



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

Vienna University of Technology

DIPLOMARBEIT

Biotechnologische Umsetzung von Lignosulfonat als Bitumenersatz

ausgeführt an den Instituten für
Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Techn. Biowissenschaften
und
Angewandte Synthesechemie
der Technischen Universität Wien

unter der Anleitung von
Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Ewald Srebotnik

von
Melina Riegler
Sonnleithnergasse 34/2/45, 1100 Wien

Wien, Juli 2014

Kurzfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Lignosulfonate biotechnologisch zu modifizieren, dass sie als Ersatz oder Beimengung zum herkömmlichen Bitumen in Frage kommen. Hierfür war eine Maßnahme das Magnesium-Lignosulfonat der Firma Lenzing, zunächst zu polymerisieren und die Struktur anschließend mit verschiedenen Analysemethoden darzustellen. Zuletzt wurde ein Ansatz überlegt, um das hydrophile Magnesium-Lignosulfonat zu hydrophobieren.

Bei der Verwendung von Laccase wurde ausgetestet, wie sich die Laccase- und Ligninkonzentration, das Vorhandensein von Citratpuffer und HBT-Mediator und die Reaktionszeit auf die Polymerisation auswirken. Ein deutlicher Anstieg der Molmasse wurde erreicht durch eine Ligninkonzentration von 10% und der Verzicht auf Mediator und Citratpuffer. Die ideale Versuchsdauer betrug 4 Stunden.

Bei den Versuchen mit Pilzen wurden eine Weißfäule (*Trametes pubescens*) und eine Braunfäule (*Gloeophyllum trabeum*) gewählt. Die Braunfäule eignete sich zur Polymerisierung von Lignosulfonat nicht, daher wurden alle weiteren Versuche mit der Weißfäule durchgeführt. Die idealen Parameter für die Polymerisierung waren eine Konzentration von 1% Lignosulfonat in stickstoffarmen Medium bei einer Bebrütung von 7 Tagen bei 28°C.

Anschließend wurde die Isolierung des Lignosulfonats mittels Membranfiltration durchgeführt, um seine chemischen Funktionalitäten wie Hydroxyl- und Sulfonsäuregruppen zu bestimmen, welche beide bei der Polymerisierung abnehmen. Weiters kamen auch FT-IR und STA Analysen zum Einsatz.

Bio-Grafting bedeutet, dass das Einbringen von funktionellen Gruppen mithilfe von Enzymen erreicht wird und wurde hier zur Hydrophobierung verwendet. Als hydrophobe Randgruppe wurde Nonivamid gewählt. Dieses war radioaktiv markiert, um die Bindung an das Ligninmolekül prüfen zu können.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	3
Problemstellung	8
1 Polymerisierung mit Laccase	9
1.1 Produktion und Isolierung des Laccase Enzyms	11
1.1.1 Messung der Laccaseaktivität.....	13
1.2 Versuche zur Polymerisierung mit Laccase	15
1.2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau	15
1.2.2 Analysemethode mittels GPC.....	16
1.2.3 Darstellung der idealen Zusammensetzung der Probe	18
1.2.4 Bestimmungen mit und ohne Mediator	19
1.2.5 Bestimmungen mit und ohne Citratpuffer	21
1.2.6 Bestimmung der idealen Laccasekonzentration	25
1.2.7 Bestimmung der idealen Lignosulfonatkonzentration.....	27
1.2.8 Bestimmung der idealen Reaktionszeit	29
2 Polymerisierung mit Pilzen	32
2.1 Einleitung	32
2.2 Durchführung der Pilzversuche	32
2.2.1 Herstellung der Kultur	32
2.2.2 Inkubation mit Lignin	33
2.3 Ergebnisse der Pilzversuche	34
2.3.1 Bestimmung des geeigneten Nährmediums	34
2.3.2 Bestimmung der idealen Reaktionszeit	36
2.3.3 Bestimmung der geeigneten Ligninkonzentration.....	38

3	Analytik	41
3.1	OH-Messung	41
3.2	SO ₃ -Titration	43
3.3	FT-IR Analyse	46
3.4	Simultane thermische Analyse (STA)	47
4	Hydrophobierung von Lignosulfonat	51
4.1	Durchführung der Hydrophobierung	52
4.2	Ergebnisse der Hydrophobierung	53
4.3	Interpretation der Ergebnisse	54
5	Zusammenfassung	56
	Chemikalienliste	60
	Material, Geräte	61
	Literaturverzeichnis	62

Einleitung

Bitumen

Die Knappheit an Erdöl zwingt die Menschheit immer mehr dazu, nach geeigneten Alternativen zu suchen. So ist auch die Idee hinter dieser Arbeit, einen Ersatzstoff für Bitumen zu finden, der sich aus nachwachsenden Rohstoffen auf biochemischem Wege gewinnen lässt. Wichtig ist dabei, dass Biobitumen die wesentlichen chemischen, physikalischen und rheologischen Eigenschaften von herkömmlichen Bitumen erbringt.

Bitumen ist ein Produkt der Erdölindustrie und wird aus Rohöl durch Vakuumdestillation gewonnen. Je nach Herstellungsverfahren unterscheidet man Destillationsbitumen, Hochvakuumbitumen, Oxidationsbitumen oder Polymerbitumen. Es kommt jedoch auch in Form von Asphalten und Asphaltgesteinen in der Natur vor, die sich über große Zeiträume hinweg durch das Verdunsten der flüchtigen Anteile aus Erdöl gebildet haben. Der größte Teil des heutzutage verwendeten Bitumens entsteht jedoch bei der Mineralölverarbeitung.¹

Bitumen setzt sich zusammen aus einem Gemisch aus hochmolekularen Kohlenwasserstoffen mit thermoplastischen Eigenschaften. Man spricht auch von einem kolloiden System, in dem in einer öligen Grundphase eine disperse Phase enthalten ist. Die Malte bilden die ölige Grundphase, die Asphaltene die disperse Phase.² Die Asphaltene sind dunkle harz- bis kohleartige Teilchen mit Molekulargewichten von 250 bis ca. 2000g/mol. Sie verleihen dem Bitumen kohäsive und adhäsive Eigenschaften, wodurch zum Beispiel die Standfestigkeit des Asphalts gewährleistet wird. Von ihrer chemischen Struktur sind die Asphaltene eine Mischung aus Paraffinen, kondensierte Ringverbindungen und aromatischer Kohlenwasserstoffe.³

Das Materialverhalten von Bitumen ist abhängig von der Umgebungstemperatur. Deshalb wird es auch als elastoviskoser Stoff bezeichnet. Weitere wichtige Eigenschaften

sind die klebrige und abdichtende Wirkung, sowie, dass Bitumen nicht flüchtig ist. Dadurch, dass Bitumen praktisch wasserunlöslich ist, wird es auch eingesetzt, um empfindliche Bauteile von Wasser zu schützen.⁴

Verwendung findet Bitumen hauptsächlich als Bindemittel im Straßenbau, aber auch als Schutzanstrich oder Lack, bzw. für Abdichtungen in der Bauindustrie.⁵

Lignin

Der Name Lignin stammt von *lignum* (lateinisch für Holz) ab. Neben Cellulose und Hemicellulose ist Lignin einer der Hauptbestandteile in Pflanzen. Der Gehalt kann recht unterschiedlich sein und reicht von ca. 18-25% in Harthölzern bis zu ca. 27%-33% in Nadelhölzern. In Gräsern liegt der Ligningehalt wie in etwa bei Harthölzern.^{6,7} Nicht anzutreffen ist Lignin in Algen, Moos und Flechten.⁸

Eine der wichtigsten Funktionen von Lignin ist der Schutz der Pflanze vor schädlichen Mikroorganismen. Dies geschieht durch Eindringen von Enzymen in die Zellwände, die dem Angriff durch Mikroorganismen entgegenwirken. Weiters verleiht es Pflanzen die notwendige Stabilität und Steifigkeit. Lignin hat also die Aufgabe, gemeinsam mit Hemicellulose als stabilisierende Verbindung zwischen den Zellen zu wirken. Durch seinen lipophilen Charakter verringert Lignin das Eindringen von Wasser in Cellulose und Hemicellulosezellen. Somit wird sichergestellt, dass der Transport der wässrigen Lösungen von Nährstoffen und Metaboliten im durchlässigen verholzten Anteil vor sich geht.⁹ Durch die amorphe Struktur des Polymers ist es in der Lage, die Räume zwischen den Polysacchariden auszufüllen und so eine sehr kompakte Zellwand entsteht. Zusätzlich geht Lignin kovalente Bindungen mit Polysacchariden ein. Dies verhindert das Quellvermögen in der Gegenwart von Wasser.¹⁰

Lignin wird über dehydrierende Polymerisation aus 3 verschiedenen Phenylpropanderivaten gebildet: Coumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol. Ihre Strukturen sind in Abbildung 1 dargestellt. Die ungeordnete Polymerisation durch Rekombination von Phenoxylradikalen ist der Grund, warum Lignin im Vergleich zu anderen natürlichen Polymeren keine einheitliche Struktur besitzt.¹¹

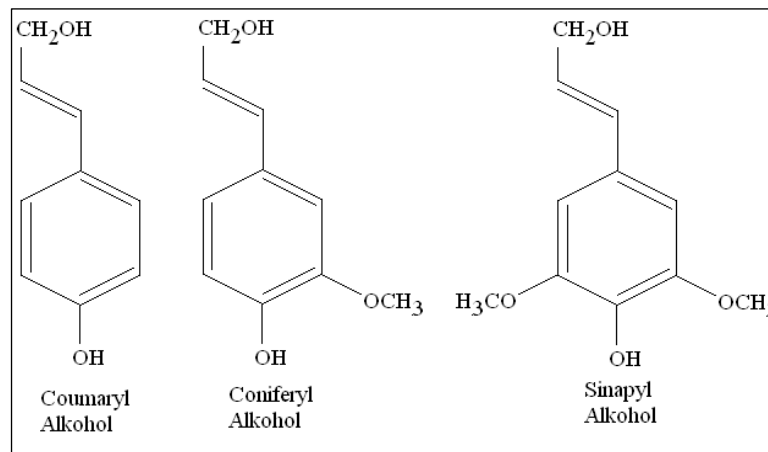


Abbildung 1: Monomere Lignin-Vorstufen

Lignin fällt in großen Mengen als Abfallprodukt bei der Papier- und Zellstoffherstellung an. Für deren Gewinnung muss zunächst aus der Lignocellulose das Lignin herausgelöst und in Folge aus dem Prozess entfernt werden. Es gibt unterschiedliche Verfahren für den Celluloseaufschluss. Das Sulfatverfahren und das Sulfitverfahren sind die am häufigsten angewendeten Methoden.¹²

Das Sulfatverfahren wird auch oft als Kraft-Verfahren bezeichnet, diese Art von Aufschluss erfolgt in etwa 80% aller Papier- und Zellstoffherstellungsanlagen. Der Ligninabbau wird durch den Einsatz von Natriumsulfid und Natriumhydroxid in einem basischen Milieu bei einem pH-Wert von etwa 13 durchgeführt. Der Mechanismus des Kraft-Prozesses ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Temperatur bei der dieser Prozess abläuft beträgt etwa 170°C , der Aufschluss dauert etwa 2 Stunden. Nachdem auch Cellulose und Hemicellulose durch diese Ionen angegriffen werden, kommt es nur zu einem Teilaufschluss.¹¹

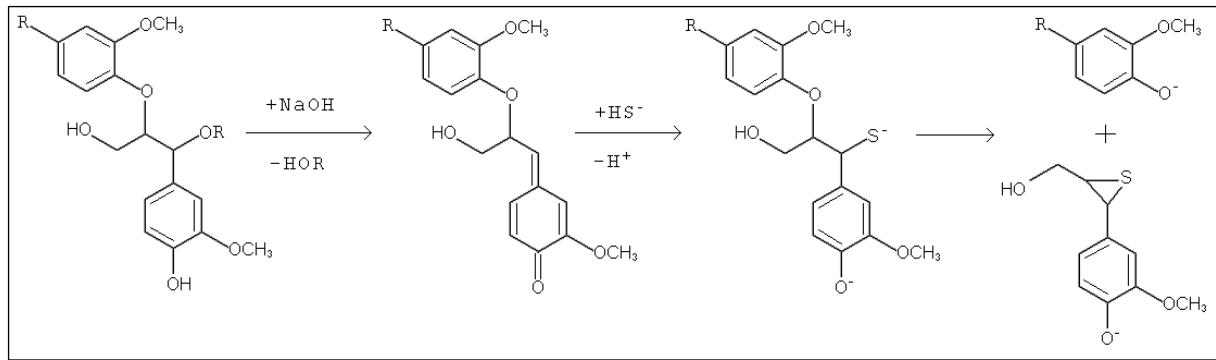


Abbildung 2: Mechanismus des Kraft-Prozesses ¹³

Beim Sulfitverfahren erfolgt der Ligninabbau durch eine Sulfonierung. Die Reaktion wird mit Calcium- oder Magnesiumsulfat bei einer Temperatur von 125 bis 150°C durchgeführt. Die Reaktionsdauer beträgt 3 bis 7 Stunden. Die drei Hauptreaktionen sind Sulfonierung, Hydrolyse und Kondensation. Das Umsetzungsprodukt von Lignin mit schwefeliger Säure ergibt Ligninsulfonsäure. Durch das Einführen der Sulfonsäuregruppen wird Lignin wasserlöslich. Einige wichtige funktionelle Gruppen eines Lignosulfonsäuremoleküls sind verschiedenartige anionische Gruppen, phenolische Hydroxylgruppen, Carboxylgruppen und verschiedene Schwefel beinhaltende Gruppen. Abbildung 3 stellt den Ablauf des Aufschlusses nach dem Sulfitverfahren dar. ¹⁴

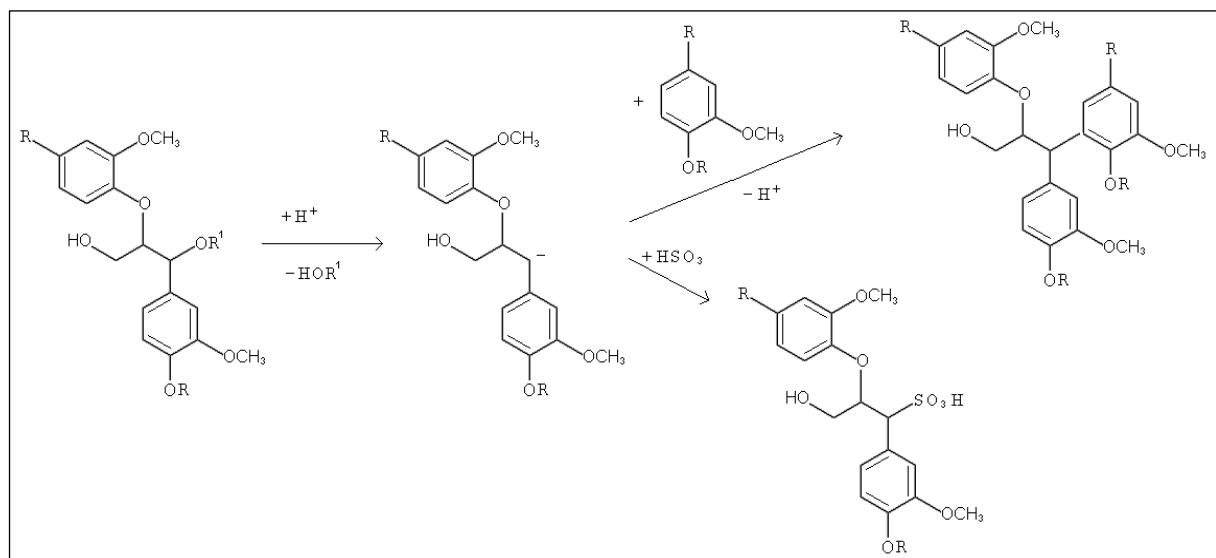


Abbildung 3: Mechanismus des Sulfitverfahrens

Aus der Ablauge des Kraft-Prozesses und des Sulfitverfahrens lassen sich die eingesetzten Chemikalien weitgehend wieder zurückgewinnen. Das überbleibende Kraft-Lignin und die Lignosulfonsäure können energetisch genutzt werden, indem sie als Verbrennungswärme in den Prozess zurückgeführt werden. Will man hingegen die Ligninablauge anderweitig verwenden, ergibt sich das Problem, dass diese relativ stark verunreinigt ist und der Schwefelgehalt sehr hoch liegt. Dadurch ist sie nur für Anwendungen, wie zum Beispiel als Komponente in Klebstoffen oder als Dispergiermittel in Beton oder Zement direkt einsetzbar.¹⁵

Jedoch lässt sich nach Modifikation mit Enzymen eine Vielzahl von neuen Anwendungsgebieten erschließen. Es kann in seiner modifizierten Form als Schutzanstrich und zur Beschichtung verwendet werden. Weiters ist eine Verwendung als Bindemittel für Holz möglich.¹⁶

Für die im Folgenden beschriebenen Versuche stand das Magnesiumlignosulfonat der Firma Lenzing zur Verfügung. Dieses wurde durch Sulfitaufschluss von der Cellulose getrennt. Über das detaillierte Verfahren und weitere Methoden (Aufkonzentrierung, Rückgewinnung von Chemikalien aus der Abfalllauge,...) liegen keine Informationen vor.

Problemstellung

Ziel dieser Arbeit ist, die Eigenschaften des nachwachsenden Rohstoffes Lignin, eines Abfallproduktes der Papierindustrie, derart zu modifizieren, dass es als Ersatz von Bitumen im Straßenbau verwendet werden kann.

Bitumen besteht aus hochmolekularen Kohlenwasserstoffen und enthält nur zu geringen Anteilen Schwefel, Sauerstoff und Stickstoff. Um bei Lignin höhere Molekulargewichte zu erreichen wird es polymerisiert. Dabei werden auch Hydroxyl- und Säuregruppen abgebaut.

Für die Polymerisierung werden zwei verschiedene biochemische Wege verglichen, einerseits die Modifizierung mit dem Enzym Laccase und andererseits mit zwei verschiedenen Pilzen (*Trametes pubescens* und *Gloephyllum trabeum*). Es soll herausgefunden werden, welche Versuchsparameter die besten Ergebnisse hinsichtlich der Polymerisierung liefern. Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgt anhand von GPC Messungen.

