Qualität – Wettbewerbstendenzen – Preistendenzen. WKI, 2004.
- MARUTZKY, R. (2005): Formaldehyde: Actual Situation and Possible Impact on the Wood based Panel Industries. In: Sasol WAX (Hrsg.): Holzwerkstoff-Symposium. Dresden-Radebeul, 23.09.2005.
- MATSUMURA, E., YAMAMOTO, E., NUMATA, A., KAWANO, T. SHIN, T., MURAO, S. (1986): Structures of the Laccase-catalysed Oxidation Products of Hydroxybenzoic Acids in the Presence of ABTS. Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry. Agric. Biol. Chem. 50 (5), pp. 1355-1357.
- MAYER, A.M., STAPLES, R.C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry, 60, pp. 551-565.
- MEREDITH, R. J., 1998: Engineers' handbook of industrial microwave heating. IEE Power Series 25. London: Institution of Electrical Engineers.
- MESSNER, K., SCHIEFEMEIER, M., SREBOTNIK, E. und MEIMEL, M (1993): Research. FEMS symposium „Lignin Bio-Sulfite pulping: Current state of Biodegradation and Transformation“ Lissabon. Proceedings, pp. 193 – 200.
- MESSNER, K. (1993): Recent Biopulping Research in Austria. Biopulping Consortium Meeting 1993.

- MESSNER, K., SREBOTNIK, E. (1994): Biopulping: an overview of developments in an environmentally safe paper-making technology. *FMES Microbiol. Revi.* 13, pp. 351–364
- MEYERS (2007): Meyers Lexikonverlag, Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus AG, Ausgabe Februar 2007.
- MÜLLER, C. (2005). Mechanisch-enzymatischer Aufschluss von Kartoffelpülpe als Bindemittel zur Herstellung von Holzwerkstoffen. Dissertation an der Forstwissenschaftlichen Fakultät der Georg-August-Universität.
- MÜLLER, C., EURING, M., KHARAZIPOUR, A. (2006). Enzymatische Modifizierung von Holzfasern zur Aktivierung ihres Eigenbindevermögens. In: 3. Fachtagung Umweltschutz in der Holzwerkstoffindustrie, 18. und 19. Mai 2006 in Göttingen, Tagungsband, Georg-August-Universität Göttingen, Institut für Holzbiologie und Holztechnologie, Lehrbereich Holzchemie und Holztechnologie, Göttingen, S. 109-116.
- MÜLLER, C., KÜES, U., SCHÖPPER, C., KHARAZIPOUR, A. (2007): Natural Binders. In KÜES, U. (Ed.): *Wood Production, Wood Technology, and Biotechnological Impacts.* Universitätsverlag Göttingen. Chapter 16, pp. 347-382.
- NIMZ, H., RAZVI, A. MARQUHARAB, I., CLAD, A. (1972): Bindemittel bzw. Klebemittel zur Herstellung von Holzwerkstoffen sowie zur Verklebung von Werkstoffen verschiedener Art. Deutsches Patent: DOS 2221353
- NC-IUBMB (1992): Enzyme nomenclature 1992: Recommendations of the nomenclature. Committee of the international union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzymes. Prepared for NC-IUBMB by Edwin Clifford Webb. San Diego: Academic Press: 862 S.
- NOVOZYME (2003), Product Sheet for *Novozym 51003 Laccase*, 2003-04533-01, Denmark www.novozymes.com. Datum 25.10.2007.
- O'MALLEY, D.M.; WHETTEN, R.; BAO, W.; CHEN, C.-L.; SEDEROFF, R. (1993): The role of laccase in lignification. *Plant J.* 4, pp. 751-757.
- OSTERATH, B.; RAO, N.; LÜTZ, S.; LIESE, A. (2007): Technische Anwendung von Enzymen. *Chem. Unserer Zeit* 41, S. 324-333.
- PAICE, M.G.; BOURBONNAIS, R.; ARCHIBALD, F.S.; REID, I.D.; RENAUD, S.; ROCHEFORT, D. (1999): Delignification mechanisms for the bleaching of Kraft pulps with the enzymes laccase and manganese peroxidase. *Proc. 10th Biennial Int. Symp. on Wood and Pulping Chem.* (Yokohama): Vol. 1: pp. 578-582.

- PANDEY, K.K., PITMANN, A.J. (2003): FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52, pp. 151-160.
- PANDEY, K.K., NAGVENI, H.C. (2007): Rapid characterisation of brown and white rot degraded chir pine and rubberwood by FTIR spectroscopy. *Holz Roh Werkst.* 65, pp. 477-481.
- PARLAR, H. (2003): Isolierung und Anreicherung von Pilzenzymen mit isoelektrisch fokussierter, präparativer Zerschäumung zur verbesserten industriellen Nutzung ligninhaltiger Naturstoffe. Forschungsprojekt: TU München und TU Hannover, 2003 – 2006.
- POLLER, S., KLETZIN, J. (1990): *Holztechnologie* 31 (3), S. 117-119.
- POTTHAST, A (1998): Untersuchungen zum Laccase-Mediator-System. Dissertation an der Universität Dresden, Fakultät Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften.
- POTTHAST, A.; ROSENAU, T.; FISCHER, K. (2001): Oxidation of benzyl alcohols by the laccase-mediator system (LMS) – a comprehensive kinetic description. *Holzforschung* 55. pp. 47-56.
- RAVEN, P.H., RAY, P.H., CURTIS, H. (1988): *Biologie der Pflanzen*. Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York. S. 34-38.
- REINHAMMAR, B.; MALMSTRÖM, B.G. (1981): "Blue" copper-containing oxidases. In: SPIRO, T.G. (Hrsg.): *Copper proteins: Metall ions in biology*. New York: John Wiley and Sons, pp. 109-149.
- ROCHFORT, D., LEECH, D., BOURBONNAIS, R. (2004): Electron transfer mediator systems for bleaching of paper pulp. *Green Chem.* 6, pp. 14 – 24
- ROFFAEL, E. (1982): *Die Formaldehydabgabe von Spanplatten und anderer Werkstoffe*. DRW-Verlag, Stuttgart.
- RÖMPP (1997): *Chemielexikon von Hermann Römpp, Jürgen Falbe, und Manfred Regitz*, 10. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart.
- ROFFAEL, E., DIX, B., MIERTZSCH, H., SCHEITHAUER, M., KEHR, HOFRICHTER, E. (1993): Feuchtebeständigkeit und Hydrolyseeinsatz von Holz-zu-Holz-Bindungen in Spanplatten, hergestellt mit formaldehydarmen modifizierten Harnstoff-Formaldehyd-Harzen unter Einsatz verschiedener Härtungsbeschleunigersysteme, WKI Mitteilung 570/1993.
- ROFFAEL, E., DIX, B., SCHNEIDER, T. (2001): Thermomechanical (TMP) and Chemo-Thermomechanical Pulps (CTMP) for Medium Density Fiberboards (MDF). *Holzforschung* 55 (2), S. 214-218.

- ROFFAEL, E., SCHÄFER, M. (2002): Bedeutung der Extraktstoffe des Holzes in biologischer, chemischer und technologischer Hinsicht, Vorlesungsskript des Institutes für Holzbiologie und Holztechnologie, Georg-August-Universität.
- ROFFAEL, E., SCHNEIDER, T., KÖNIG, B., BEHN, C. (2004): Holzchemie & Holztechnologie. Vorlesungsskript des Institutes für Holzbiologie und Holztechnologie, Georg-August-Universität.
- ROTH, *Carl Roth Chemikalien* (2008): Produktpreisliste Frühjahr 2008. www.carl-roth.de, Datum: 12.01.2008.
- RUDMAN, P. (1965): The causes of natural durability in timber XVII. *Holzforschung* 19 (2): S. 57-58.
- RÜHL, M., KILARU, S., NAVARRO-GONZALES, M., HOEGGER, P.J., KHARAZIPOUR, A., KÜES, U. (2007 a): Production of Laccase and Other Enzymes for the Wood Industry. In KÜES, U. (Ed.): *Wood Production, Wood Technology, and Biotechnological Impacts*. Universitätsverlag Göttingen. Chapter 19, pp. 469-509.
- RÜHL, M., KILARU, S., MAJCHERCZYK, A., HOEGGER, P.J., NAVARRO-GONZALES, M., CHAISAENA, W., NAUMANN, A., PEDDIREDDI, S., MALIK, I., KÜES, U. (2007 b): Biotechnological research on basidiomycete fungi. In Kharazipour, A., Müller, C. und Schöpfer, C. (Herausgeber): *Review of Forests, Wood Products and Wood Biotechnology of Iran and Germany*, gebundene Ausgabe, Georg-August-Universität Göttingen.
- RUTIAGA-QUIÑONES, J.G. (2001): Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen. Dissertation. TU München. Buchverlag Gräfelting.
- SALAS, S.D.; BENNETT, J.E.; KWONG-CHUN, K.J.; PERFECT, J.R.; WILLIAMSON, P.R. (1996): Effect of the laccase gen, CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J.Exp. Med.* 184, pp. 377-386.
- SCHEEL, T.; HOLKER, U.; LUDWIG S.; HOFER, M. (1999): Evidence for and expression of a laccase gene in three basidiomycetes degrading humic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, pp. 66-69.
- SCHINDEL, K. (1999): Die Röntgenmikroanalyse von Lignin als Untersuchungsmethode für Holz und Holzwerkstoffe. Dissertation an der Forstwissenschaftlichen Fakultät der Georg-August-Universität.
- SCHMIDT, O. (1994): *Holz- und Baumpilze*. Springer. Berlin, Heidelberg
- SCHMITZ, C. (2005): Internationales Vertriebsmanagement für Industriegüter - Handlungsimplicationen aus dem Blickwinkel internationaler Tochtergesellschaften und Vertretungen, Dissertation an der Universität St. Gallen, Hochschule für Wirtschafts-, Rechts- und Sozialwissenschaften

- SCHÖPPER, C. (2006): Entwicklung eines naturnahen Bindemittels aus nachwachsenden Rohstoffen auf Proteinbasis zur Herstellung von Mitteldichten Faserplatten. Dissertation an der Forstwissenschaftlichen Fakultät der Georg-August-Universität.
- SEIFERT, K. (1968): Zur Systematik der Holzfäulen, ihre chemischen und physikalischen Kennzeichen. Holz Roh Werkst. 26, S. 208-215.
- SOARES, G.M.B.; DE AMORIM, M.T.P.; COSTA-FERREIRA, M. (2001): Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. J. Biotechnol. 89 (2-3), pp. 123-129.
- SHEKHOLESAMI, M. (1991): Optimierung der Enzymproduktion von Weißfäulepilzen für den Einsatz bei der Biotechnologischen Erzeugung von Bindemitteln. Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen
- SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG (2008): <http://www.wissenschaft-online.de>, aktuelle Mitteilungen, Statistiken. Datum: 22.02.2008.
- SUDIN, E.B., ROFFAEL, E. (1989): Einfluss der Alterung auf die Formaldehydemissionen von UF-Spanplatten mit niedrigen Formaldehydabgabepotential. Holz-Zentralblatt 115, 47, S 704.
- SZUTOWICZ, A., KOBES, R.D., ORSULAK, P.J. (1984): Anal. Biochem. 138, pp. 86-94.
- TAPPI Test Methods (1988): T204 om 88: Solvent extractives of wood
- TISSIERES, A. (1948): Nature 162. S. 340
- THOLE, V., MARUTZKY, R. (2006): Holzwerkstoffe und Klebstoffe – eine kurze Einführung in das Thema. VHI-Workshop „Leimbörse Kassel“, 16. und 17. Januar 2006, Kassel.
- THURSTON, C.F. (1994): The structure and function of fungal laccase. Microbiology 140, pp. 19-26.
- TRENDELENBURG, R., 1955: Das Holz als Rohstoff, Hansa Verlag, München
- TROJANOWSKI, A., MILSTEIN, O., MAJCHERCZYK, A., HAARS, A. HÜTTERMANN, A. (1987): Solubilization and polymerisation of lignin by several wood-inhabiting fungi. Lignin enzymic and microbial degradation, INRA (Ed.), Paris, pp. 223-229.
- TU FREIBERG (2006): Verarbeitung nachwachsender Rohstoffe, Vorlesungsskript 2006, <http://www.tu-freiberg.de>. Datum: 03.03.2008.
- VHI (2008): Verband der Holzwerkstoffindustrie e.V., <http://www.vhi.de>, aktuelle Mitteilungen, Statistiken. Datum: 15.02.2008.
- WAGNER, B. (1997): Untersuchungen zur Formaldehydabgabe von Holz und mit Aminoplastharz gebundenen Buchensperrholz. Dissertation an der forstwissenschaftlichen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen, S. 7-16.