Zu weiteren Charakterisierung der polymerisierten Lignine wird der Anteil an Hydroxylgruppen mit Hilfe von Reaktion mit dem Pholin-Ciocalteus Reagens und die Säuregruppen (Sulfonsäure- und Carbonsäuregruppen) durch konduktometrische Titration bestimmt. Weiters werden FT-IR und STA Messungen durchgeführt.

Zum Abschluss der Arbeit werden Versuchsansätze überlegt, um dem von Natur aus hydrophilen Lignosulfonat, hydrophobe Eigenschaften zu verleihen. Hierbei werden funktionelle Gruppen von Nonivamid mithilfe der oxidativen Wirkung von Enzymen auf das Ligninmolekül aufgebracht werden. Dieser Vorgang nennt sich Bio-Grafting. Um den Erfolg der Reaktion genauer zu beobachten wird radioaktiv markiertes Nonivamid eingesetzt.

1 Polymerisierung mit Laccase

Laccasen werden in Pflanzen, Pilzen, Bakterien und Insekten produziert. Sie können sowohl in den Zellen als auch extrazellulär nachgewiesen werden. Viele Pilze produzieren mehrere Formen von Laccase, sie sind zum Teil ähnlich aufgebaut, aber können sich auch stark in ihren Eigenschaften und Strukturen unterscheiden. Hauptsächlich kommen sie als Monomere vor und haben Molekulargewichte zwischen 60 und 80 kD.¹⁷

Laccasen zählen zu den Multikupferoxidasen, in ihrem katalytischen Zentrum befinden sich 4 Kupferionen. In Abbildung 4 ist das katalytische Zentrum eines Laccase Enzyms zu sehen. Dargestellt sind das Typ-1-Kupfer (T1) und das trinukleare Zentrum, das von Typ-2-Kupfer(T2) und Typ-3-Kupfer (T3) gebildet wird.¹⁸

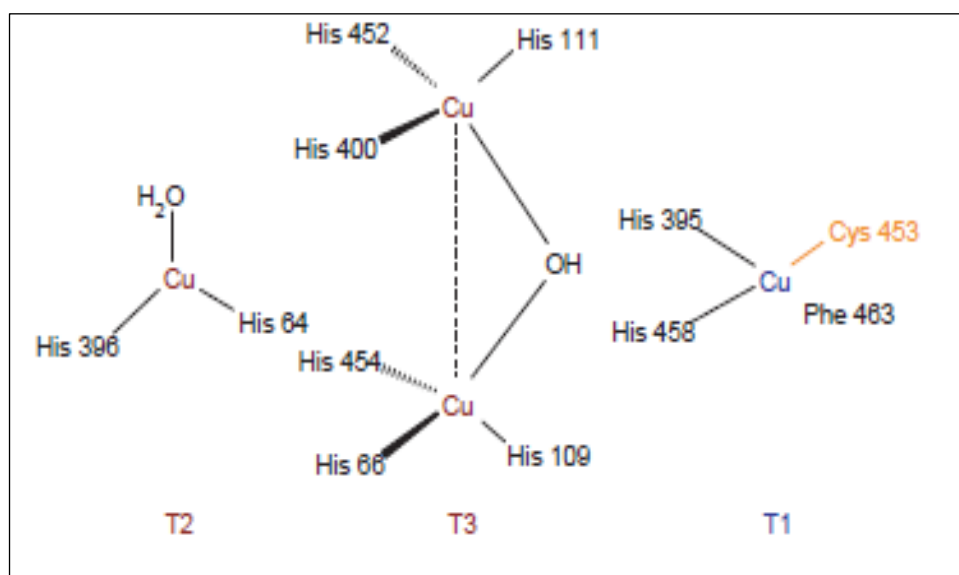


Abbildung 4: katalytisches Zentrum eines Laccase Enzyms

Durch das katalytische Zentrum sind Laccasen in der Lage Sauerstoff zu Wasser zu reduzieren und parallel dazu ein Elektron von einer phenolischen Komponente zu entfernen, sodass ein Phenoxyradikal entsteht. Das freie Elektron wird durch das Typ-1-Kupfer (T1) auf das trinukleare Cluster transferiert und löst dort die Reduktion des dort bindenden Sauerstoffs aus.

Da Laccase Enzyme relativ große Moleküle sind, können sie zum Beispiel nicht durch Zellwände hindurch dringen. Somit ist ihr Oxidationspotential niedriger. Das macht den Einsatz von Mediatoren nötig. Diese sind kleine diffusionsfähige Moleküle die durch die Laccase oxidiert werden und somit das Substrat angreifen können. Redoxmediatoren dienen somit als Elektronenüberträger zwischen dem katalytischen Zentrum und der zu oxidierenden Verbindung. Der Mechanismus ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.¹⁹

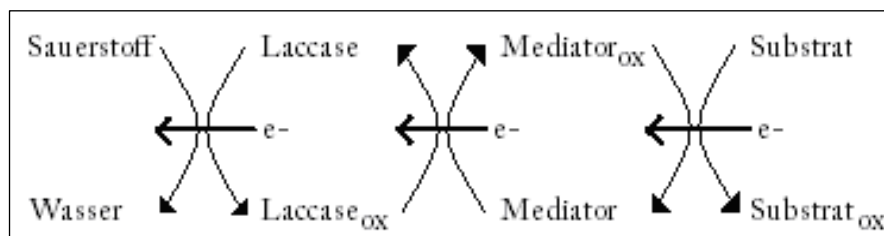


Abbildung 5: Funktionsweise von Mediatoren²⁰

Verbindungen wie Phenole, 3-Hydroxyanthranilat, 4-Hydroxybenzoesäure, 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS)²¹ und 1-Hydroxybenzotriazol (HBT)²² sind als Mediator geeignet.

Industriell kommen Laccasen bei der Bleichung in der Papierindustrie oder auch von Textilien zum Einsatz. Weiters kann man sie auch bei der Sanierung von verschmutzten Gewässern verwenden.²³

1.1 Produktion und Isolierung des Laccase Enzyms

Zur Produktion der Laccase für die anschließenden Abbauprobungen wird der Pilzstamm *Trametes pubescens* (MB89) CBS 696.94 verwendet. Die Zusammensetzung des Mediums für den Pilz ist in Tabelle 1 aufgelistet.²⁴ Als Stickstoffquelle werden 2 Peptone ausgetestet die auf unterschiedliche Arten gewonnen wurden. Pepton Nr.7014 aus der Pepsin Verdauung und Pepton Nr.82962 aus der enzymatischen Verdauung von Fleisch. Ihre Unterschiede in der Zusammensetzung sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mediums für die Laccaseproduktion

	Konzentration
Glucose	40 g/l
Pepton aus Fleischextrakten	10 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g/l
H ₃ PO ₄ 85%	1 ml/l

Tabelle 2: Vergleich der unterschiedlichen Peptonquellen

	Pepton Nr.70174	Pepton Nr.82962
Stickstoffgehalt	>10%	~16%
Aminostickstoff	>3%	~0,2%
Gewichtsverlust bei Trocknung	<6%	<6%
pH (in 2% Wasser)	7,0±0,5	5,5±0,5
Trockenrückstand	<12%	-
Aschegehalt	-	<6%

Zunächst wird ausgetestet, ob sich die unterschiedlichen Peptonarten auf die Laccaseproduktion auswirken und deren Ausbeute beeinflussen. Hierzu werden je 3 l

Medium mit Pepton Nr.70174 und 3 l Medium mit Pepton Nr.82962 hergestellt in Konzentrationen, die aus Tabelle 1 zu entnehmen sind. Der pH-Wert der Medien wird durch Zugabe von Kaliumhydroxid auf pH 5 gestellt.

Anschließend erfolgt die Aufteilung von je 300 ml der Lösungen in 1 l Erlenmeyerkolben mit Strombrechern. Danach wird das Medium im Autoklaven für 20 Minuten bei 1 bar und 120°C sterilisiert.

Die Pilzsuspension wird aus einer mit Pilz bewachsenen Malzextrakt-Agar-Platte (Durchmesser 10 cm), die mit 100 ml sterilem Wasser im Sterilmixer homogenisiert wird hergestellt. Zu je 300 ml Medium wird 10 ml Pilzsuspension hinzugefügt. Kultiviert werden die Pilzkulturen im Medium für 4 Tage bei ca. 28°C auf dem Schüttler mit einer Frequenz von 110 rpm.

Nach dem vierten Tag erfolgt die Induktion mit einer 0,2 M Kupfersulfatlösung, welche bis zum vollständigen Auflösen für 15 Minuten in das Ultraschallbad gestellt und anschließend im Autoklaven für 20 Minuten bei einem Druck von 1 bar und einer Temperatur von 120°C sterilisiert wird. Es erfolgt die Zugabe von 3 ml Kupfersulfatlösung zu jedem Erlenmeyerkolben, um eine Endkonzentration von 2 mM zu erreichen.²⁴

Die Beobachtungen der Kolben nach bereits 6 Tagen Reaktionszeit ergeben unterschiedliche Färbungen der Medien durch unterschiedliche Peptonquellen. Im Fall vom Medium mit Pepton Nr.70174 ist die Nährlösung dunkelbraun gefärbt und es lässt sich ein größeres Pilzgranulat feststellen, als im Mediums mit Pepton Nr. 82962 (helles grünliches Aussehen).

Nach 22 Tagen Kultivierung wird mit der Isolation und Aufkonzentrierung der Laccase begonnen. Hierzu wird das Pilzgranulat abfiltriert, übrig bleiben 2440 g Filtrat bei der Verwendung des Mediums mit Pepton Nr. 70174 und 2400 g Ausbeute bei der anderen Peptonsorte. Diese Lösungen werden für 3 Tage im Tiefkühler bei -20°C aufbewahrt.

Anschließend werden die aufgetauten Lösungen bei Raumtemperatur (22°C) und 10000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert, um die ausgeflockten Begleitstoffe abzutrennen. Zur weiteren Reinigung werden die verdünnten Laccaselösungen mittels

Membranfiltration aufkonzentriert und entsalzt. Hierzu wird eine Filtrationsmembran von PALL Centramate mit 10 kD Porengröße verwendet und bei einem Transmembrandruck von 2 bar filtriert. Die Lösungen werden bis ca. 100 ml aufkonzentriert und das Retentat (=aufkonzentrierte Laccase) nochmals zur Reinigung mit 1 l dest. Wasser aufgefüllt und wiederum auf dieselbe Menge eingengt. Dadurch erfolgt die Entfernung von niedermolekularen Stoffen, wie beispielsweise Stoffwechselprodukten des Pilzes.

Für einen Tag werden diese Lösungen wieder im Tiefkühler gelagert und dann wieder die Laccaselösung durch zentrifugieren und abdekantieren vom Niederschlag getrennt. Nachdem kaum noch Niederschlag vorhanden ist, wird der Prozess des Aufkonzentrierens und der Reinigung beendet und die Laccaselösungen sind somit fertig zum Einsatz für die in 1.2 beschriebenen Abbauprobversuche.

1.1.1 Messung der Laccaseaktivität

Die Messung der Laccaseaktivität erfolgt durch Herstellung der in Tabelle 3 beschriebenen Standardlösung. Die dort angeführten Reagenzien werden bis auf Laccase in einer 0,5cm Küvette zusammengemischt. Zuletzt wird 0,1 ml Laccase hinzugefügt und somit die Reaktion der Laccase mit ABTS gestartet.²⁴

Tabelle 3: Standardlösung zur Aktivitätsbestimmung der Laccase

	Konzentration [ml]
dest. Wasser	0,3
100mM Citratpuffer	0,5
4mM Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS)	0,1
Laccase	0,1

Das Laccaseenzym wurde zuvor passend verdünnt, sodass der gemessene Wert für die Aktivität ungefähr zwischen 0,14 und 0,28 U/ml liegt. Es erfolgt sofort die Aufnahme des Reaktionsverlaufes auf dem bei 30°C temperierten Photometer bei 420 nm für 1 Minute. Anhand von Gleichung 1 wird die Berechnung der Aktivität durchgeführt.

Gleichung 1: Berechnung der Laccaseaktivität

$$U / ml = 0,278 \cdot \frac{\Delta E}{\text{min}} \cdot f$$

U / ml ...Laccaseaktivität [U/ml]

$\frac{\Delta E}{\text{min}}$ Absorbance bei 420nm für 1 Minute

f Verdünnungsfaktor [-]

Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung der in Kapitel 1.1 beschriebenen Laccaselösungen sind in Tabelle 4 angeführt.

Tabelle 4: Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung der Laccaselösungen

	Aktivität [U/ml]
Laccase 1 (Pepton 7014)	422
Laccase 2 (Pepton 82962)	67

Laccase 1 wird aufgrund ihrer höheren Aktivität zu allen weiteren Versuchen verwendet. Grund für die höhere Aktivität liegt an der Unterschiedlichen Gewinnungsmethoden der Peptone und wahrscheinlich auch daran, dass das Pepton 82962 eine höhere Stickstoffkonzentration enthält.

1.2 Versuche zur Polymerisierung mit Laccase

1.2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Bei den Polymerisierungsversuchen mit Laccase wird der Einfluss folgender Komponenten auf die Polymerisation der Lignosulfonatprobe getestet:

- der Einsatz von 1-Hydroxybenzotriazol (HBT) als Mediator
- die Wirkung von Citratpuffer
- die Bestimmung der idealen Laccase- und Lignosulfonatkonzentration
- der ideale Zeitpunkt zum Stoppen der Reaktion, also wann die Polymerisation ihr Maximum erreicht bevor der Abbau des Lignosulfonats einsetzt.

Alle in Tabelle 5 erwähnten Komponenten werden in ausgewählten Konzentrationen und verschiedenen Kombinationen miteinander vermischt und durch Zugabe von Laccase wird jeweils die Reaktion gestartet. Für den weiteren Reaktionsverlauf werden die Reaktionsansätze zur gleichmäßigen Durchmischung aller Inhaltsstoffe auf einen Schüttler (600 r/min) gestellt. In regelmäßigen Zeitabständen werden Proben zur Analyse entnommen, um den Fortschritt der Polymerisierung zu beobachten.

Tabelle 5: Reaktionsansätze für die Laccaseversuche

Chemikalien	Eingesetzte Konzentrationen		
HBT	1 mM		
Citratpuffer	20 mM	100 mM	
Laccase	5,1 U/ml	50 U/ml	
Lignosulfonat	0,1%	1%	10%
Reaktionszeit	2h	4h	24h

Zur Vorbereitung der Proben für die GPC Messung werden sie 4 Minuten in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert, anschließend durch 0,45 µm PTFE-Filter filtriert und mittels GPC vermessen.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die im Versuch eingesetzten Komponenten und ihre untersuchten Konzentrationen. Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen werden in den folgenden Kapiteln diskutiert und die ideale Zusammensetzung der Probe und die ideale Reaktionsdauer ermittelt.

1.2.2 Analysemethode mittels GPC

GPC Messungen:

Gerät: HPLC 1200

Eluent: 10 mM NaOH

Laufmittelfluß während der Messung: 1 ml/min

Säule: TOSH, TSKgel (PW Series, 1 Vorsäule, 1 Hauptsäule; Packungsmaterial: Polymetacrylat)

Druck: 55 bar

Detektor: DAD (Diodenarray-Detektor)

Dauer einer Messung: 60 Minuten

Injektionsvolumen (je nach Ligninkonzentration): 25 µl bzw. 50 µl

Die Kalibration der GPC erfolgt mit Polystyrolstandards. Ein Problem bei der Kalibration stellen die verwendeten Polystyrolstandards dar, die eigentlich nicht ideal für die Molmassenbestimmung von Lignosulfonaten sind. Die linearen Polystyrolmoleküle sind von ihrem Aufbau her nicht gut mit dem stark verzweigten Lignosulfonat zu vergleichen. Aufgrund dieser Problematik sind die erhaltenen Ergebnisse für die Molmassen nicht als Absolutwerte zu betrachten, sondern dienen nur zum Vergleich der hier beschriebenen Versuche untereinander.

Die Auswertung und Bestimmung der Molmassen erfolgt über Integration der durch die GPC aufgezeichneten Spektren. Das Integral wird im Intervall zwischen Minute

17,5 und 22,5 ausgewertet, da in diesem Bereich die Kalibration annähernd linear ist. Die Fläche unterhalb der Peaks wird mithilfe der Kalibrationskurve aus Abbildung 6 in die Molmasse umgerechnet.

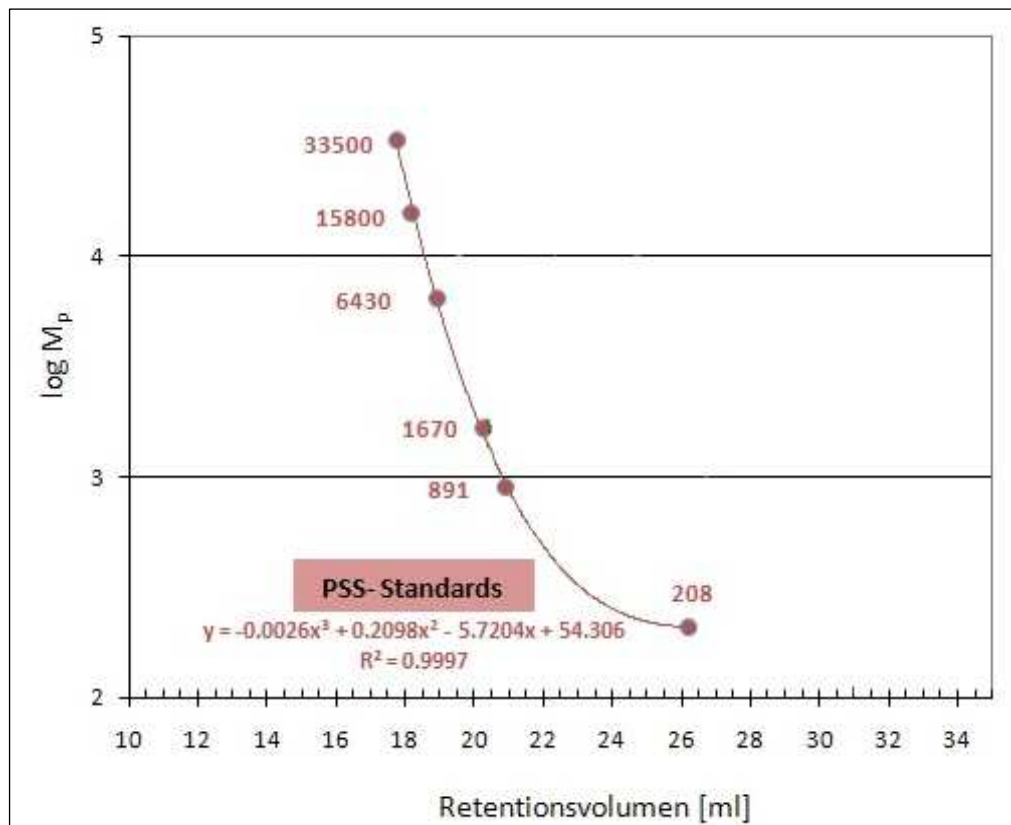


Abbildung 6: PSS Kalibrationskurve

Darstellung der Ergebnisse der Molmassenbestimmung

Die Ergebnisse der Molmassenbestimmung werden als Zahlenmittel der Molmasse, Massenmittel der Molmasse und als Polydispersität (D) angegeben.