- WERNER, Z., REY, H.-G., WIELINGER, H. (1970): Anal. Chem. 272, p. 224.
- WIDSTEN, P. (2002): Oxidation of Wood Fibers for the Manufacture of Medium-Density Fiberboards (MDF), Dissertation, Helsinki University of Technology Laboratory of Paper Technology, Reports, Series A 15, Espoo 2002.
- WIENHAUS, O.; KÜHNE, G.; PECINA, H.; SZOKA, G. (1978): Chemische Modifizierung von Holzpartikeln zwecks Eigenschaftsverbesserung von Werkstoffen aus Holz. Holzbiotechnologie 19 (4), S. 224-231.
- YAROLOV, A.I.; SKOROBOGATKO, O.V.; VARTANTOV, S.S.; VAROFLOMEYEV, S.D. (1994): Laccase: Properties, catalytic mechanism, and applicability. Appl. Biochem. Biotechnol. 49, pp. 257-280.
- YOSHIDA, H (1883): Zur Chemie des Urushi-Firniss. J. chem. Soc. 43, S. 472 – 486.
- ZOUARI, N.; ROMETTE, J.-L.; THOMAS, D. (1987): Purification and properties of two laccase isozymes produced by *Botrytis cinerea*. Appl. Biochem. Biotechnol. 15, pp. 213-225.

9. Anhang

9.1 Vergleich der mechanisch-technologischen Eigenschaften von Kontrollplatten und Laccase gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Rohdichten

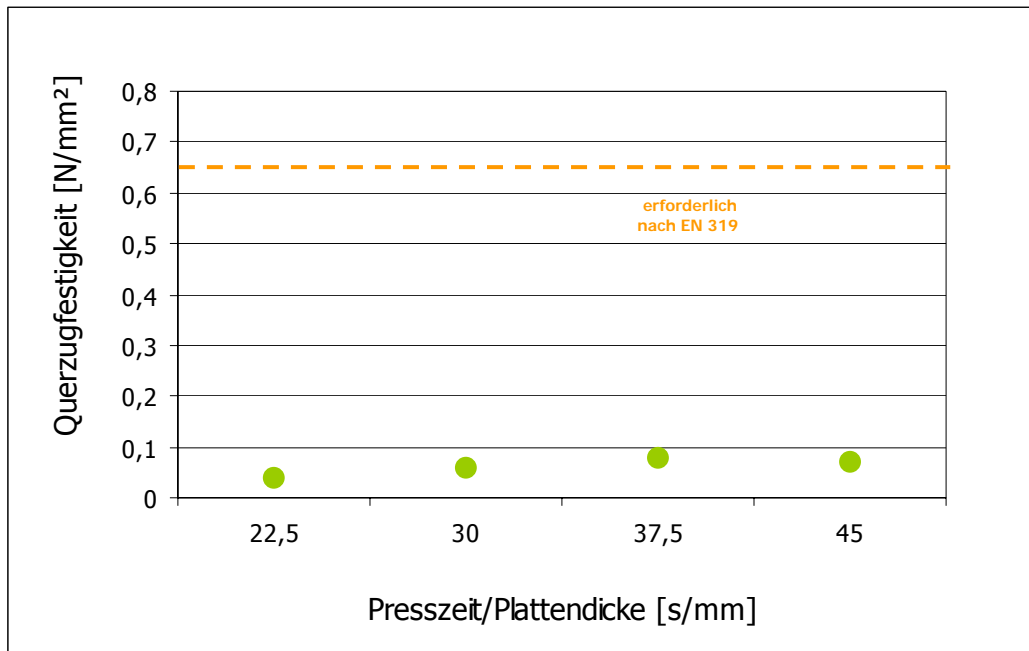
Anhang 1: Mechanisch-technologische Eigenschaften von 8mm starken Kontroll MDF-Platten, 5 Minuten Presszeit, 30 Min. Inkubation

Rohdichte [kg/m³]	600	700	800
Querzugfestigkeit [N/mm²]	0,04	0,06	0,09
Biegefestigkeit [N/mm²]	11,25	13,50	16,10
Dickenquellung [%]	134,00	121,25	112,30

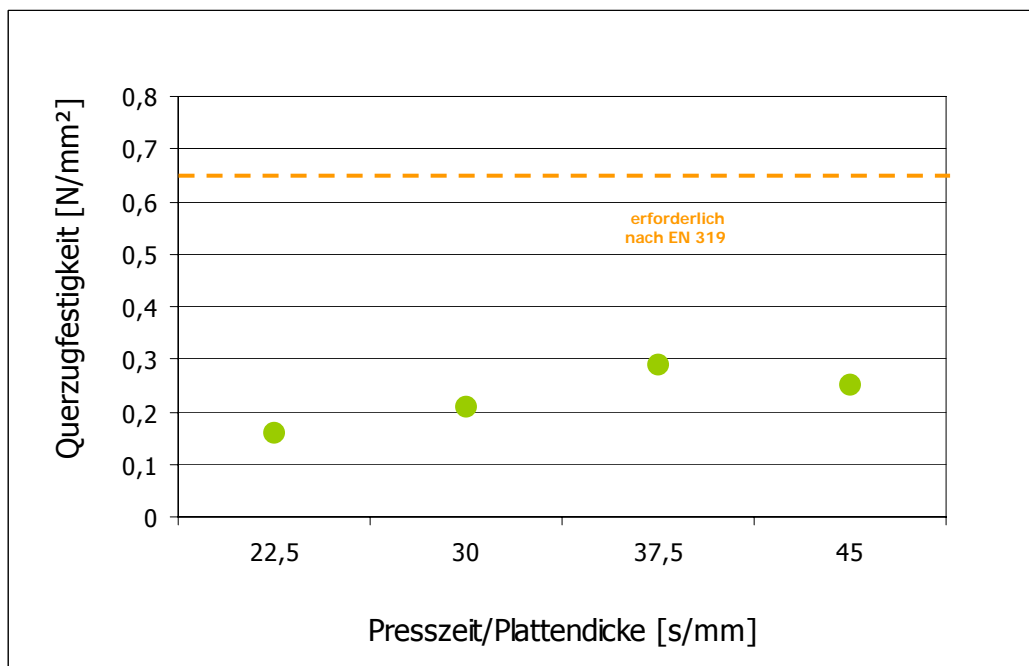
Anhang 2: Mechanisch-technologische Eigenschaften von 8mm starken Laccase gebundenen MDF-Platten (200 U/ml Laccase), 5 Minuten Presszeit, 30 Min. Inkubation

Rohdichte [kg/m³]	600	700	800
Querzugfestigkeit [N/mm²]	0,14	0,33	0,54
Biegefestigkeit [N/mm²]	16,74	19,29	31,30
Dickenquellung [%]	104,45	89,90	37,25

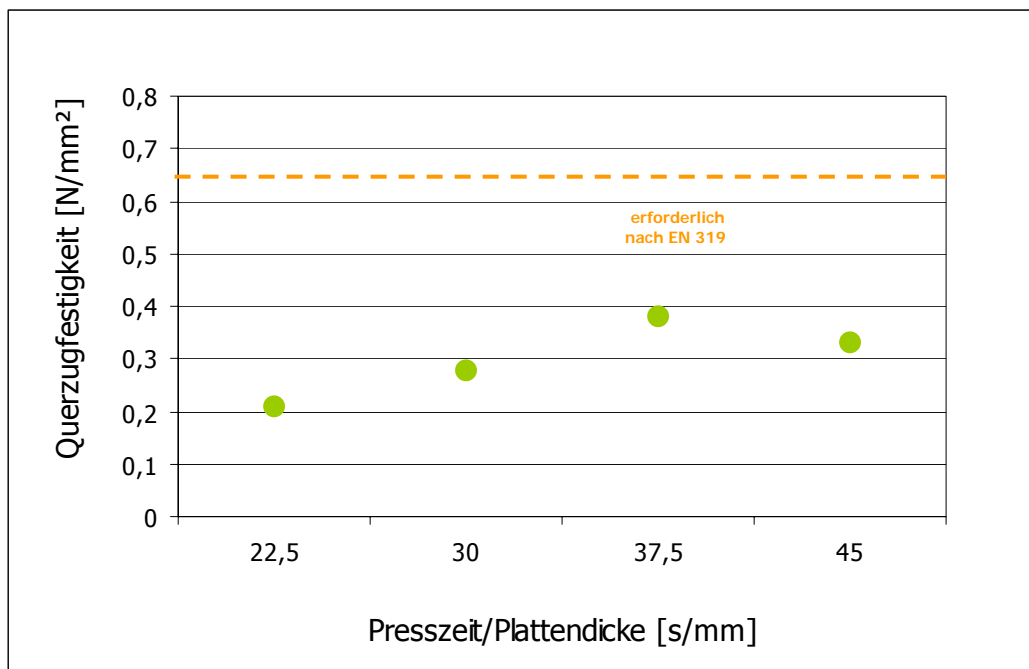
9.2 Weitere Querzugfestigkeiten in Abhängigkeit von der Presszeit



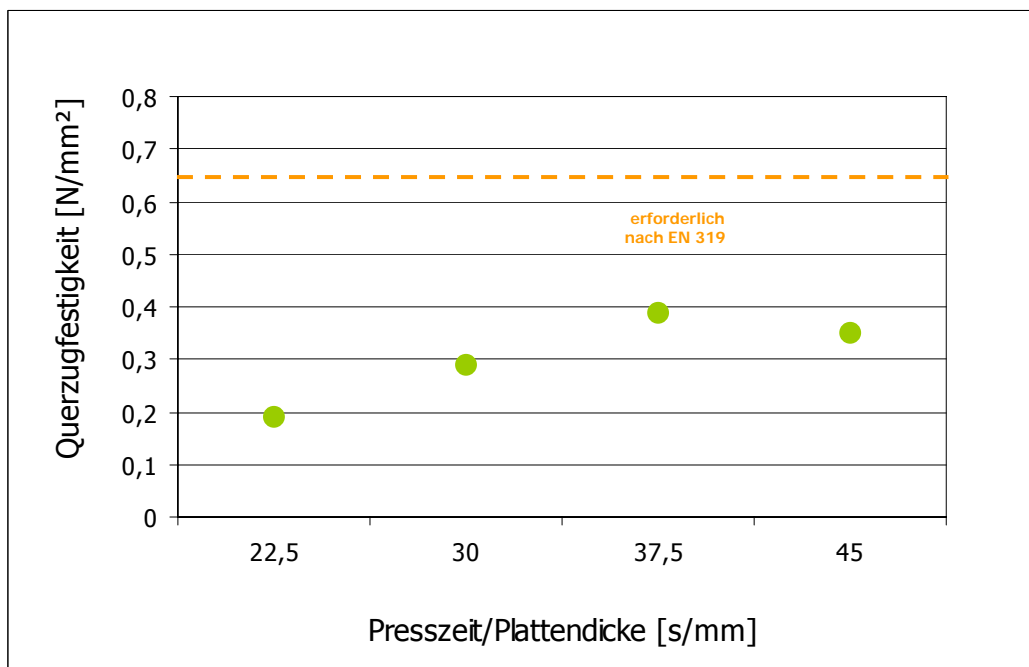
Anhang 3: Probe Kontrolle, Querzugfestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten



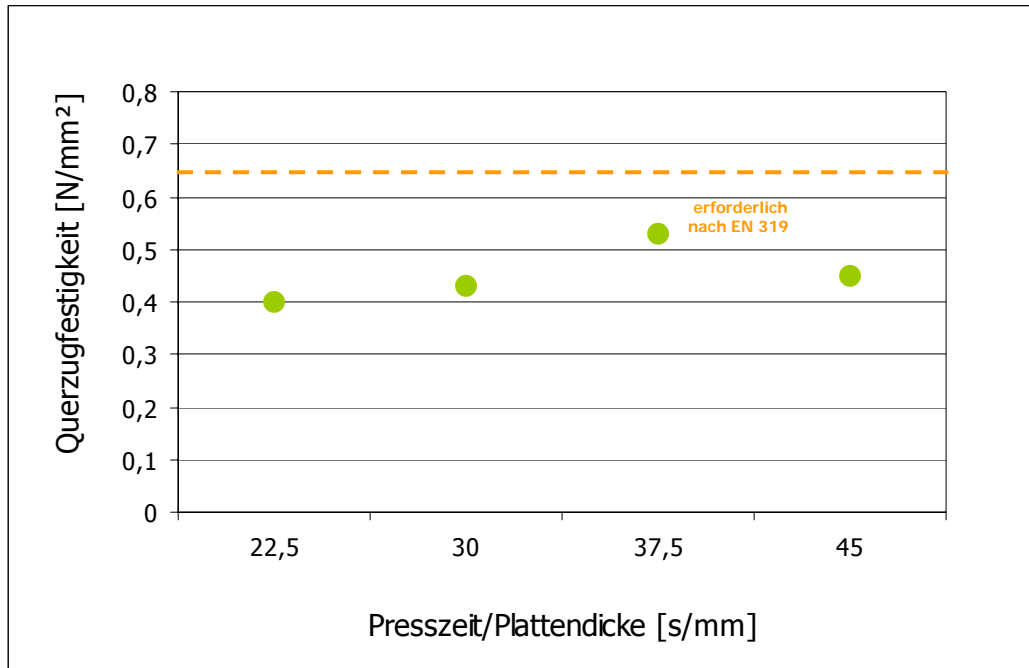
Anhang 4: Probe L100, Querzugfestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten



Anhang 5: Probe L100 + HBA 10, Querzugfestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten

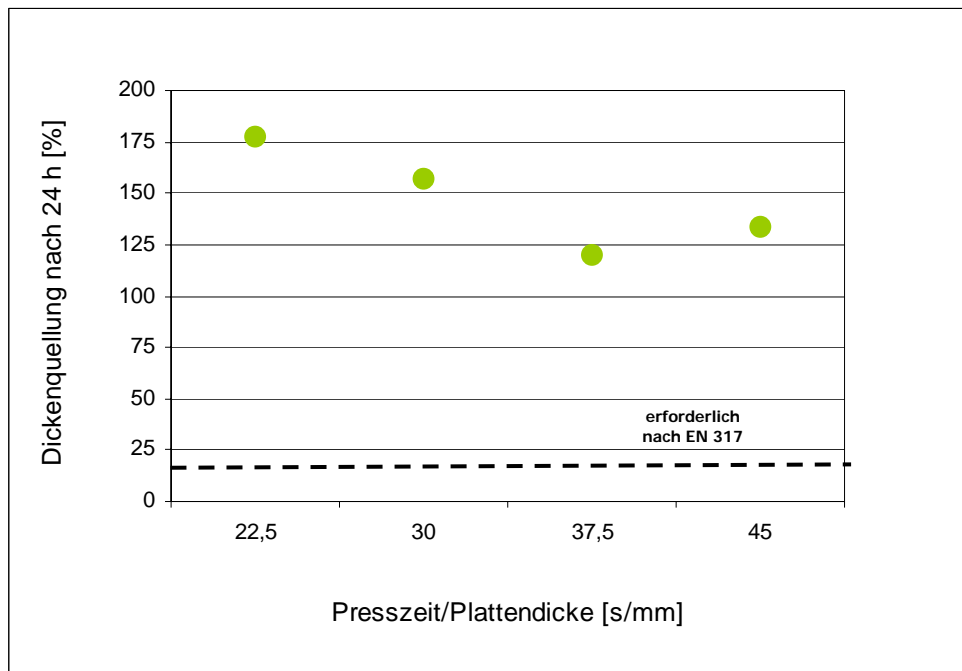


Anhang 6: Probe L100 + HBA 20, Querzugfestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten

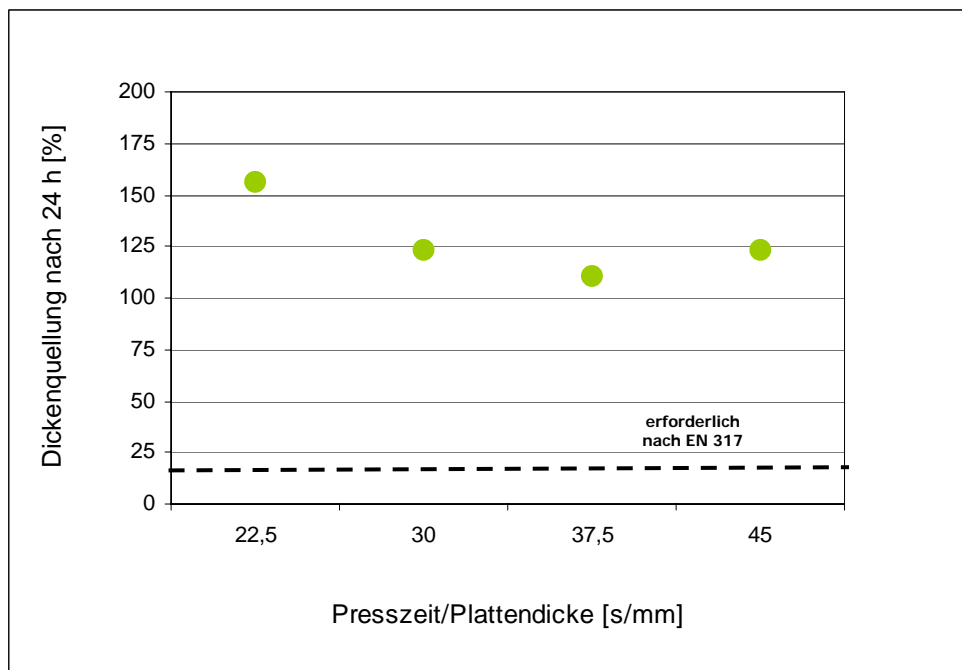


Anhang 7: Probe L200, Querzugfestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten

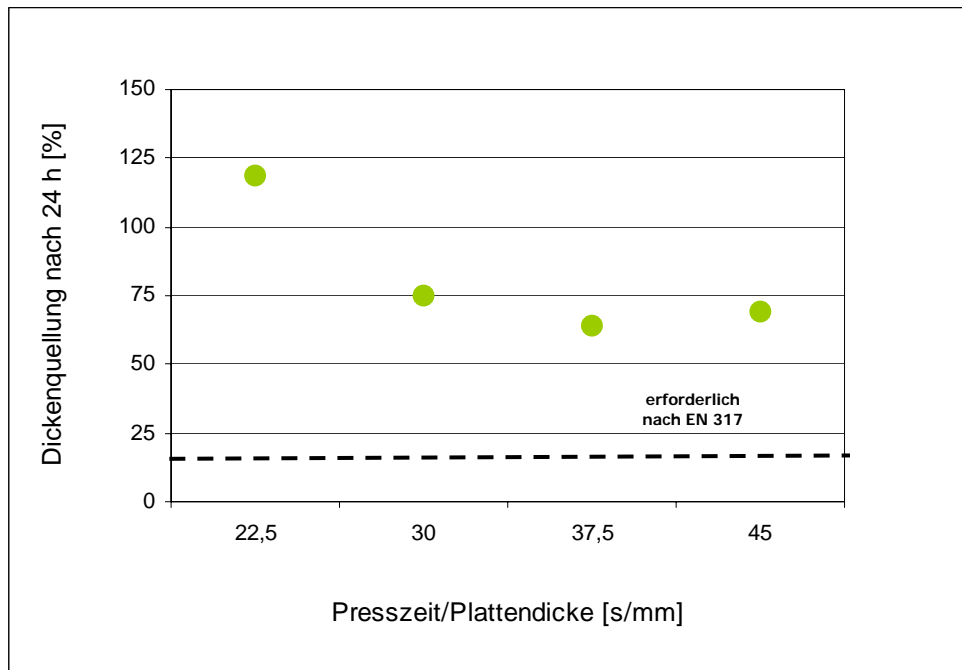
9.3 Weitere Dickenquellwerte nach 24 h Wasserlagerung in Abhängigkeit von der Presszeit



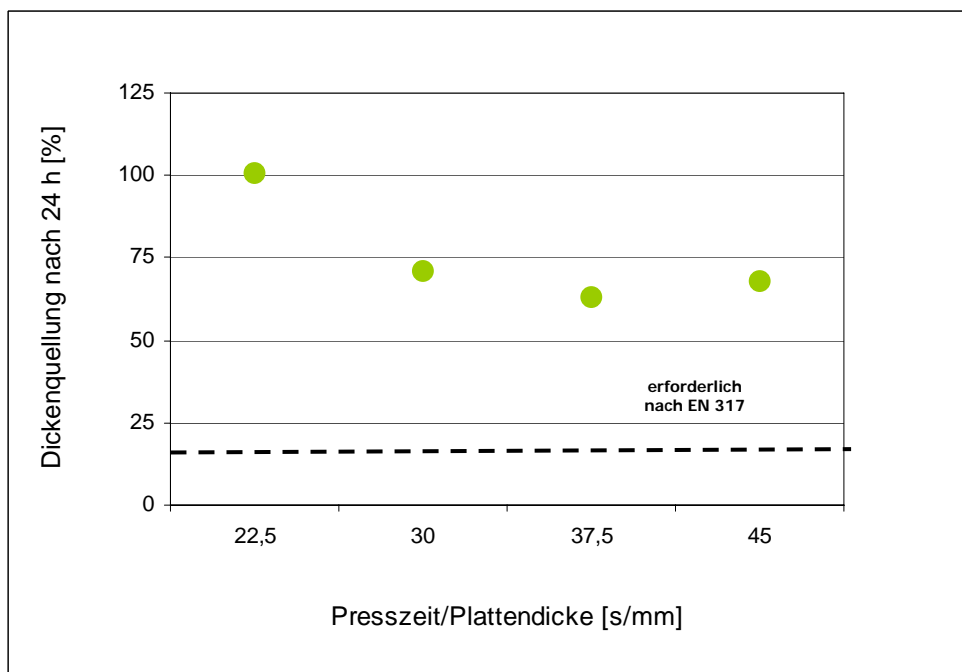
Anhang 8: Probe Kontrolle, Dickenquellung nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten



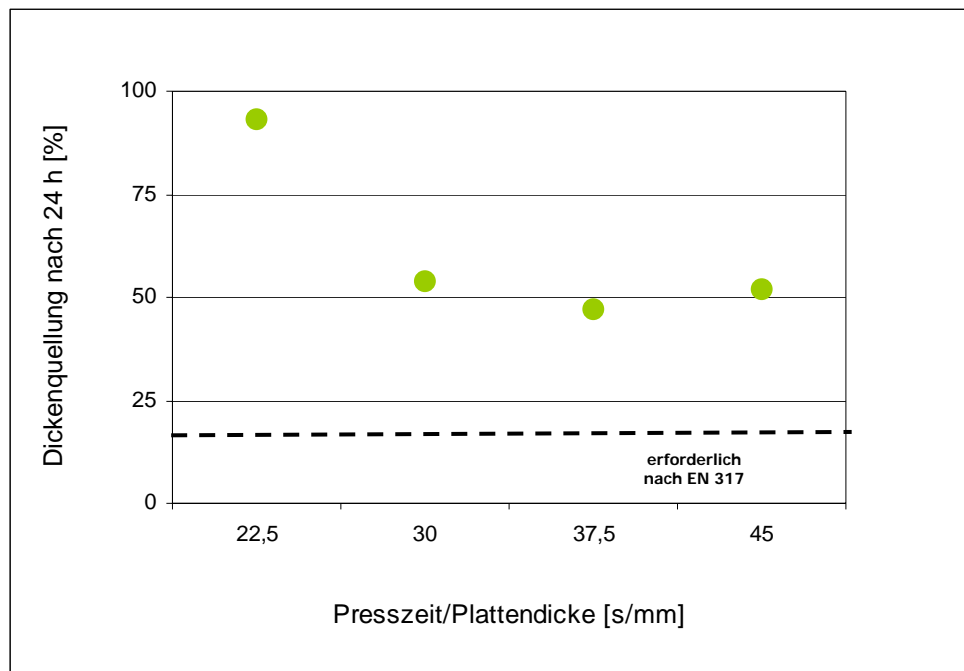
Anhang 9: Probe L 100, Dickenquellung nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten



Anhang 10: Probe L 100 + HBA 10, Dickenquellung nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten

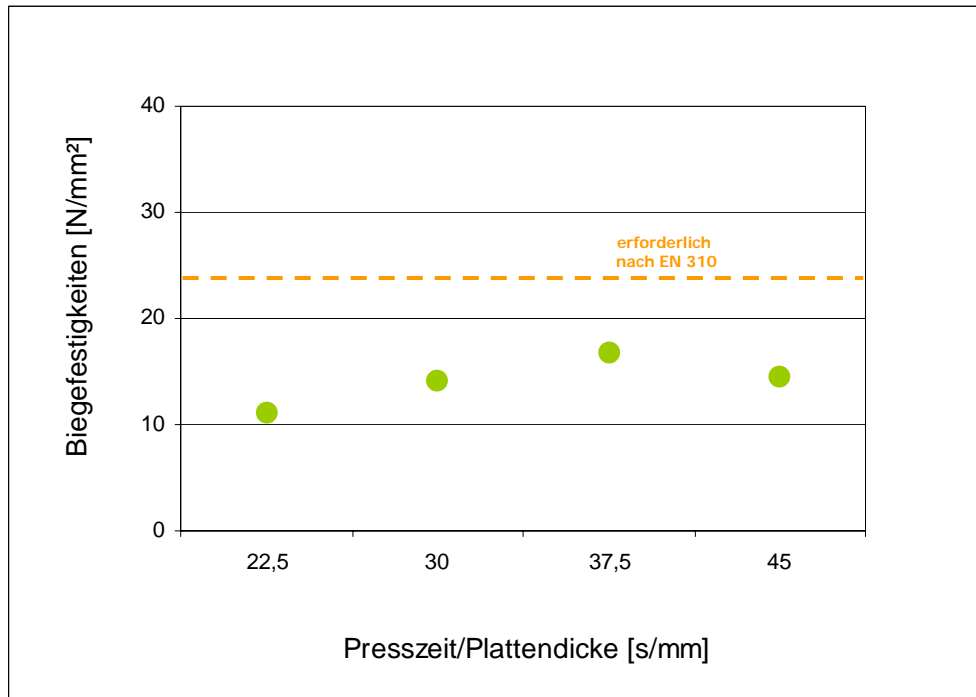


Anhang 11: Probe L 100 + HBA 20, Dickenquellung nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten

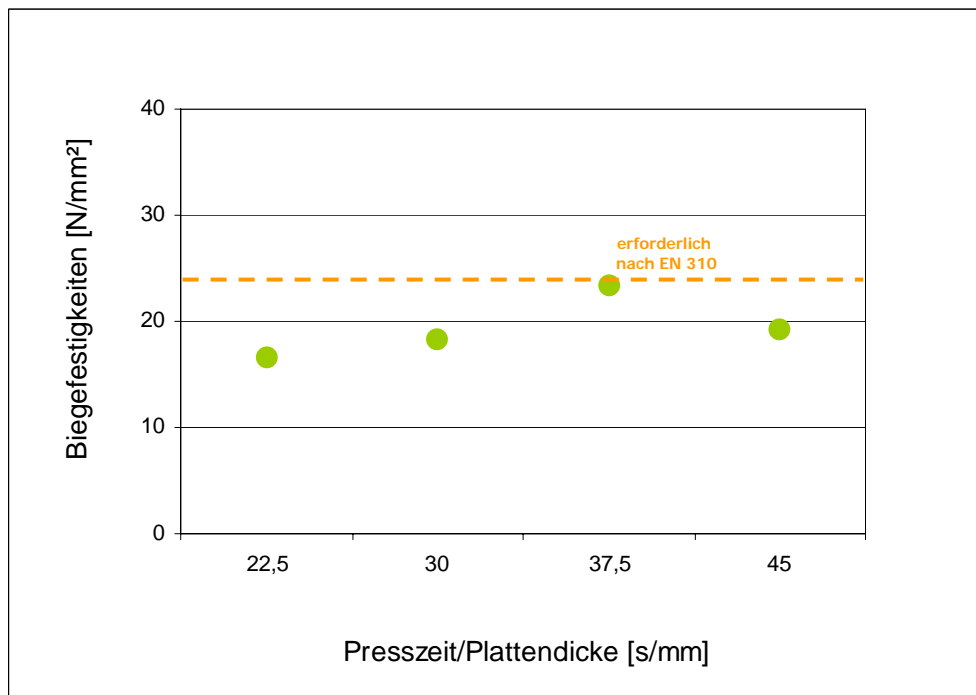


Anhang 12: Probe L 200, Dickenquellung nach 24 h Wasserlagerung von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten

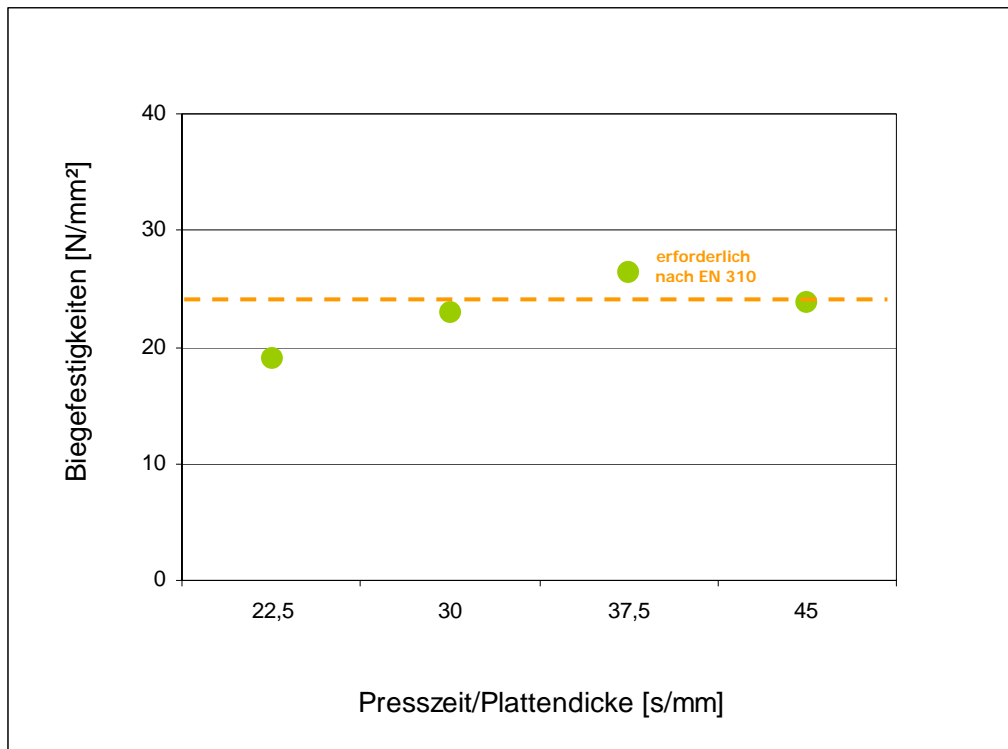
9.4 Weitere Biegefestigkeiten in Abhängigkeit von der Presszeit