Das Zahlenmittel der Molmasse (M_n) beschreibt das arithmetische Mittel der Molmasse.

Wählt man zufällig eine Monomereinheit aus, dann ist das Massenmittel der Molmasse (M_w) das durchschnittliche Gewicht des dazugehörigen Polymers.

Die Polydispersität beschreibt das Verhältnis zwischen Massenmittel und Zahlenmittel der Molmasse. Eine hohe Polydispersität beschreibt also, dass ein System aus einer

Vielzahl von nieder- und höhermolekularen Stoffen besteht. Umso breiter ein Peak in einem Spektrum, desto größer ist die Polydispersität. Schmale Verteilungen ergeben kleine Polydispersitätswerte.

Vorbereitung der Proben für die GPC Messung

Alle Lignin-Proben werden im Verhältnis 5:1 mit 10 mM NaOH verdünnt. Das Mg-Lignosulfonat löst sich vollständig. Anschließend werden alle Ligninproben für 5 Minuten in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert und danach durch PTFE-Filter 0,45 µm (Teflonfilter) filtriert. Je nach Ligninkonzentration wird als Injektionsvolumen 25 µl oder 50 µl gewählt.

1.2.3 Darstellung der idealen Zusammensetzung der Probe

Die Versuche zeigen, dass die ideale Zusammensetzung der Probe, das heißt, ein hoher Grad an Polymerisierung des Lignins, ohne HBT-Mediator und ohne Citratpuffer erreicht wird.

Weiters zeigt sich, dass die ideale Reaktionszeit 4 Stunden beträgt. Lässt man die Reaktion länger laufen kann man erkennen, dass ab diesem Zeitpunkt langsam der Abbau von Lignosulfonat durch das Laccaseenzym erfolgt.

In den Kapitel 1.2.4 bis Kapitel 1.2.8 wird erklärt wie sich die ideale Zusammensetzung der Probe ergibt und warum man daraus die besten Ergebnisse für die Polymerisation des Lignosulfonats erhält.

In Abbildung 7 sind die Ergebnisse der GPC Messung und in Tabelle 6 die Veränderung des Molekulargewichtes nach Ablauf der Polymerisierung dargestellt. Alle weiteren Analysen werden mit dieser idealen Zusammensetzung durchgeführt.

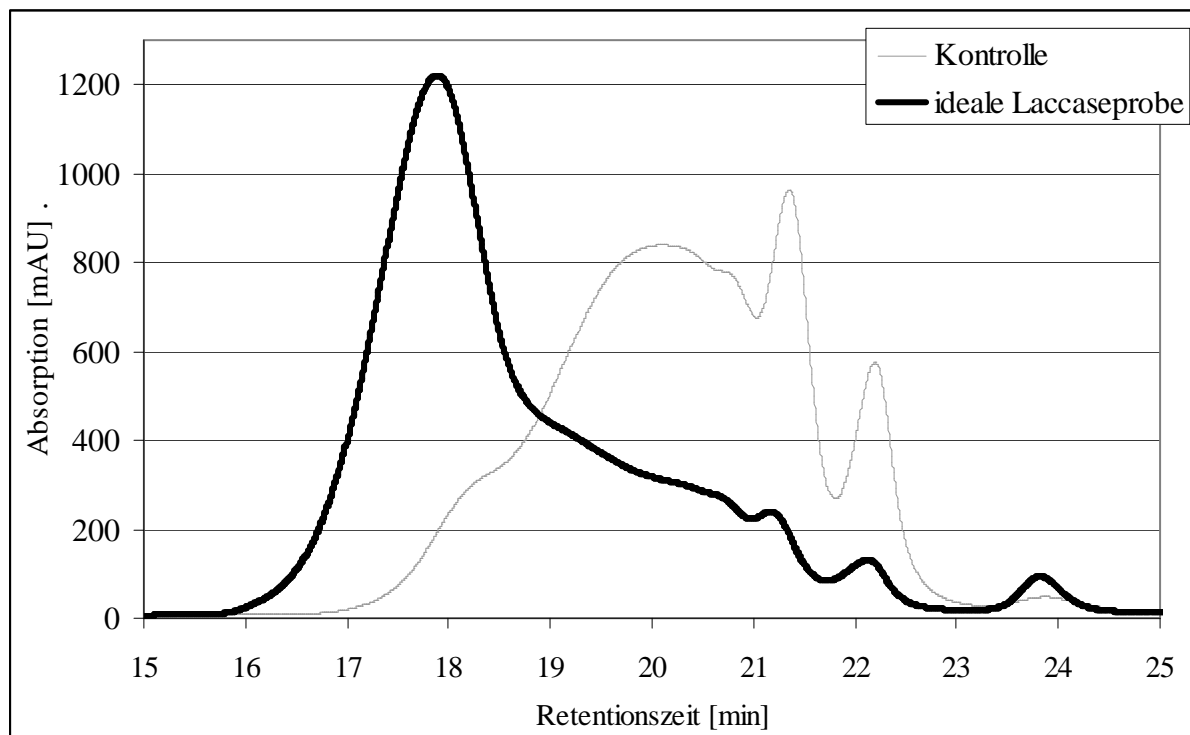


Abbildung 7: GPC Messung der idealen Laccaseprobe

Tabelle 6: Molekulargewichte der ideal zusammengesetzten Probe

	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	D
Kontrolle	1138	3826	3,4
Laccaseprobe	4018	22570	5,6

1.2.4 Bestimmungen mit und ohne Mediator

Zum Vergleich der Wirkung des HBT-Mediators auf die Polymerisation werden Versuche bei einer Reaktionszeit von 4 Stunden mit und ohne Mediator durchgeführt.

Die Zusammensetzung der Proben mit und ohne Mediator und der Kontrollprobe ist in Tabelle 7 zu sehen. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der GPC Messungen dargestellt und die berechneten Molekulargewichte in Tabelle 8.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Proben

	HBT	Citrat- puffer	Laccase	Ligno- sulfonat	Reakti- onszeit
Probe mit HBT	20 mM	-	5,1 U/ml	1%	4h
Probe ohne HBT	-	-	5,1 U/ml	1%	4h
Kontrolle	-	-	-	1%	4h

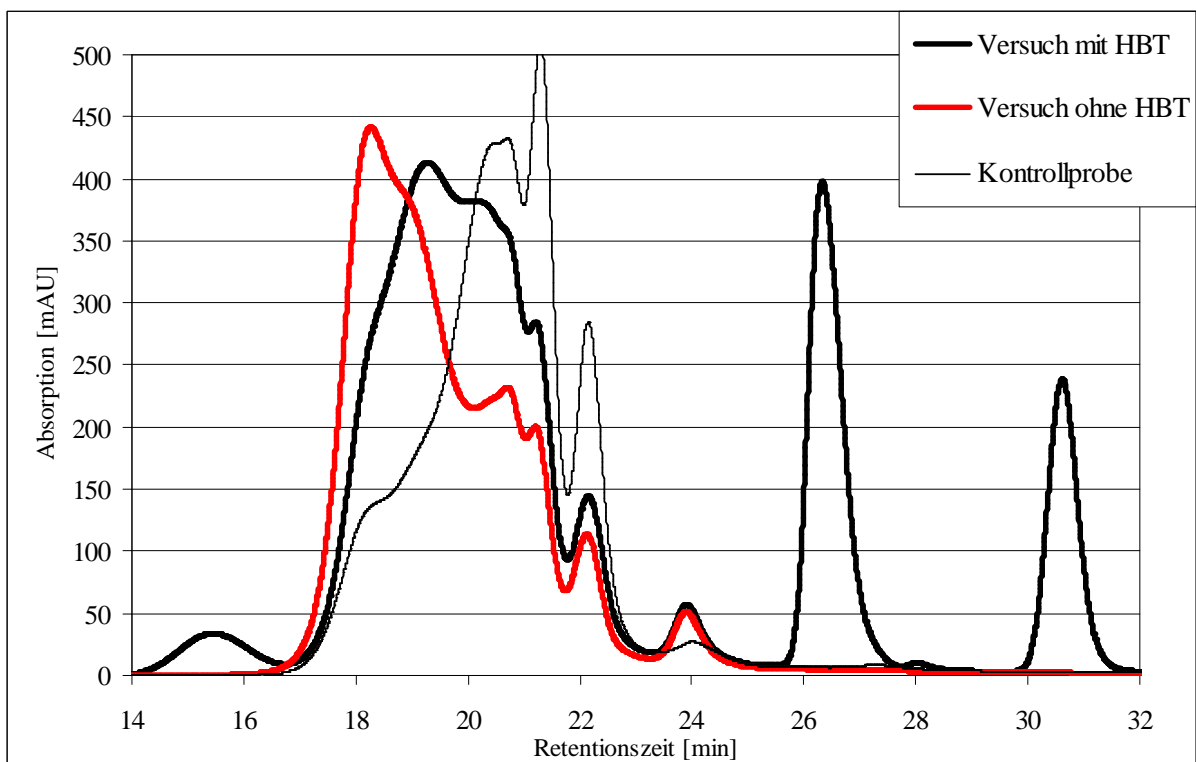


Abbildung 8: Versuche mit und ohne HBT

Tabelle 8: Molekulargewichte der Proben mit und ohne HBT

	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	D
Kontrolle	997	3777	3,7
Probe mit HBT	1839	5796	3,2
Probe ohne HBT	2264	9823	4,3

Aus Abbildung 8 und Tabelle 8 ist zu erkennen, dass der Mediator HBT auf die Polymerisierung keinen allzu großen Einfluss hat, ohne Mediator werden sogar höhere Molekulargewichte erreicht.²⁵ Beim Abbau von Lignosulfonat findet HBT als Mediator jedoch sehr wohl Einsatz, da es wie in Abbildung 5 beschrieben als Elektronenüberträger zwischen Laccase und Substrat fungiert. Ist jedoch eine Polymerisierung erwünscht, reicht die Bildung von Radikalen an der Oberfläche des stark verzweigten Lignosulfonatmoleküls aus.

Somit spielt HBT als Mediator eigentlich nur beim Abbau von Lignin eine wichtige Rolle. Die Bildung von Radikalen im Inneren der Lignin Moleküle durch HBT kann aus sterischen Gründen für eine Polymerisierung nicht genutzt werden. Daher resultiert auch bei Verwendung von HBT ein niedrigeres mittleres Molekulargewicht, da an den Radikalen im Inneren des Moleküls ein Abbau statt einer Polymerisierung stattfindet.

1.2.5 Bestimmungen mit und ohne Citratpuffer

Bei der Verwendung des Citratpuffers ist das Ziel, dass der pH-Wert im Bereich von pH 5 während des Verlaufs der Reaktion konstant bleibt. In diesem Bereich ist laut Literatur die Laccaseaktivität am größten.²⁶ Es soll hier geprüft werden, ob dies auf die Polymerisierung ebenfalls einen Einfluss hat.

Die Variation der Zusammensetzung der Proben ist in Tabelle 9 dargestellt.

Die Ergebnisse der GPC Messungen für die Versuche mit und ohne Citratpuffer, bzw. die Einstellung auf pH 5 beim Starten der Reaktion, sind in Abbildung 9 bis Abbildung 11 und die Molmassen in Tabelle 10 bis Tabelle 12 dargestellt. Die Reaktionszeit aller Proben beträgt 4 Stunden.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Proben

	HBT	Citrat- puffer	Laccase	Ligno- sulfonat	Reaktions- zeit
Probe mit 20mM Puffer	-	20 mM	50 U/ml	10%	4h
Kontrolle mit 20mM Puffer	-	20 mM	50 U/ml	10%	0h
Probe mit 10mM Puffer	-	10 mM	50 U/ml	10%	4h
Kontrolle mit 10mM Puffer	-	10 mM	50 U/ml	10%	0h
Probe ohne Puffer	-	-	50 U/ml	10%	4h
Kontrolle ohne Puffer	-	-	50 U/ml	10%	0h
Probe mit pH 5	-	-	50 U/ml	10%	4h

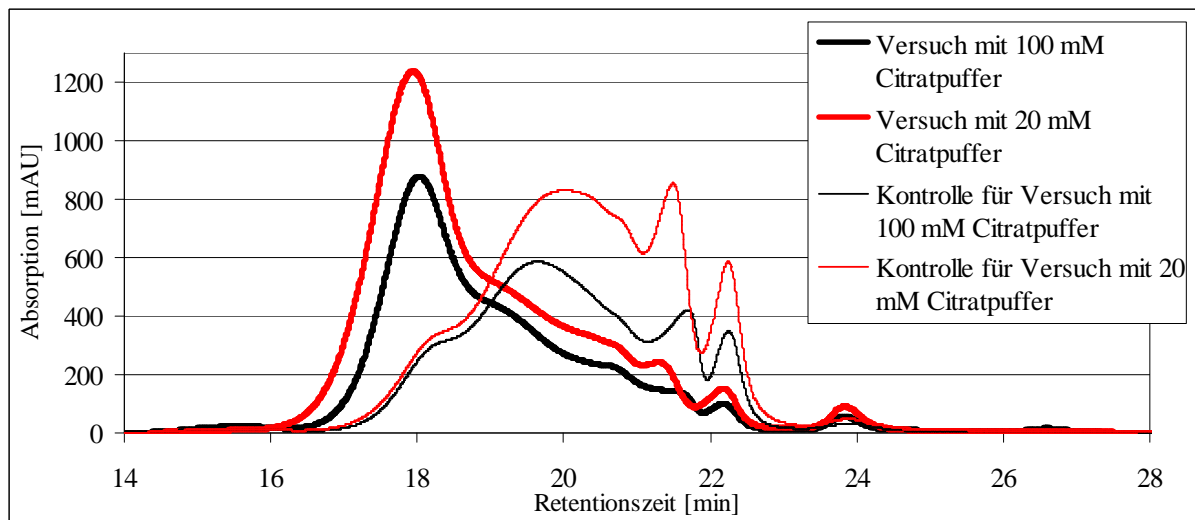


Abbildung 9: Versuche mit 20 und 100 mM Citratpuffer im Vergleich

Tabelle 10: Molekulargewichte der Proben mit unterschiedlichen Pufferkonzentrationen

	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	D
Kontrolle 20 mM	1308	5323	4,1
Probe 20 mM	2866	15459	5,3
Kontrolle 100 mM	1123	4273	3,8
Probe 100 mM	3383	18996	5,6

Aus den erhaltenen Molekulargewichten ist deutlich zu erkennen, dass höhere Pufferkonzentrationen zu einem höheren Molekulargewicht führen als niedrigere. Also umso stärker das Puffersystem, desto stärkere Polymerisationen der Ligninmoleküle erhält man.

Um zu klären, ob ein starkes Puffersystem überhaupt notwendig ist um hohe Polymerisationsgrade zu erhalten, wird die Probe 100 mM mit einer Probe verglichen bei der gänzlich auf den Einsatz eines Puffers verzichtet wird. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt.

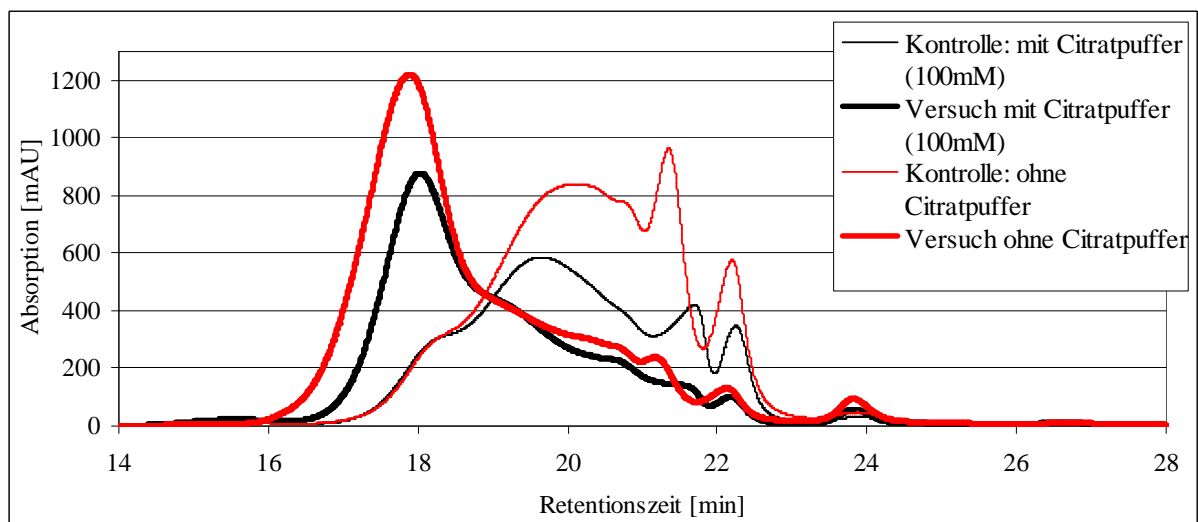


Abbildung 10: Versuche mit und ohne Citratpuffer

Tabelle 11: Molekulargewichte der Proben mit und ohne Citratpuffer

	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	D
Kontrolle 100 mM	1123	4273	3,8
Probe 100 mM	3383	18996	5,6
Kontrolle ohne Puffer	1138	3826	3,4
Probe ohne Puffer	4018	22570	5,6

Wird komplett auf den Einsatz des Citratpuffers verzichtet resultieren eine größere Zunahmen des Molekulargewichtes. Die bedeutet, dass die Verwendung von Puffern sogar kontraproduktiv wäre. Auch wenn laut Literatur²⁶ Laccasen in bei einem konstante pH Wert von 5 höhere Aktivitäten aufweisen, ist es im Falle der Polymerisierung ausreichend, wenn die Laccasen nicht in ihrem Optimalbereich arbeiten.

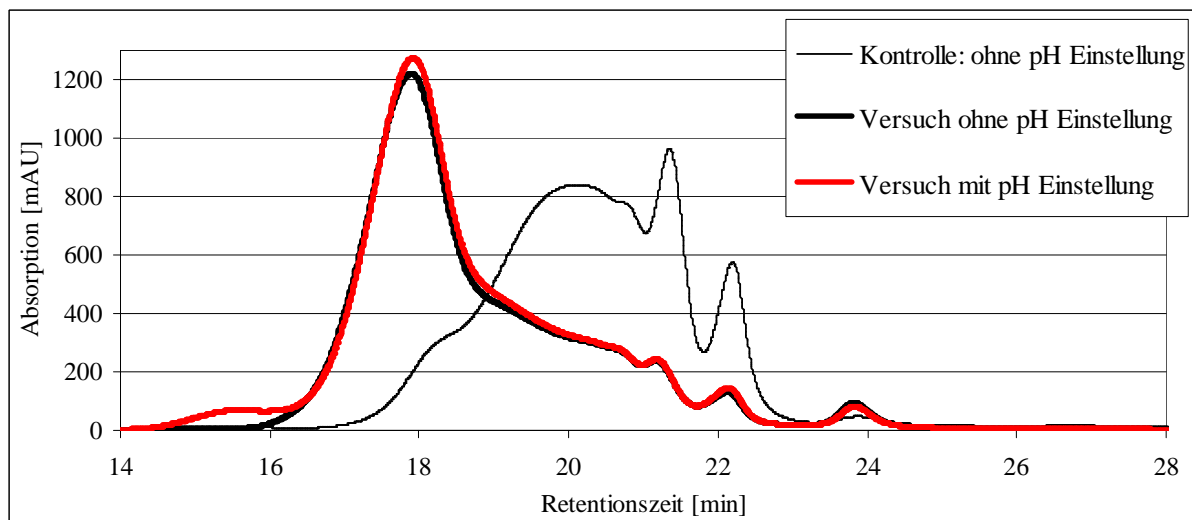


Abbildung 11: Versuche mit und ohne pH Einstellung

Tabelle 12: Molekulargewichte der Proben mit und ohne pH Einstellung

	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	D
Kontrolle	1138	3826	3,3
Probe	4018	22570	5,5
Kontrolle pH 5	1113	3769	3,3
Probe pH 5	4182	21729	5,2

Auch eine Erhöhung des pH Wertes mit NaOH am Anfang der Reaktion von pH 3,8 auf den Idealwert von pH 5 bringt in Bezug auf die Polymerisierung des Lignins keine Vorteile. Man kann die Ergebnisse der Proben aus Tabelle 12 als gleich erfolgreich ansehen.

Zusammenfassend ist der pH Wert der Ligninlösung bei den hier beschriebenen Versuchen ideal, um maximale Funktion der Laccaseenzyme zu erhalten. Für gute Ergebnisse in der Polymerisierung von Ligninen ist ein pH 3,8 vollkommen ausreichend.

1.2.6 Bestimmung der idealen Laccasekonzentration

Zur Bestimmung des Einflusses der Laccase werden zwei verschiedene Konzentration getestet: 5,1 U/ml und 50 U/ml Laccase in der gesamten Probe. Die Reaktionszeit beträgt in beiden Experimenten 4 Stunden. Die Konzentrationen aller anderen Komponenten wird in Tabelle 13 gezeigt.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Proben

	HBT	Citrat-puffer	Laccase	Ligno-sulfonat	Reakti-onszeit
Probe mit 5,1U/ml Laccase	-	-	5,1 U/ml	1%	4h
Kontrolle 5,1U/ml Laccase	-	-	5,1 U/ml	1%	0h
Probe mit 50U/ml Laccase	-	-	50 U/ml	1%	4h
Kontrolle 50U/ml Laccase	-	-	50 U/ml	1%	0h

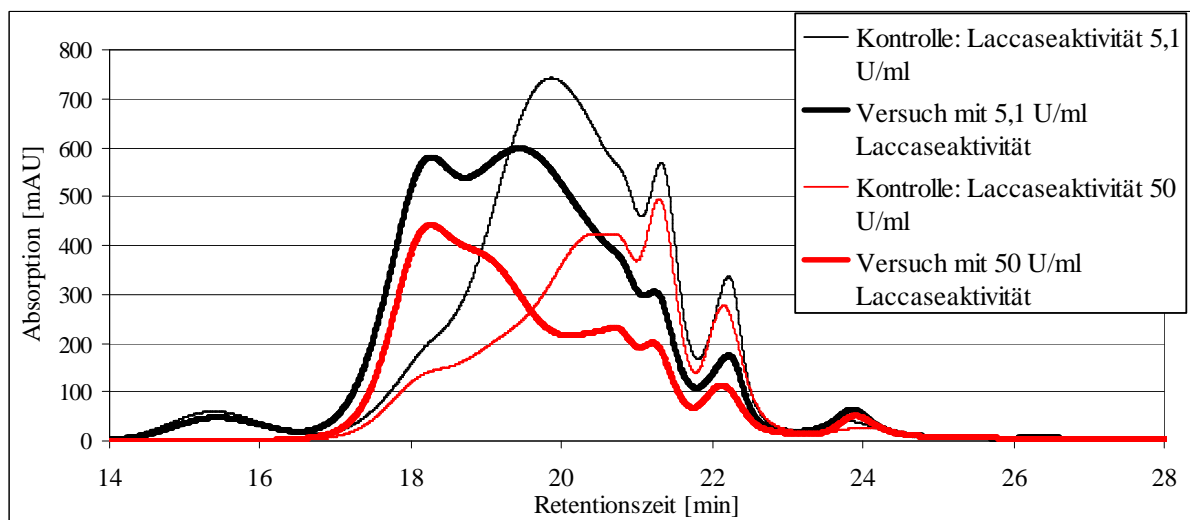


Abbildung 12: Versuch mit einer Laccaseaktivität von 5,1 bzw. 50 U/ml

Tabelle 14: Molekulargewichte der Proben mit niedriger und hoher Laccaseaktivität

	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	D
Laccaseaktivität 5,1 U/ml			
Kontrolle	1258	3884	3,0
Probe 5,1	1938	8577	4,4
Laccaseaktivität 50 U/ml			
Kontrolle	1009	3838	3,8
Probe 50	2264	9824	4,3

Wie man aus Tabelle 14 erkennen kann, ist die Zunahme an Molekulargewicht bei höheren Laccaseaktivitäten stärker. Die niedrige Laccaseaktivität von 5,1 U/ml ist nicht ausreichend um eine 1%ige Ligninlösung vollständig zu polymerisieren. Für alle weiteren Reaktionsansätze wird somit mit einer Laccaseaktivität von 50 U/ml gearbeitet.

1.2.7 Bestimmung der idealen Lignosulfonatkonzentration

Hierzu werden Proben mit den Konzentrationen von 0,1%; 2% und 10% Lignosulfonat hergestellt und die Ergebnisse mit der Probe mit 1% Lignosulfonat verglichen. Die Reaktionszeit beträgt bei allen Proben 4 Stunden. Die genaue Zusammensetzung der Proben ist in Tabelle 15 dargestellt. In Abbildung 13 und Abbildung 14 werden die Ergebnisse der GPC Messungen gezeigt.

Tabelle 15: Zusammensetzung der 0,1 und 1%igen Ligninproben

	HBT	Citratpuffer	Laccase	Lignosulfonat	Reaktionszeit
Probe 0,1	-	20 mM	5,1 U/ml	0,1%	4h
Probe 1	-	20 mM	5,1 U/ml	1%	4h

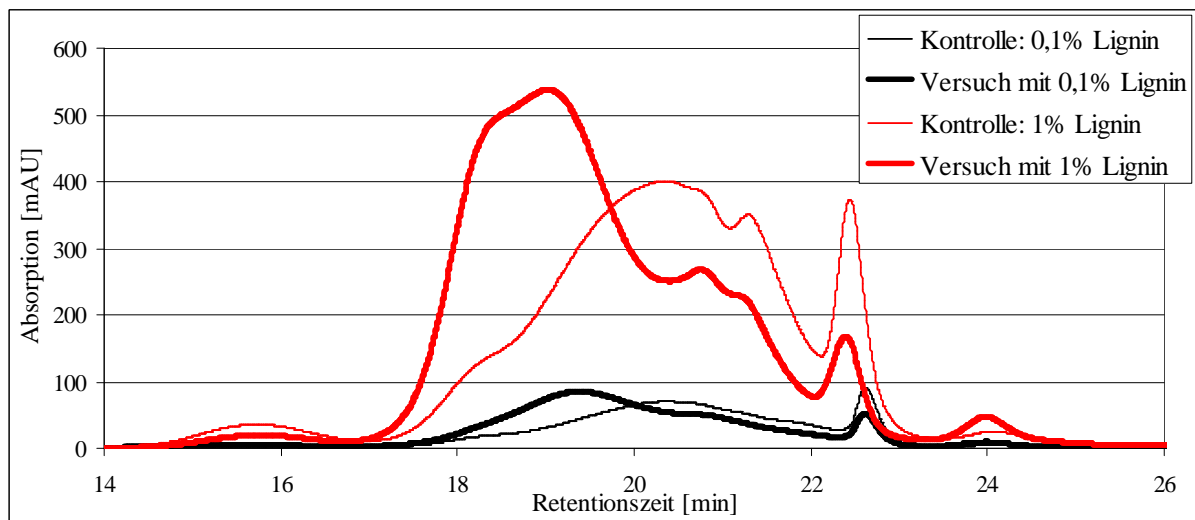


Abbildung 13: Versuche mit 0,1% und 1% Lignosulfonatkonzentration

Tabelle 16: Molekulargewichte der 0,1 und 1%igen Ligninproben

	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	D
0,1% Lignosulfonatkonzentration			
Kontrolle 0,1	1745	2180	1,2
Probe 0,1	2649	5343	2,0
1% Lignosulfonatkonzentration			
Kontrolle 1	1422	3406	2,3
Probe 1	2843	8309	2,9

Tabelle 17: Zusammensetzung der 1 und 10%igen Ligninproben

	HBT	Citratpuffer	Laccase	Lignosulfonat	Reaktionszeit
Probe 1	-	-	50 U/ml	1%	4h
Probe 10	-	-	50 U/ml	10%	4h

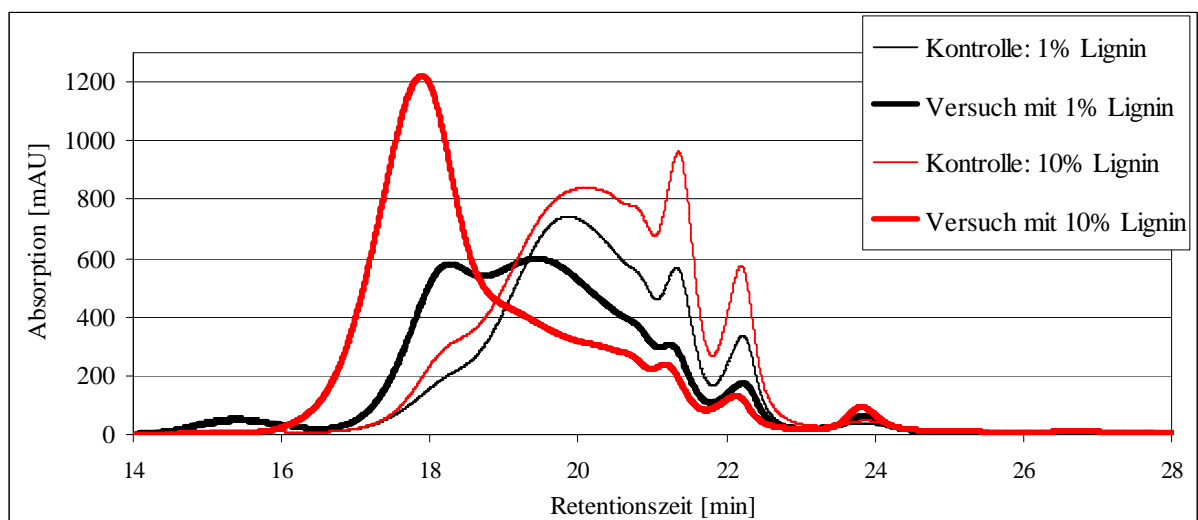


Abbildung 14: Versuche mit 1% und 10% Lignosulfonatkonzentration

Tabelle 18: Molekulargewichte der 1 und 10%igen Ligninproben

	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	D
1% Lignosulfonatkonzentration			
Kontrolle 1	1138	3825	3,4
Probe 1	2257	4018	3,2
10% Lignosulfonatkonzentration			
Kontrolle 10	1422	3406	2,3
Probe 10	2843	8309	2,9

Wie aus Tabelle 16 und Tabelle 18 zu erkennen ist, ergibt sich der höchste Polymerisierungsgrad bei der höchsten Lignosulfonatkonzentration von 10%. Das Verhältnis von 50 U/ml Laccaseaktivität und einer Lignosulfonatkonzentration von 10%, liefert in Bezug auf die Polymerisation die besten Ergebnisse.

1.2.8 Bestimmung der idealen Reaktionszeit

Nachdem Laccasen nach der Phase der Polymerisierung, mit dem Abbau von Lignin beginnen ist es wesentlich herauszufinden, wann das Maximum der Polymerisierung erreicht wird. Dafür wird das Molekulargewicht einer Probe, mit der in Tabelle 19 angeführten Zusammensetzung, nach jeweils 2, 4 und 24 Stunden berechnet.

Tabelle 19: Zusammensetzung der Probe für die Zeitmessung

	HBT	Citratpuffer	Laccase	Lignosulfonat	Reaktionszeit
Probe	-	-	5,1 U/ml	1%	2h, 4h, 24h

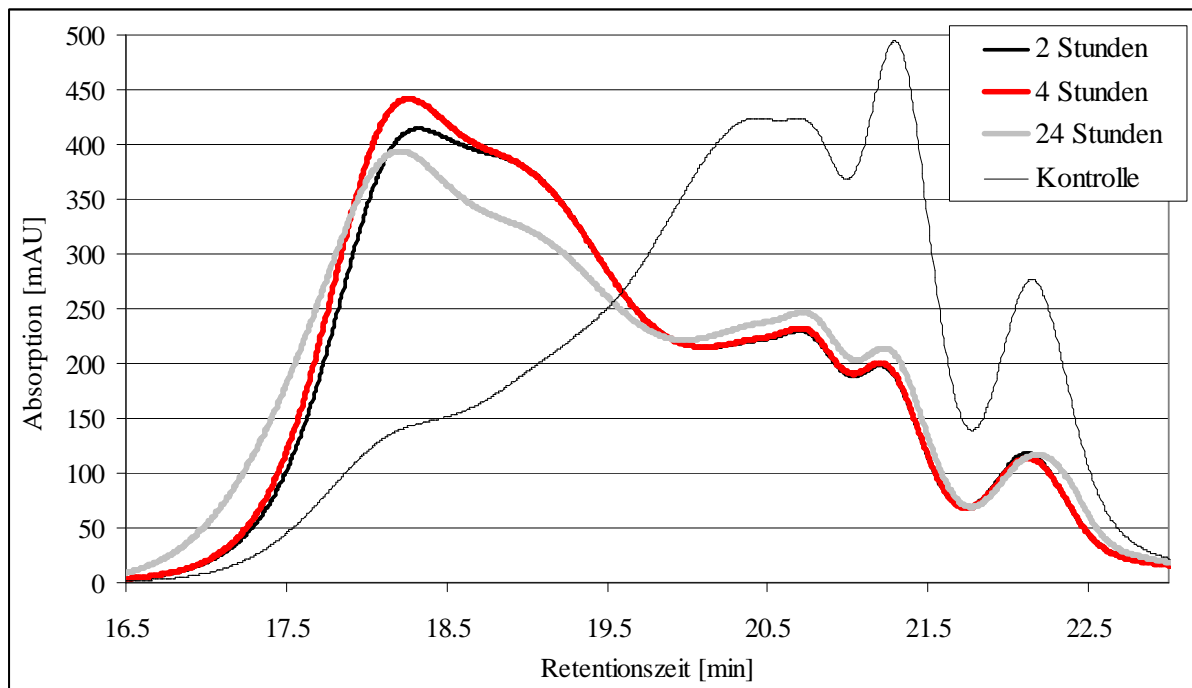


Abbildung 15: GPC Messung nach unterschiedlichen Reaktionszeiten

Tabelle 20: Änderung der Molekulargewichte mit zunehmender Zeit

	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	D
Kontrolle	1009	3838	3,8
2 Stunden	2148	9174	4,2
4 Stunden	2264	9824	4,3
24 Stunden	2129	10788	4,8

Aus Tabelle 20 kann man erkennen, dass die Polymerisation bereits nach 2 Stunden weitgehend abgeschlossen, aber in weiterer Folge noch geringfügig ansteigt. Dies lässt sich anhand der deutlichen Verschiebung der Kurven nach links zu kürzeren Retentionszeiten leicht erkennen. Eine Verschiebung nach links zeigt, dass größere Molekülfragmente vorhanden sind.

Nach 4 Stunden jedoch beginnt das Molekulargewicht zu sinken. Der Grund hierfür ist der beginnende Abbau von Lignin durch die Laccase.