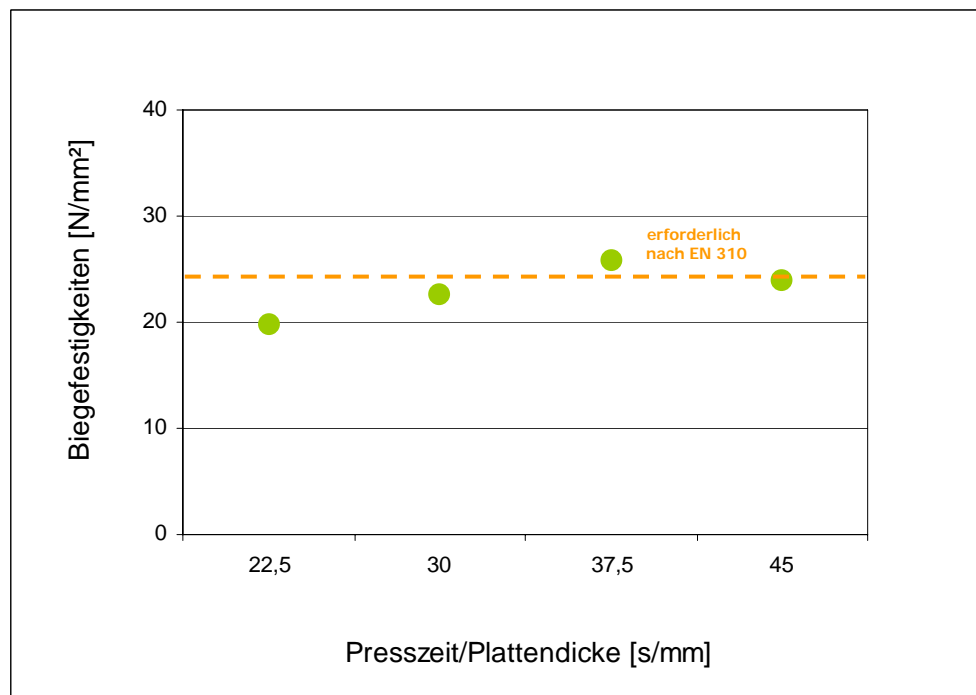
Anhang 13: Probe Kontrolle, Biegefestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten



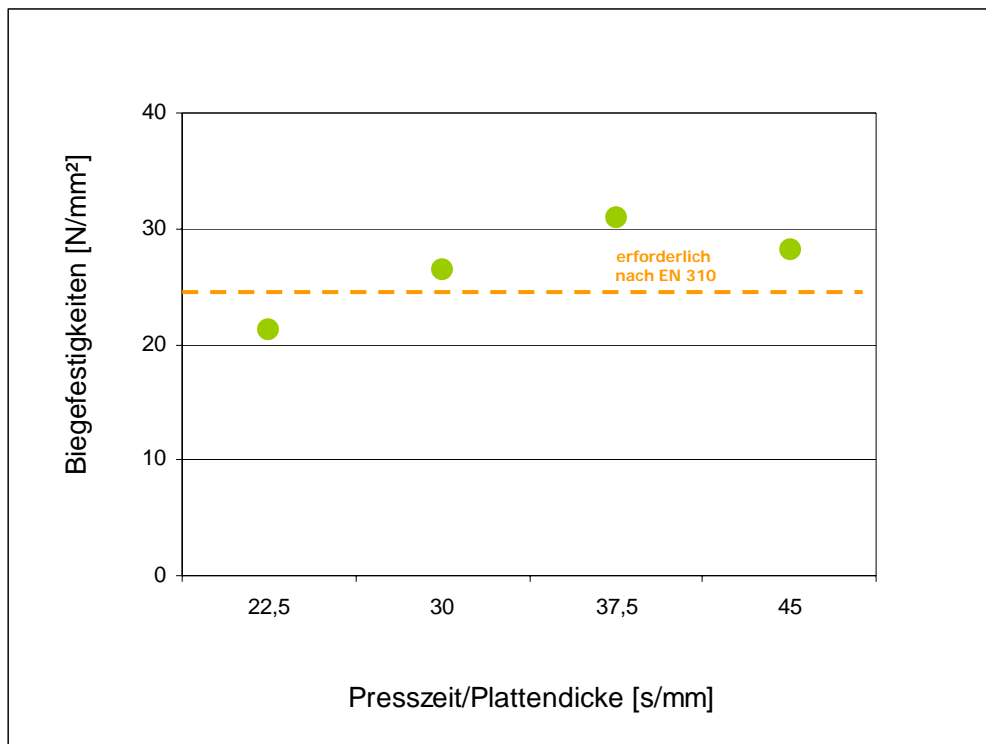
Anhang 14: Probe L 100, Biegefestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten



Anhang 15: Probe L 100 + HBA 10, Biegefestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten



Anhang 16: Probe L 100 + HBA 20, Biegefestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten



Anhang 17: Probe L 200, Biegefestigkeiten von 8 mm starken Laccase-Mediator gebundenen MDF-Platten bei unterschiedlichen Presszeiten

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Dissertation wurde in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

(Markus Euring)

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Markus Euring
Geburtsdaten: 12.08.1979 in Bad Hersfeld
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung/Studium

1986 – 1990 Grundschole Eiterfeld
1990 – 1999 Wigbert-Gymnasium Hünfeld
Abschluss: Abitur

2000 – 2005 Hochschulstudium an der Forstwissenschaftlichen
Fakultät der Technischen Universität München
Abschlüsse: Bachelor of Science (TUM) (2003)
Master of Science in Forst- und Holzwissenschaft
und Diplom-Forstingenieur (Uni) (2005)

2005 – 2008 Promotionsstudium an der Fakultät für Forstwissenschaften und
Waldökologie der Georg-August-Universität Göttingen

Wehrdienst

1999 – 2000 Grundwehrdienst im Wehrbereichskommando IV und
5. Panzerdivision, Mainz

Berufliche Erfahrungen

2000 (Mai bis September) Befristetes Angestelltenverhältnis Deutsche Post
2001 (August – September) Praktikum bei ASSIDOMÄN AB, Lycksele, Schweden(Lappland)
2003 (August) Praktikum bei Hessen Forst, Forstamt Schlitz
2004 (August – Oktober) Praktikum bei dem Forschungsinstitut CEAM an der Universität
Alicante Spanien
seit Juli 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Büsgen-Institut der
Georg-August-Universität Göttingen, Abteilung Molekulare
Holzbiotechnologie & Technische Mykologie,
Arbeitsgruppe Chemie & Verfahrenstechnik von Verbundwerkstoffen