Der Beginn des Abbaus lässt sich auch gut aus Abbildung 15 erkennen, da das Peakmaximum, wenn man die Probe nach 4 und 24 Stunden vergleicht sehr deutlich abnimmt.

2 Polymerisierung mit Pilzen

2.1 Einleitung

Für die Polymerisation von Lignin mit Pilzen wurden zwei verschiedene Arten gewählt. Eine Braunfäule *Gloephyllum trabeum* und eine Weißfäule *Trametes pubescens*. Beide Pilze kommen in der Natur vor und sind dort für den Abbau von Lignin verantwortlich. Weißfäulepilze können Lignin vollständig abbauen, sodass es schlussendlich zur Entfärbung des Holzes kommt, nur die weiße Cellulose übrigbleibt, daher auch der Name. Die Braunfäule schafft den vollständigen Abbau von Lignin nicht, da der Pilz die Cellulose angreift und abbaut und das Lignin somit als braunes Pulver übrigbleibt.²⁷

Beim Abbau werden verschiedene Enzyme (Laccase, Mangan Peroxidasen, Lignin Peroxidasen,...) vom Pilz in das Medium abgegeben, die weiter in das Lignin diffundieren und somit eine oxidative Degradation katalysieren. Weiters ist bekannt, dass der erste Schritt des Abbaus mit einer Polymerisation von Lignin verbunden ist, was für die Versuche von Bedeutung ist. Die Enzyme lösen zunächst eine radikalische Polymerisation aus, danach erst setzt der Abbau ein.

2.2 Durchführung der Pilzversuche

2.2.1 Herstellung der Kultur

Von beiden Pilzstämmen werden Arbeitskulturen auf einem Agar-Malz-Extrakt gezüchtet. Die Konzentration liegt bei 50g Agar-Malz-Extrakt pro Liter Wasser. Nach der Beimpfung werden die bebrüteten Petrischalen im Brutschrank bei 28°C ausgebrütet. Um ein Austrocknen zu verhindern wird für ausreichend Luftfeuchtigkeit gesorgt. Nach 7 Tagen werden die voll bewachsenen Pilzplatten aus dem Brutschrank heraus-

genommen. Weiterhin werden sie im Kühlschrank bei einer Temperatur von 7°C gelagert bis sie für die Versuche eingesetzt werden.

2.2.2 Inkubation mit Lignin

Für die Durchführung der Polymerisierungsversuche mit Lignosulfonat wird eine Nährlösung mit einem pH Wert von 4,5 benötigt. Diese dient als Reaktionsmedium von mit Lignosulfonat. Die genaue Zusammensetzung der beiden im Versuch eingesetzten Nährlösungen sind in Tabelle 21 dargestellt. Es wird eine stickstoffreiche und eine stickstoffarme Nährlösung hergestellt und ihr Einfluss auf das Wachstum der Pilze untersucht.

Tabelle 21: Zusammensetzung des Nährmediums pro Liter Wasser

	N - reiches Medium	N - armes Medium
Glucose [g/l]	20	20
Pepton [g/l]	10	1
Magnesiumsulfat-heptahydrat [g/l]	0,5	0,5
Hefeextrakt [g/l]	0,5	0,5

Die in Tabelle 21 beschriebenen Komponenten werden in einem Erlenmeyerkolben vermischt und mit Wasser sterilisiert. Nun ist die Nährlösung fertig und es wird auf folgende Art der Pilz und das Lignosulfonat hinzugegeben: je eine Pilz-Agarplatte wird mit 50 ml sterilem Wasser in einem Sterilmixer zwei Mal für je 15 Sekunden gut gemischt. Davon wird im Verhältnis 1:20 Pilzsuspension in die mit Nährlösung bereitstehenden Erlenmeyerkolben hinzu pipettiert. Mit einer Alufolie abgedeckt werden die Kolben im Brutschrank bei 28°C für 7 Tage bebrütet.

Nach Beendigung der Wachstumsphase des Pilzes wird Lignosulfonat in 3 verschiedenen Konzentrationen von 0,1%; 1% und 10% zugegeben. Dafür wird es noch, zur Sicherstellung von sterilen Bedingungen, durch ein 0,45 µm Celluloseacetatfilter in den

Kolben mit dem ausgebrüteten Pilz hineinfltriert. Die Reaktion von Lignosulfonat mit dem Pilz wird über 2 Wochen lang beobachtet durch regelmäßige Probenahme und Vermessung mittels GPC.

Weiters wurden in Vorversuchen verglichen, welche Unterschiede es im Ligninabbau gibt, bei Durchführung der Versuche als Schüttelkultur beziehungsweise im Vergleich dazu als Standkultur. Bei der Schüttelkultur bilden sich kleine Pilzkügelchen. Bei der Standkultur benetzt der Pilz die Oberfläche des Mediums.

Die Ergebnisse bei den Versuchen als Standkulturen zeigen, dass sie nur in relativ kleinem Maßstab durchgeführt werden können und auch, dass das sich bildende Luftmycel sehr empfindlich ist und beim Einspritzen des abzubauenen Lignins und auch bei der Probenahme vorsichtig gearbeitet werden muss, um es nicht zu beschädigen.

Bei dem Versuch in Schüttelkolben ist von Vorteil, dass die Handhabung sehr einfach ist und sie auch zur Produktgewinnung im kleineren Maßstab genutzt werden können, somit sind auch größere Ansätze möglich als bei Standkulturen. Alle weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Versuch werden daher als Schüttelkultur angesetzt.

2.3 Ergebnisse der Pilzversuche

2.3.1 Bestimmung des geeigneten Nährmediums

Für die Bestimmung, ob sich ein stickstoffarmes oder stickstoffreiches Medium besser auf den Pilz und somit auf den Grad der Polymerisierung auswirkt, werden wie in Tabelle 21 angeführt, die Nährmedien zusammengestellt. Die Versuche wurden jeweils mit *Gloephyllum trabeum* und *Trametes pubescens* durchgeführt. In Abbildung 16 und Abbildung 17 sind die GPC Spektren und in Tabelle 22 die Molekulargewichte dargestellt, die man nach 2 Wochen Reaktionszeit erhält.

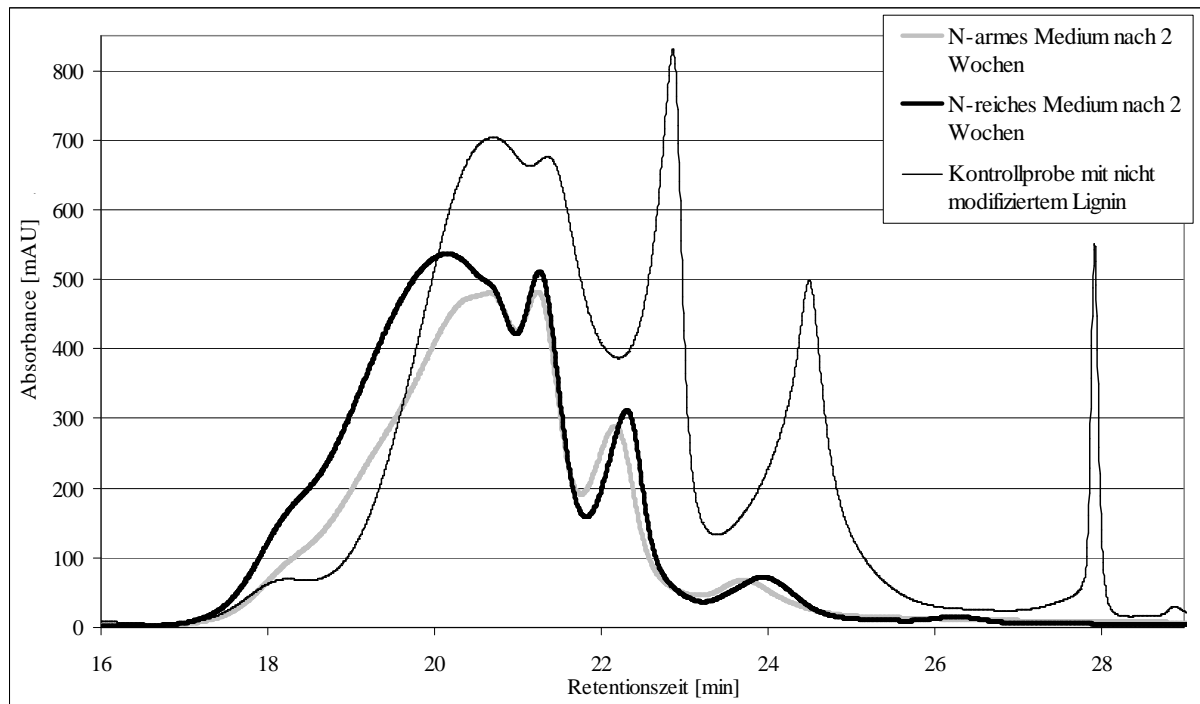


Abbildung 16: *Gloephyllum trabeum*: Vergleich des N-armen und N-reichen Mediums

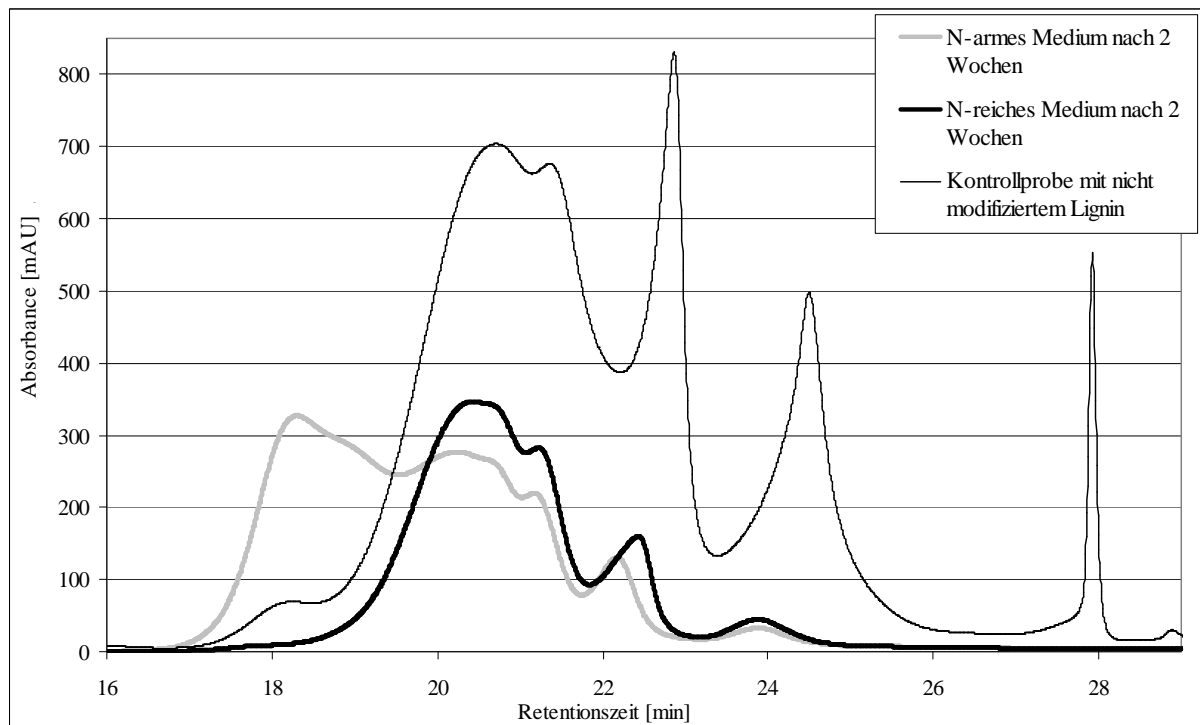


Abbildung 17: *Trametes pubescens*: Vergleich des N-armen und des N-reichen Mediums

Tabelle 22: Molekulargewichte der Proben im N-armen und N-reichen Medium

	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	D
Kontrolle	709	1207	1,7
N-armes Medium			
Trametes pubescens	1703	6733	3,9
Gloephyllum trabeum	1044	2576	2,4
N-reiches Medium			
Trametes pubescens	1098	1515	1,4
Gloephyllum trabeum	1165	3178	2,7

Wie aus Abbildung 16 und Abbildung 17 zu erkennen ist, ergibt das stickstoffarme Medium günstigere Bedingungen im Hinblick auf die Polymerisation mit dem Pilz *Trametes pubescens* als das stickstoffreichere. Das ist auch sehr deutlich an den berechneten Molekulargewichten zu erkennen.

Weiters kann lässt sich zeigen, dass eine Polymerisierung und auch ein Abbau von Lignin mit *Gloephyllum trabeum* kaum möglich ist. Ein Grund dafür ist, dass es sich bei diesem Pilz, wie vorhin beschrieben um Braunfäule handelt, die das Lignin nicht direkt angreifen können. Weiters kann auch die Ligninkonzentration für diesen Pilz zu hoch sein, sodass keine wesentliche Polymerisierung erreicht werden kann.

2.3.2 Bestimmung der idealen Reaktionszeit

Zur Ermittlung der geeigneten Reaktionszeit um die höchste Polymerisierung zu erhalten werden die Proben vom Pilz *Trametes pubescens* nach 1 und nach 2 Wochen vermessen und miteinander verglichen. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse dargestellt.

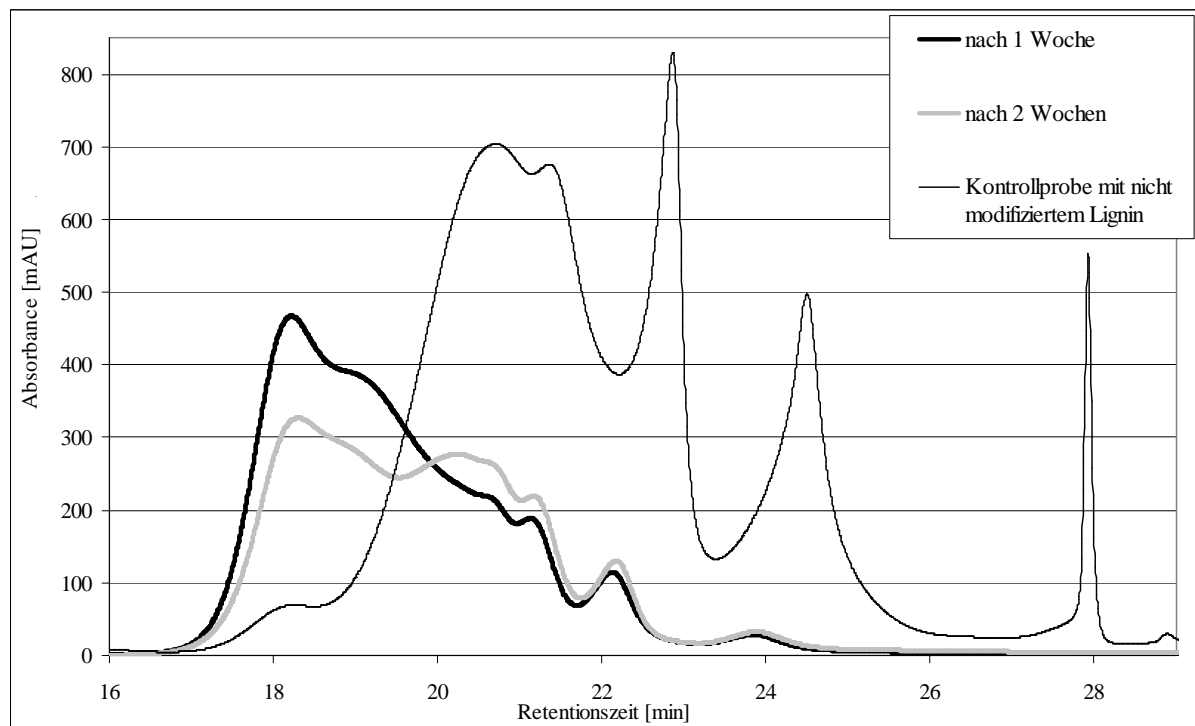


Abbildung 18: *Trametes pubescens*: nach 1 bzw. 2 Wochen Reaktionszeit

Tabelle 23: Molekulargewichte nach 1 und 2 Wochen Reaktionszeit

	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	D
Kontrolle	709	1207	1,7
Probe nach 1 Woche	2247	8457	3,8
Probe nach 2 Wochen	1703	6733	3,9

Aus den berechneten Molekulargewichten aus Tabelle 23 ist deutlich zu erkennen, dass die ideale Reaktionszeit 1 Woche beträgt. Denn hier ist bereits eine Polymerisierung des Lignins durch den Pilz gegeben. Nach 2 Wochen findet bereits der Abbau von Lignin statt.

Betrachtet man Abbildung 18 kommt man zum gleichen Ergebnis, dass die ideale Reaktionsdauer 1 Woche beträgt. Das Peakmaximum der Kurve nach 2 Wochen ist viel kleiner als das Peakmaximum nach 1 Woche, was ein eindeutiger Nachweis ist, dass der Abbau von Lignin bereits begonnen hat.

Für die weiteren Analysen wird somit nur das durch *Trametes pubescens* modifizierte Lignin nach einer Woche Reaktionsdauer verwendet.

2.3.3 Bestimmung der geeigneten Ligninkonzentration

Um die geeignete Konzentration an Lignin in der Pilzsuspension zu ermitteln, werden Versuche mit einer Ligninkonzentration von 0,1% und 1% in stickstoffarmen Medium gestartet und ebenfalls die Polymerisation über 1 Woche beobachtet.

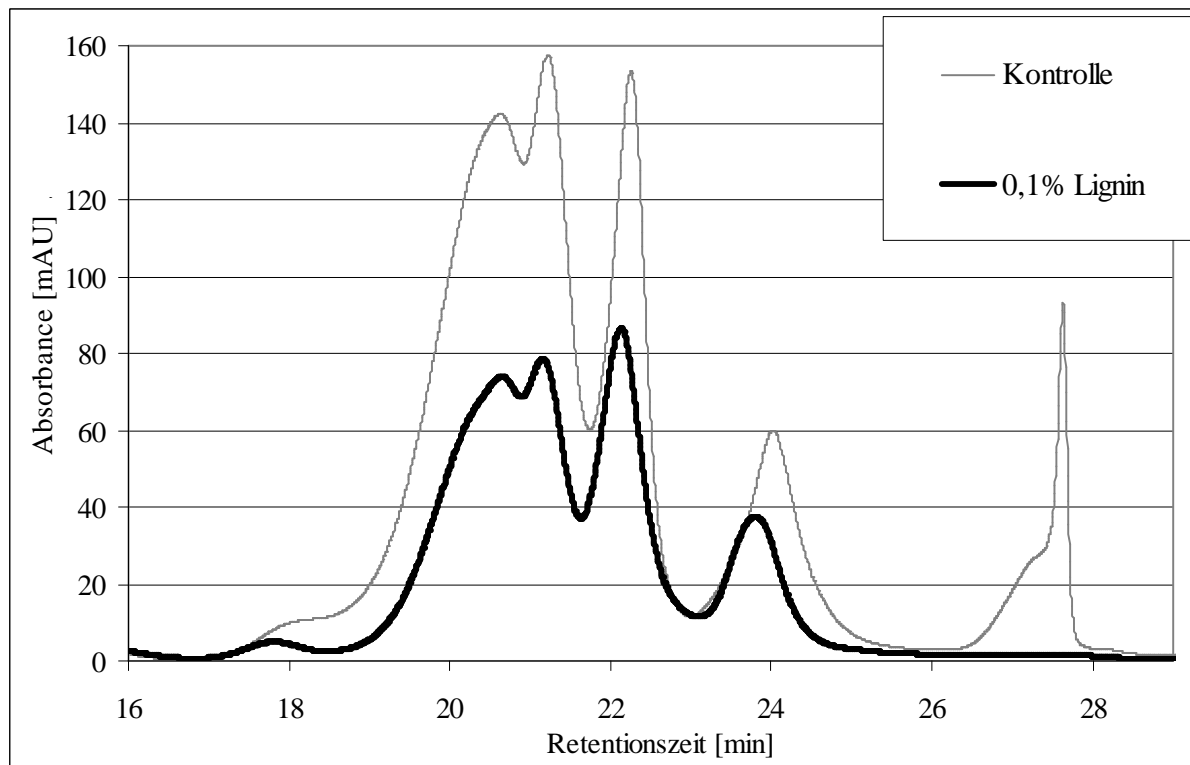


Abbildung 19: GPC Messung der 0,1%igen Ligninprobe

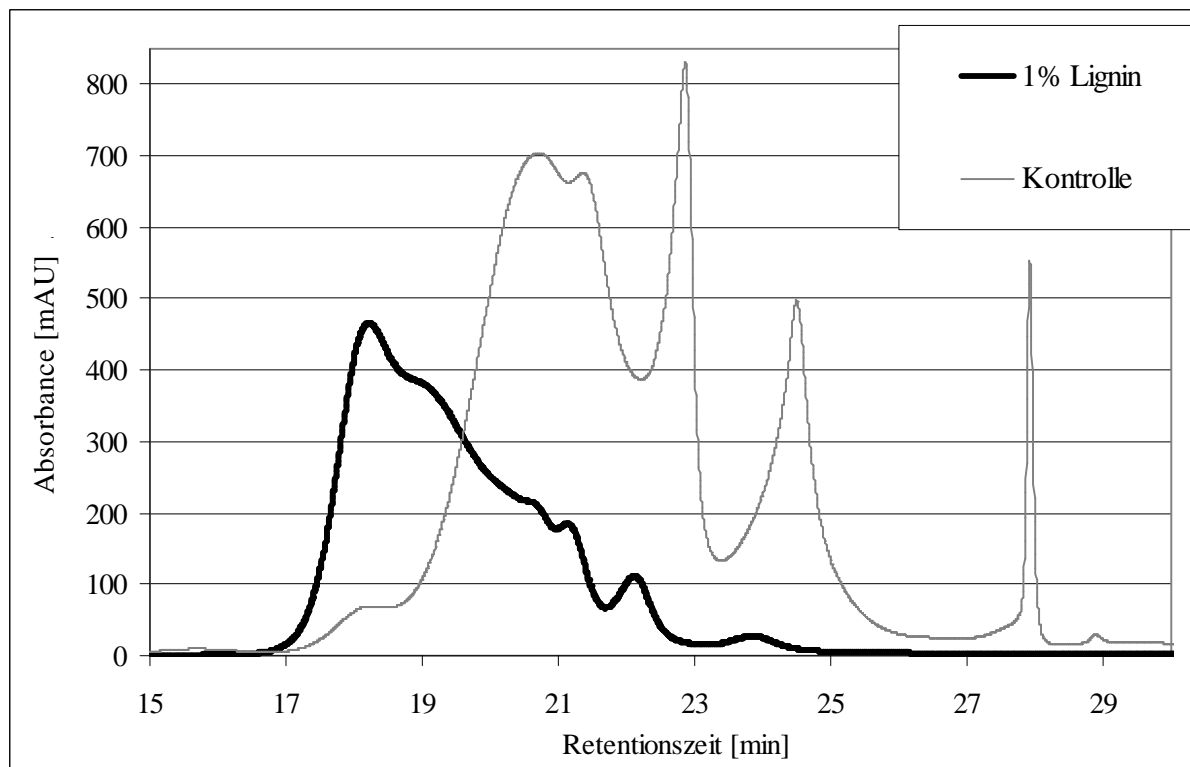


Abbildung 20: GPC Messung der 1%igen Ligninprobe

Tabelle 24: Molekulargewichte der 0,1 und 1%igen Ligninprobe

	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	D
0,1% Lignin			
Kontrolle	569	779	1,6
0,1% Probe	654	1034	1,4
1% Lignin			
Kontrolle	1009	1267	1,3
1% Probe	2227	8471	3,8

In Abbildung 19 ist deutlich zu erkennen, dass die Peaks der Kontrolle und die der modifizierten 0,1%igen Ligninprobe die gleiche Gestalt haben, nur die Gesamtabsorption ist deutlich gesunken. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bereits ein Abbau des Lignins stattgefunden hat, jedoch nicht wie erwünscht polymerisiert wurde. Diese Er-

gebnisse sind auch in Tabelle 24 bestätigt: das mittlere Molekulargewicht ist im Vergleich zur Kontrolle nahezu unverändert.

Bei der Reaktion mit 1% Ligninkonzentration gibt es eine Verschiebung der Kurve in Richtung kürzerer Retentionszeiten, daher ein Zuwachs an höhermolekularen Anteilen.

3 Analytik

3.1 OH-Messung

Zur Bestimmung der Hydroxylgruppen wird das Reagenz Folin Ciocalteus (FC) verwendet. Durch dessen Reaktion mit den OH Gruppen im Ligninmolekül ist es möglich aufgrund von Messung der Intensität der Farbe am Photometer, auf den Gehalt an OH-Gruppen zu schließen.²⁸

Das FC Reagenz wird 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt. Davon werden 1,5 ml gemeinsam mit 0,5 ml der Ligninproben gemischt und 15 ml destilliertes Wasser zugegeben. Diese Mischung wird 8 Minuten stengelassen. Anschließend werden in einem 25 ml Messkolben zu dieser 5 ml 20%ige Natriumcarbonatlösung hinzugefügt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Für 2 Stunden wird diese Mischung stengelassen. Anschließend erfolgt die Farbmessung am Photometer bei einer Wellenlänge von 760 nm. Die Mittelwerte der Messwerte sind in Tabelle 25 dargestellt. Mithilfe von Gleichung 2 wird der OH-Gruppengehalt berechnet.

Zur Kalibration wird eine Vanillinlösung bekannter Konzentration vermessen und anschließend die Steigung aus der Geradengleichung (Abbildung 21) berechnet und abgelesen. Die Steigung beträgt 7,76.

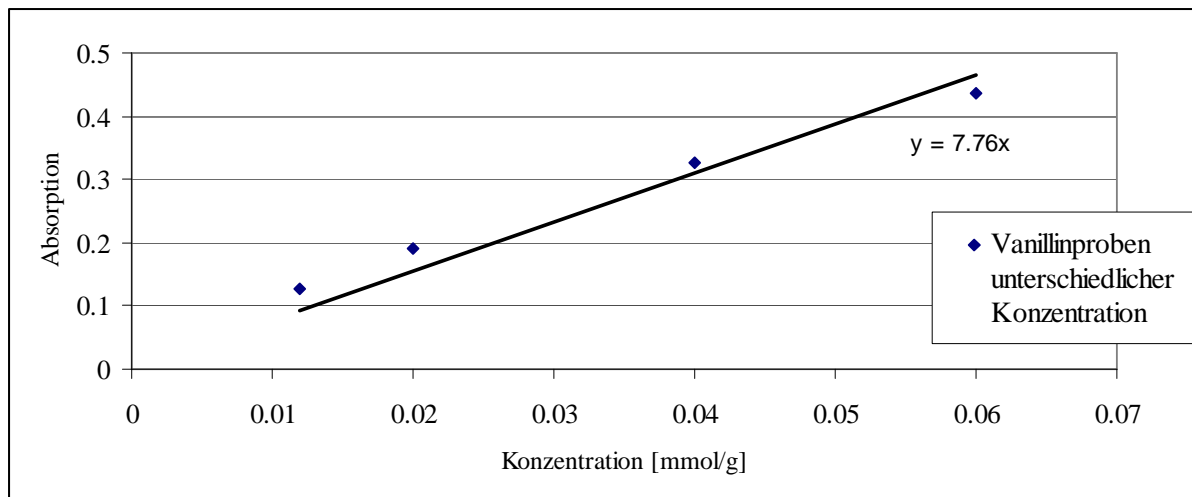


Abbildung 21: Kalibrationsgerade

Gleichung 2: Gleichung zur Berechnung der OH-Konzentration

$$c = \frac{Abs \cdot f}{k \cdot m}$$

c... Konzentration [mmol/g Probe]

Abs... Absorption [-]

k..... Steigung = 7,76 [l/mmol]

f..... Verdünnungsfaktor [ml]

m..... Probenmasse [mg]

Nachdem Gleichung 2 für die Absorption in einer 1 cm dicken Küvette gegeben ist, aber die Versuchsreihe mit einer 0,5 cm Küvette durchgeführt wird, müssen die Ergebnisse zum Schluss mit dem Faktor 2 multipliziert werden.

Tabelle 25: Photometermesswerte und Ergebnisse der OH-Bestimmung

	m [mg]	Absorption [760 nm]	f [ml]	c [mmol/g]
Kontrollprobe	514,9	1,5465	2500	1,936
Pilzprobe	35124,4	0,5765	89250	0,378
Laccaseprobe	3992,7	1,2875	2500	0,209

Aus Tabelle 25 ist zu erkennen, dass die Konzentration der OH-Gruppen sowohl bei den mit Laccase polymerisierten Proben als auch bei den mit Pilz polymerisierten Proben stark gesunken ist.²⁵

Da durch Polymerisierung mit dem Pilz auch andere Enzyme auf das Lignin einwirken und nicht nur das reine Laccaseenzym liegt die Konzentration an OH-Gruppen am Ende ein wenig höher.

Schlussendlich ist der Unterschied jedoch so gering, dass beim Abbau der OH-Gruppen, sowohl die Laccasepolymerisation als auch die Pilzpolymerisation als geeignet angesehen werden können.

3.2 SO₃-Titration

Die Bestimmung des Gehalts an Sulfonsäuregruppen erfolgt mittels konduktometrischer Titration.²⁹ Hierzu muss zunächst mithilfe eines Ionentauschers das Magnesiumion aus dem Magnesiumlignosulfonat entfernt werden, damit die Sulfonsäuregruppen freiliegen und gemessen werden können.

Als Ionentauscher wird Amberlit IR-120 verwendet. Dieser wird einige Male mit Wasser gespült bis die rosa Verfärbung des Wassers nachgelassen hat. Von den Ligninproben (aus den optimierten Versuchen mit Pilz und Laccase) und auch von der Originalprobe wird 1 g genommen und in 25ml Wasser aufgelöst. Anschließend wird dies zum Ionentauscher dazugemischt. Diese Mischung wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird der Ionentauscher abfiltriert. Die wässrige Ligninlösung wird am Rotavapor so weit eingeeengt, dass das gewonnene Ligninpulver zur Titration herangezogen werden kann.

Zur Titration werden 0,3 g dieser Ligninprobe in 350 ml einer 0,001M NaCl Lösung aufgelöst und mit 10 ml einer 0,1M HCl versetzt. Der Titrant ist eine 0,1M NaOH. Deren Verbrauch wird bestimmt und in ein Diagramm eingetragen (Abbildung 22). Der erste Knickpunkt A in der Kurve entspricht dem Gehalt an Sulfonsäuregruppen in der Ligninprobe. Der zweite Knickpunkt, der Endpunkt B beschreibt den gesamten Säuregehalt, d.h. Sulfonsäure- und Carboxylgruppen. Berechnet wird der Gehalt in beiden Fällen nach Gleichung 3. In Tabelle 26 sind die Messergebnisse und in Tabelle 27 die Ergebnisse der Berechnung dargestellt.

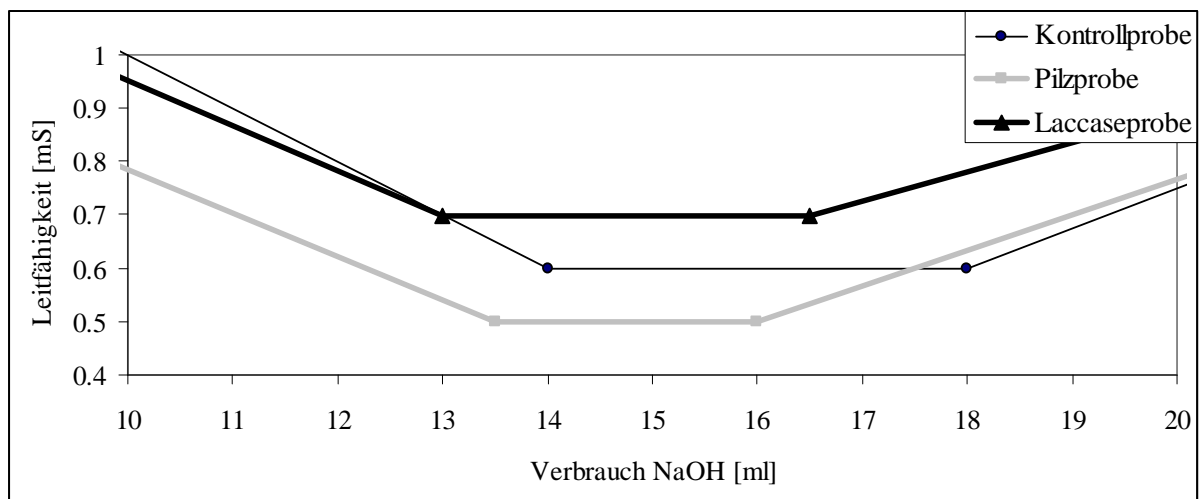


Abbildung 22: Titrationskurven zum Ablesen der Knickpunkte A und B aller Proben

Gleichung 3: Formel zur Berechnung der Sulfonsäuregruppenkonzentration

$$[SO_3] = \frac{A \cdot M_1 - V \cdot M_2}{W}$$

[SO₃] Sulfonsäuregruppenkonzentration [mmol/kg] bzw. [SO₃+COOH]

A. erster Endpunkt der Titration [ml] bzw. B zweiter Knickpunkt der Titration [ml]

M₁... Molarität der NaOH []

M₂.....Molarität der HCl []

V.....HCl Volumen [ml]

W.....Gewicht der Probe [kg]

Tabelle 26: Messwerte der Titration

	W [kg]	A [ml]	M ₁ [mol/l]	M ₂ [mol/l]	V [ml]	B [ml]
Kontrolle	0,3023*10 ⁻³	14	0,1033	0,097	10	18
Laccase	0,2615*10 ⁻³	13	0,1033	0,097	10	16,5
Pilz	0,3011*10 ⁻³	13,5	0,1033	0,097	10	16

Tabelle 27: Ergebnisse der Titration

	Sulfonsäurekonzentration [mmol/kg]	Gesamtkonzentration an Säuregruppen [mmol/kg]
Kontrollprobe	1580	2940
Laccaseprobe	1430	2810
Pilzprobe	1410	2270

Wie aus Tabelle 27 zu sehen, hat die Konzentration der Sulfonsäuregruppen durch die Polymerisierung des Lignosulfonats mit Pilz als auch mit Laccase abgenommen. Interessant ist auch, dass durch den Pilz und die Laccase die Sulfonsäuregruppen in etwa gleich stark reduziert werden. Ist das Ziel den Sulfonsäureanteil zu senken, spielt es also kaum eine Rolle, ob dies mit dem Pilz oder der Laccase erreicht wird.

Bei den Ergebnissen für den gesamten Säureanteil (Sulfonsäure- und Carboxylgruppen) ist zu erkennen, dass die Pilzprobe viel niedrigere Werte als die Laccaseprobe aufweist. Dies kann entstanden sein, da bei der Polymerisierung mit dem Pilz nicht nur die wirksame Laccase, sondern eine Vielzahl an anderen Enzymen vorhanden ist, welche die Carboxylgruppen abbauen können.

3.3 FT-IR Analyse

In der Polymerchemie stellt die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie eine vielseitige und weit verbreitete Analyseverfahren dar. Durch FT-IR können je nach gewähltem Wellenbereich verschiedene stark polare Gruppen, wie zum Beispiel Carboxyl- oder Hydroxylgruppen, an einem Molekül gut nachgewiesen werden.³⁰

Für die Durchführung der Messung werden KBr Presslinge hergestellt. Das Mischungsverhältnis von Kaliumbromid zur Ligninprobe beträgt 100:1, es werden 300 mg KBr mit 3 mg Ligninprobe gut verrieben und für 2 Minuten unter einer Last von 2 t verpresst.

Anschließend erfolgt die Messung auf einem Perkin Elmer System 2000 FT-IR und die Aufnahme des Spektrums in einem Wellenlängenbereich zwischen 600 cm^{-1} und 4000 cm^{-1} .

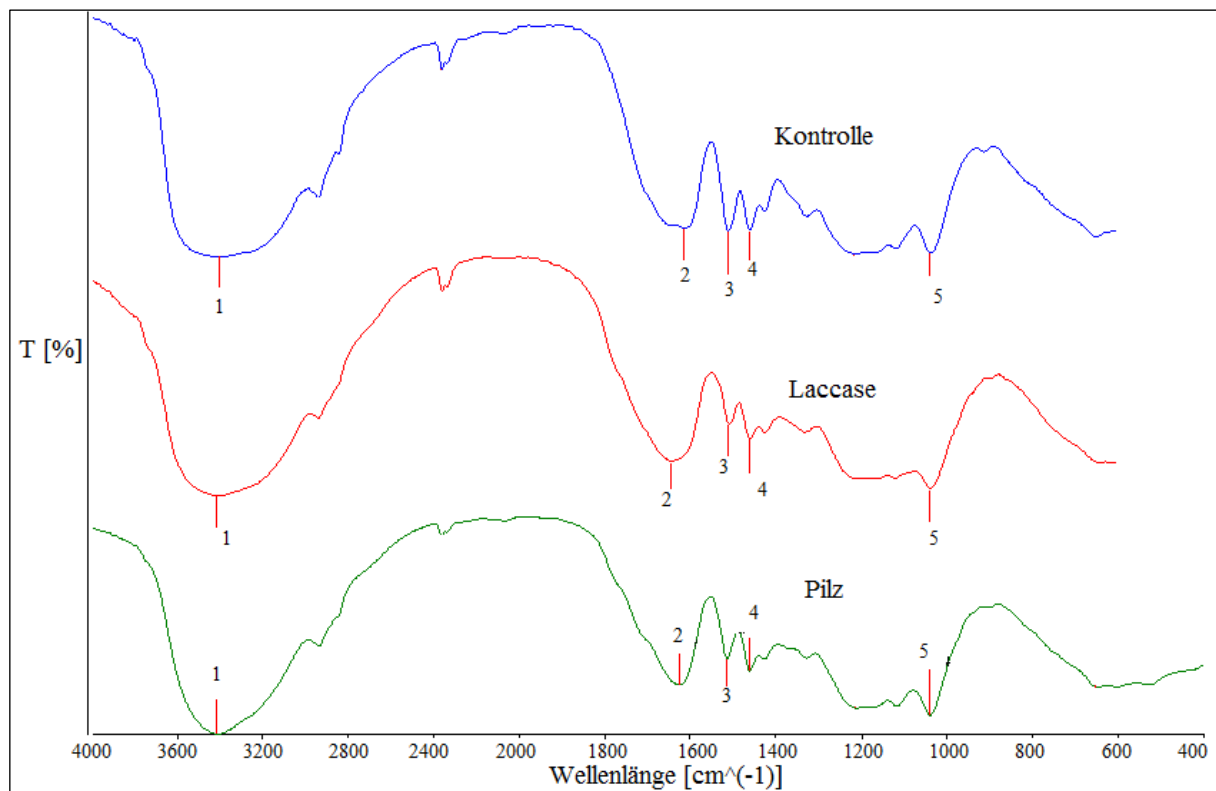


Abbildung 23: FT-IR Spektrum der Laccase und Pilz modifizierten Probe

Tabelle 28: Ergebnisse der FT-IR Analyse

	Peak 1 [cm ⁻¹]	Peak 2 [cm ⁻¹]	Peak 3 [cm ⁻¹]	Peak4 [cm ⁻¹]	Peak5 [cm ⁻¹]
Kontrolle	3401,86	1613,61	1511,96	1461,52	1039,02
Laccase	3416,83	1645,96	1509,49	1460,80	1039,48
Pilz	3417,49	1624,54	1515,21	1461,68	1040,34
	O-H Streck- schwingung	C=O Schwingung	Aromat. Skelett- schwingung	C-H Deformations- schwingung	Aromat. C-H Deformations- schwingung

Die in Abbildung 23 nummerierten Peaks sind in Tabelle 28 detailliert aufgelistet und den zugehörigen Schwingungen zugeordnet. Über einer Wellenlänge von 1600 cm⁻¹ sind deutlich die Peaks 1 und 2 zu erkennen, die den Carbonyl- bzw. Hydroxylgruppen zugeordnet werden können. Es ist eine leichte Verschmälerung des Peaks der O-H-Streckschwingung zu sehen, was möglicherweise, wie auch durch andere Analysemethoden gezeigt, auf eine Reduktion an Hydroxylgruppen hinweist.

Der Bereich unter 1510 cm⁻¹ beschreibt den aromatischen Anteil von Lignin. Ein deutlicher Unterschied zwischen dem nicht modifizierten Lignin und dem mit Pilz und Laccase modifizierten Lignin ist bei Peak 3 zu erkennen, welcher deutlich abnimmt

3.4 Simultane thermische Analyse (STA)

Unter der Simultanen Thermischen Analyse versteht man eine Kombination aus TGA (Thermogravimetrische Analyse) und DSC (Dynamische Differenz Kalorimetrie) Messungen.³¹ Durch die Durchführung beider Messungen an einem Gerät mit nur einer einzigen Messung erhält man vergleichbare und korrelierbare Ergebnisse, da gleiche Messbedingungen herrschen und auch unterschiedliche Probenpräparation ausgeschlossen ist. Dadurch ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben.

Die Durchführung erfolgt auf einem Gerät der Firma Netzsch. Die wichtigsten Geräteeinstellungen und Parameter sind in Tabelle 29 angeführt.

Tabelle 29: Geräteeinstellungen und Parameter bei der STA Messung

Probenmasse [mg]	Kontrolle	8.1 mg
	Laccase	10.5 mg
	Pilz	9.8 mg
Tiegelmaterial	Aluminium, ohne Deckel	
Atmosphäre	Helium	
Heizrate [K/min]	10	
Temperaturprogramm	1. Aufheizen: von Raumtemperatur bis 120°C	
	2. Aufheizen: von -100°C bis 400°C	

Für die STA Messung werden die Proben nach der Behandlung mit dem Ionentauscher verwendet. Zur Vorbereitung werden sie für 3 Tage im Trockenschrank gelagert, anschließend erfolgt die Messung.

Beim ersten Aufheizen von Raumtemperatur auf 120°C entweicht das Wasser aus den Proben. Nach dem anschließenden Abkühlen auf -100°C wird der Massenverlust durch langsames Aufheizen auf 400°C beobachtet.

Zur Bestimmung des Glasübergangs wird von der DSC Kurve die erste Ableitung gebildet und die auftretenden Peaks näher betrachtet. Hierbei ist in allen 3 Proben sehr deutlich an je 2 Stellen ein eindeutiger Peak zu erkennen. Dieser wird ausgewertet und die Temperatur im Glasübergang berechnet. Die Diagramme sind in Abbildung 24 zusammengefasst und die Ergebnisse für die Glasübergangstemperatur in Tabelle 30 dargestellt.

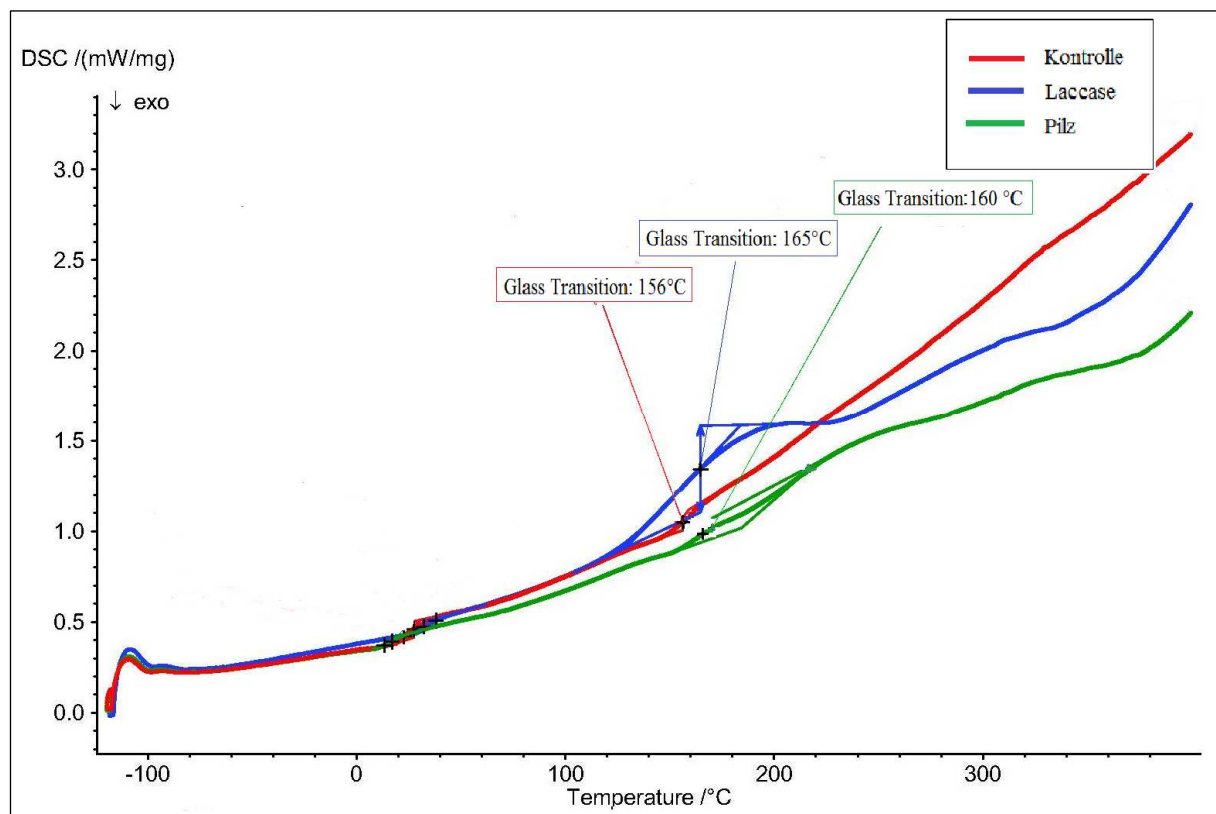


Abbildung 24: Ergebnisse der DSC Messung

Tabelle 30: Glasübergangstemperaturen

	Glasübergangstemperatur [°C]
Kontrolle	156
Laccase	165
Pilz	160

Bei dem ersten angezeigten Temperaturbereich in Abbildung 24 handelt es sich nicht um einen Glasübergang. Bei dieser Temperatur entweichen in allen Proben niedermolekulare Begleitstoffe. Der Glasübergang aller Proben liegt zwischen 156 und 165°C. Es lässt sich gut erkennen, dass bei der Laccaseprobe und der Pilzprobe die Glasübergangstemperatur eindeutig höher ist als bei der ursprünglichen Ligninprobe. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Laccase- und Pilzprobe einen höheren Polymerisati-

onsgrad aufweisen und stärker vernetzt sind. Wie schon durch SEC Messungen nachgewiesen besitzt die mit Laccase modifizierte Probe einen höheren Glasübergang als die durch den Pilz modifizierte Probe, was wiederum zeigt, dass durch Laccase viel höhere Polymerisationsgrade erreicht werden können als durch Pilze.

4 Hydrophobierung von Lignosulfonat

Möchte man Ligninverbindungen als Bitumenersatzstoff bzw. als Beimischung zum herkömmlichen Bitumen verwenden, ist zu beachten, dass diese dauerhaft der Witterung ausgesetzt sind. Lignosulfonat weist jedoch eine sehr gute Löslichkeit in Wasser und anderen organischen Lösungsmitteln auf. Funktionelle Gruppen wie Sulfonsäure-, Hydroxid- und Carboxylgruppen tragen zu diesem Verhalten bei. Daher ist unter anderem die Hydrophobierung des Ligninmoleküls von besonderer Bedeutung.

Da das Ligninmolekül sehr groß ist und eine komplexe Struktur aufweist, ist die Idee nur die Randgruppen durch hydrophobe Molekülteile zu ersetzen. Somit entsteht die Struktur eines Micells: der äußere Molekülteil ist hydrophob, der Innere hydrophil.

Dieses Funktionalisieren des Ligninmoleküls soll mit Bio-Grafting erfolgen.³² Bio-Grafting bedeutet, dass das Einbringen von funktionellen Gruppen mithilfe von Enzymen erreicht wird. Der Mechanismus hierbei besteht auf der Bildung von Radikalen. Das Laccaseenzym soll im Ligninmolekül und dem Molekül mit den hydrophoben Randgruppen Radikale erzeugen und somit eine Verbindung beider ermöglichen. In Abbildung 25 ist das Reaktionsschema dargestellt. Als Molekül mit hydrophoben Randgruppen wird die Verbindung *N*-[(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl) methyl] nonanamide (kurz: Nonivamid) gewählt.

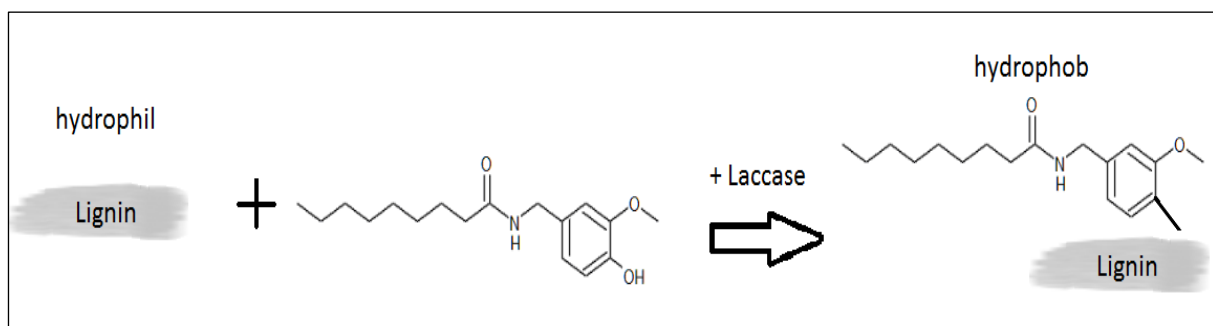


Abbildung 25: Reaktionsschema Bio-Grafting mit Nonivamid

Um besser verfolgen zu können wie gut das Nonivamid mit dem Lignosulfonat reagiert, wurde das Nonivamidmolekül radioaktiv markiert. Somit kann am Ende der Versuchsreihen erkannt werden, ob die Reaktion von Lignosulfonat mit Nonivamid erfolgreich war.

4.1 Durchführung der Hydrophobierung

Alle in Tabelle 31 erwähnten Komponenten werden miteinander vermischt und durch Zugabe von Laccase wird die Reaktion gestartet. Für den weiteren Reaktionsverlauf werden die Reaktionsansätze zur gleichmäßigen Durchmischung aller Inhaltsstoffe auf einen Schüttler (200 r/min) bei Raumtemperatur (25°C) gestellt.

Tabelle 31: Reaktionsansatz für die Hydrophobierung

Chemikalie	Endkonzentration Probe	Endkonzentration Kontrolle
Ethanol	42%	42%
Natriumacetatpuffer	140 mM	140 mM
¹⁴C Nonivamid	1,2 mM	1,2 mM
Nonivamid	4,8 mM	4,8 mM
Lignosulfonat	1%	-
Laccase	5 U/ml	-
Gesamtmenge	0,25 ml	0,25 ml

Nach 24 Stunden Reaktionszeit wird in der Probe ein bräunlicher Niederschlag beobachtet. Der Theorie nach sollte es sich hierbei um das hydrophobierte Lignosulfonat handeln. Auch in der Kontrollprobe ist eine weißliche Trübung zu erkennen. Zur Überprüfung wird jede Probe zentrifugiert und der Niederschlag abgetrennt. Der klare Überstand wird zu den weiteren Messungen herangezogen. Im nächsten Schritt wird mit Natriumhydroxid ein pH von 12 eingestellt. Dabei entsteht eine Trübung, welche erneut abgetrennt wird.

Anschließend wird die GPC Messung mit 25 μl Injektionsvolumen gestartet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt. Jede Probe wird für 1 Stunde vermessen und gleichzeitig in einem Abstand von 30 Sekunden Proben zu je 0,5 ml aufgefangen. Jede der gesammelten Fraktionen wird mit 1 ml Scintillationscocktail versetzt und ist somit bereit zur Radioaktivitätsmessung (Ergebnisse: Abbildung 27). Die Messdauer je Fraktion beträgt 5 Minuten.

4.2 Ergebnisse der Hydrophobierung

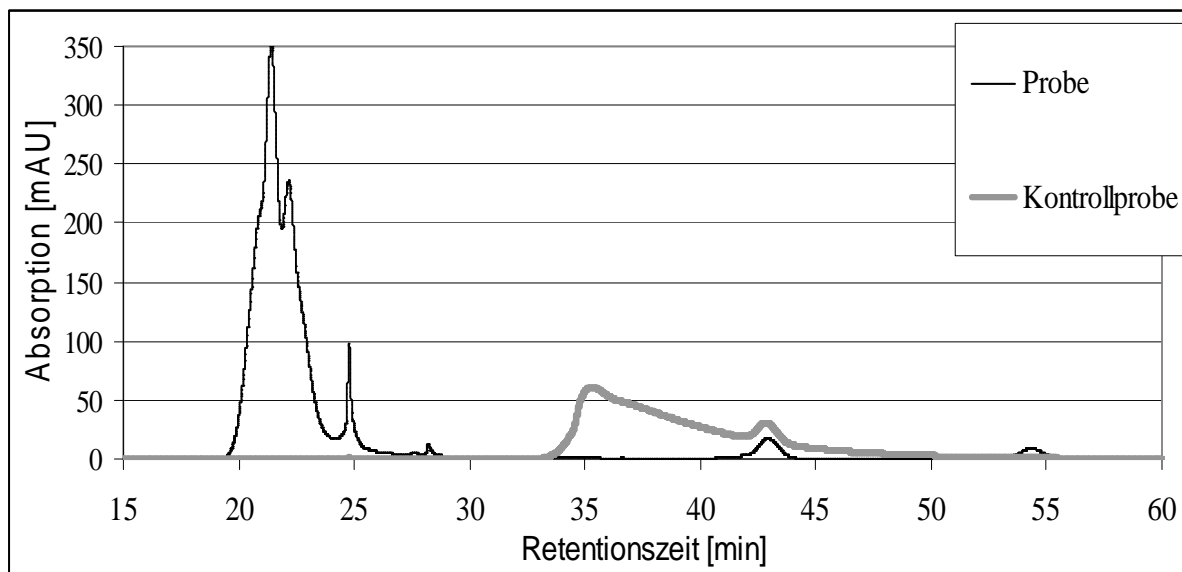


Abbildung 26: Ergebnisse der GPC Messung

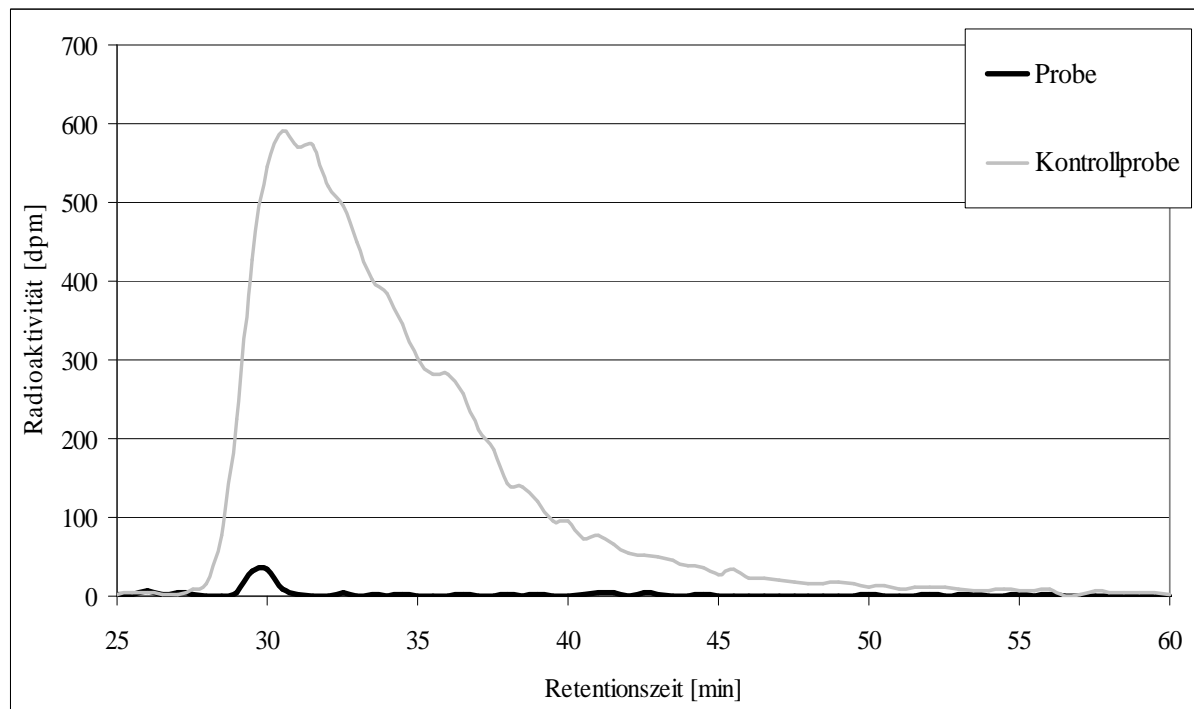


Abbildung 27: Ergebnisse der Radioaktivitätsmessung

Bei der Radioaktivitätsmessung wurde eine Gesamtradioaktivität im Überstand der Kontrollprobe von 8900 dpm gemessen, bei der Probe ein Wert von 220 dpm. Insgesamt war in beiden Fällen der Ausgangswert beim Start der Versuche 16900 dpm.

4.3 Interpretation der Ergebnisse

Da die Kontrollprobe am Ende des Versuches nur noch eine Radioaktivität von 8900 dpm aufweist, mag daran liegen, dass zwei Mal im Laufe der Durchführung eine weißliche Trübung aufgetreten ist, welche abfiltriert werden musste. Dadurch kann auch ein Verlust an radioaktivem Material entstanden sein.

Weiters sind während der GPC Messung Druckschwankungen aufgetreten, welche das Ergebnis möglicherweise auch beeinflusst haben. Idealerweise sollte man vor weiteren Versuchen überlegen, ob es hier nicht zu Wechselwirkungen zwischen dem Säulenmaterial und dem Nonivamid gekommen ist. Um dies herauszufinden wäre es notwendig ebenfalls die Niederschläge der Probe und der Kontrollprobe aufzuarbeiten und die

Messergebnisse von Niederschlag und Überstand zu summieren. Dies war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Im Vergleich der Kontrollprobe zur Probe ist jedoch ein deutlicher Unterschied zu erkennen, was daraus schließen lässt, dass eine Reaktion des Lignosulfonats mit Nonivamid stattgefunden hat. Der Messwert der Radioaktivität der Probe von 220 dpm ist im Verhältnis zur eingesetzten Anfangskonzentration von 16900 dpm relativ klein. Es wird sich hierbei um Reste von Nonivamid handeln die nicht vollständig reagiert haben. Auch aus der GPC Messung (siehe Abbildung 26) kann man erkennen, dass im Überstand der Probe noch Lignin vorhanden ist.

Um weiter Klarheit zu bekommen ist auch ein größerer Ansatz von Bedeutung. Der Niederschlag könnte somit auch einer Kontaktwinkelmessung unterzogen werden. Bei einem gemessenen Winkel über 90° kann man hier von einer erfolgreichen Hydrophobierung ausgehen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Idee der Hydrophobierung erfolgreich zu sein scheint, jedoch die noch offenen Fragen durch weitere und genauere Versuchsreihen zu klären sind.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Polymerisation von Lignosulfonat der Firma Lenzing untersucht. Durchgeführt wurden die Polymerisationen mit Laccase und Pilzen im Vergleich und mittels GPC Analysen die Molmasse bestimmt. Nach der Bestimmung der geeigneten Versuchsparameter wurden weitere Analysemethoden gewählt, um die Abnahme an Hydroxyl- und Säuregruppen zu zeigen.

Polymerisation mit Laccase

Bei den Polymerisierungsversuchen mit Laccase wurden verschiedene Parameter wie Laccasekonzentration, Ligninkonzentration, Reaktionszeit, und die Wirkung von Citratpuffer und HBT-Mediator ausgetestet. Die Beurteilung der Polymerisation erfolgte mithilfe der Bestimmung der Molmasse aus GPC-Analysen.

Es wurde festgestellt, dass der Einsatz von HBT keinen allzu großen Einfluss auf die Polymerisierung ausübt. Die Bildung an Radikalen an der Oberfläche der Ligninmoleküle durch das Laccaseenzym reicht aus, um eine Polymerisierung zu erhalten. HBT spielt daher erst eine wichtige Rolle, wenn es um den Abbau des Lignins geht.

Weiters wurde zur Konstanthaltung des pH Wertes während der Reaktion der Einfluss von Citratpuffer untersucht. Zunächst wurde festgestellt, dass sich höhere Pufferkonzentrationen positiv auf die Polymerisierung auswirken. Im Vergleich jedoch zum ungedufferten System war deutlich zu erkennen, dass ohne Citratpuffer noch höhere Polymerisationsgrade erreicht werden können.

Da Laccasen in der Lage sind Lignin vollständig abzubauen war die Bestimmung der idealen Reaktionszeit ein wichtiger Punkt. Am Anfang der Reaktion werden Lignine von Laccase polymerisiert, danach erst setzt der Abbau ein. Nach 2 Stunden Reaktionszeit konnte man erkennen, dass die Polymerisation schon fast vollständig abgeschlossen war, aber in weiterer Folge noch geringfügig anstieg. Somit wurde eine ideale Reaktionszeit von 4 Stunden ermittelt, ab dieser war ein Abbau deutlich bemerkbar. Hinsichtlich Lignosulfonat und Laccasekonzentration wurde festgestellt, dass sich höhere Konzentrationen beider Komponenten positiv auf die Polymerisation auswirken.

Somit wurden 10% Lignosulfonat in Kombination mit einer Laccaseaktivität von 50 U/ml eingesetzt.

Zur weiteren Analyse wurde die Änderung der Hydroxyl- und Säuregruppen im Laufe der Polymerisation gemessen. Die Bestimmung der Hydroxylkonzentration erfolgte mithilfe des Folin Ciocalteus Reagens. Die Sulfonsäure- und Carbonylgruppen wurden durch konduktometrische Titration ermittelt.

In Tabelle 32 sind die Ergebnisse der Polymerisation bei idealen Parametern dargestellt.

Tabelle 32: Zusammenfassung der Polymerisation durch Laccase

	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	D	OH- Gruppen [mmol/g]	SO₃- Gruppen [mmol/g]
Nicht modifiziertes Lignosulfonat	1138	3826	3,4	1,936	1,58
Mit Laccase polymeri- siertes Lignosulfonat	4018	22570	5,6	0,209	1,43

Polymerisation mit Pilzen

Bei der Polymerisation mit Pilzen wurde zunächst die Wirkung von *Gloephyllum trabeum* mit *Trametes pubescens* verglichen. Durch die Braunfäule *Gloephyllum trabeum* konnte Lignin nicht polymerisiert werden. Somit wurden alle weiteren Versuche zur Bestimmung der idealen Reaktionsparameter mit *Trametes pubescens* durchgeführt.

Bis zu einer Reaktionszeit von 1 Woche in einem stickstoffarmen Medium wurde ein Anstieg der Polymerisation beobachtet, danach setzte der Abbau des Lignins ein. Bei der Ermittlung der geeigneten Ligninkonzentration wurde festgestellt, dass bei einer Ligninkonzentration von 1% die besten Polymerisationsergebnisse erzielt werden können.

Abschließend wurden auch hier Hydroxyl- und Säuregruppen vor und nach der Polymerisation bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 dargestellt.

Tabelle 33: Ergebnisse der Polymerisation durch Pilze

	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	D	OH- Gruppen [mmol/g]	SO₃- Gruppen [mmol/g]
Nicht modifiziertes Lignosulfonat	1009	1267	1,3	1,936	1,58
Mit Pilz polymerisiertes Lignosulfonat	2227	8471	3,8	0,378	1,41

Vergleich der Polymerisation durch Laccase und Pilz

Vergleicht man die Ergebnisse der Molmassen von Laccase und Pilz polymerisiertem Lignin, so ist zu erkennen, dass die Polymerisation durch Laccase zu höheren Molmassen führt. Weiters ergibt die Laccasepolymerisation hinsichtlich Hydroxylgruppenkonzentration geringere Werte. Bei der Sulfonsäurekonzentration werden ähnliche Ergebnisse sowohl durch Laccase- als auch durch Pilzpolymerisation erzielt.

Weiters ist die Durchführung der Laccaseversuche deutlich einfacher. Auch die kürzere Reaktionszeit und der Einsatz höherer Ligninkonzentrationen sind bei Laccaseversuchen von Vorteil.

Hydrophobierung

Da es sich bei Lignosulfonat um ein hydrophiles Molekül handelt wurden Versuche gestartet um dieses zu hydrophobieren. Als Prinzip wurde Bio-grafting gewählt. Dafür wurde mit Hilfe von Laccase, Nonivamid als hydrophobe Randgruppe auf die Oberfläche des Ligninmoleküls aufgebracht.

Um sicherzustellen, dass es sich beim während des Versuches ausgefallenen Feststoff um hydrophobes Lignin handelt wurde Nonivamid radioaktiv markiert. Somit konnte

die Radioaktivität des Überstandes über dem Niederschlag vermessen werden. Hierbei wurden nur geringe Werte für die Radioaktivität festgestellt, was zeigt, dass die Hydrophobierung erfolgreich war. Um aber genauere Aussagen treffen zu können sind weitere detaillierte Versuche notwendig.

Chemikalienliste

ABTS (4mM Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure); (A1227 Sigma-Aldrich)
Malz Extrakt Agar (Fluka)
Amberlit IR-120 (Sigma Aldrich)
Citronensäuremonohydrat (Fluka)
D-Glucose Monohydrat (Fluka)
Folin Ciocalteus Phenol Reagen (Sigma Aldrich)
Gloephyllum trabeum CBS 900.73
HBT 1-Hydroxybenzotriazole Hydrate (Fluka)
Hefeextrakt (Fluka)
Kaliumbromid
Kupfersulfat (Fluka 61240)
Laccase (Filtrat von *Trametes pubescens* (CBS 696.94), Aktivität 422 U/ml)
Magnesiumlignosulfonat: Abfallprodukt aus dem Sulfitaufschluss (Firma Lenzing)
Magnesiumsulfat-heptahydrat
Natriumcarbonat
Natriumchlorid
Natriumhydroxid
Nonivamid, N-Vanillylnonanamid (Sigma-Aldrich)
Pepton 70174, Pepton 82962 (Fluka)
Phosphorsäure 85%
Salzsäure (Sigma-Aldrich)
Scintillationscocktail : Emulsifier Safe, OptiPhase , 'HiSafe 3' (Perkin Elmer)
Trametes pubescens (MB89) CBS 696.94

Material, Geräte

Autoklav (Cetro Clav) Typ CV-EL 10LI12L

Celluloseacetat Filter (Iwaki Glass); 0,45 µm; 25 mm, steril, 5,3 kg/cm² Maximaldruck

Filtrationsmembran (PALL Centramate); SUPOR TFF 0,45 µm; OMEGA

FT-IR (Perkin Elmer System 2000)

STA (DSC- und TGA-Messungen) Analyse-Apparatur von Netzsch (STA 449 F1 Jupiter)

GPC Messungen: HPLC 1200, Eluent: 10 mM NaOH, Laufmittelfluß 1 ml/min

Säule: TOSH, TSKgel (PW Series, 1 Vorsäule, 1 Hauptsäule; Packungsmaterial: Polymetacrylat), Druck: 55 bar, Detektor: DAD (Diodenarray-Detektor)

Literaturverzeichnis

- 1 <http://www.bgfa.ruhr-uni-bochum.de/publik/info0202/bitumen.php>;30.06.2014.
- 2 http://www.bitumen-gestein.de/2_Einflussgr%F6%DFen.html; 30.06.2014.
- 3 Redelius, P.; *Asphaltenes in Bitumen, What They Are and What They Are Not; Road Materials and Pavement Design; Vol 10,Iss.sup1,2009.*
- 4 http://www.bp.com/de_de/germany/Produkte-und-Services/bp-bitumen/produkte-und-anwendungen/wissenswertes/was-ist-bitumen.html; 15.06.2014.
- 5 <http://de.wikipedia.org/wiki/Bitumen>; 30.06.2014.
- 6 Fengel, D.;Wegener, G.; *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions; De Gruyter; Berlin-New York 1984.*
- 7 Sarkanen, K. V.; Ludwig, C. H. (eds.); *Lignin, Occurrence, Formation, Structure*; Wiley-Interscience, New York 1971; pp45,66,75.
- 8 Nimz, H. H.; Tutschek, R.; *Holzforschung* 31; 1977; 101-106.
- 9 Saake, B.;Lehnen, R.; *Lignin*; Institut für Holzchemie; Bundesforstanstalt für Forst- und Holzwirtschaft; Hamburg.
- 10 Euring, M.; Einsatz von Mediatoren bei der enzymatischen Aktivierung der faserigen Bindekräfte zur Herstellung von enzymgebundenen, bindemittelfreien Holzwerkstoffen; Dissertation 2008; Georg-August-Universität Göttingen.
- 11 Freudenberg, K.; Neish, A. C.; *Constitution and Biosynthesis of Lignin*; Springer; Berlin-Heidelberg-New York 1968.
- 12 <http://de.wikipedia.org/wiki/Lignin>; 15.06.2014.
- 13 Kanhunen, P.;Rummakko, P.; Sipilä, J.; Brunow, G.; Kilpeläinen, I.;*Dibenzodioxocins; a novel type of linkage in softwood lignins*; Elsevier 1994.
- 14 Glasser, W. G.; Northey, R. A.; Schutz, P.; *Lignin: Historical, Biological, and Materials Perspectives*; ACS, 1999.

- 15 <http://www.biosicherheit.de/lexikon/810.lignin.html>; 30.06.2014.
- 16 Sena-Martins, G.; Almeida-Vara, E.; Duarte, J. C.; *Eco-friendly new products from enzymatically modified industrial lignins ; Industrial corps and products* 27 (2008) 189-195.
- 17 Martin, C.; *Biotransformation von Mikrokontaminaten durch aquatische Pilze; Dissertation 2008; Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg.*
- 18 Riva, S.; *Laccase: blue enzymes for green chemistry.;* Trends Biotechnol. 2006 May; 24(5):219-26.
- 19 Evans, C. S.;Dulton, M. V.; Guillen, F.; Veness, R.G. *FEMS; Microbiol. Rev.* 1994;13,2235.
- 20 Cho, N-S.; Shin, W.; Jeong, S-W;Leonowicz, A.; *Degradation of Lignosulfonate by Fungal Laccase with Low Molecula Mediators; Bull. Korean Chem. Soc.* 2004; Vol 25; No 10.
- 21 Bourbonnais, R.;Paice, M. G.; Freiermuth, B.; Bodie, E.; Bornemann, S.; *Appl. Environ. Microbiol.;* 1997; 63, 4627.
- 22 Call, H. P.; *PCT World Pat. Appl.;* WO94/29510, 1994.
- 23 Widsten, P.; Kandelbauer, A.; *Laccase applications in the forest products industry: A review; Enzyme and Microbial Technology; Vol.42; Issue 4; 2008; p 293-307.*
- 24 Herwig, C.; *Laborübungen: Bioverfahrenstechnik; Skriptum 2010.*
- 25 Areskog, D.;Li, J.;Gellerstedt, G.; Henriksson, G.; *Investigation of the Molecular Weight Increase of Commercial Lignosulfonates by Laccase Catalysis; Biomacromolecules* 2010; 11;904-910.
- 26 Margot, J.; Bennati-Granier, C.; Maillard, J.; Blaquez, P.; Barry, D.;Holliger, C.;*Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation; AMB Express* 2013; 3:63.
- 27 <http://www.holzfragen.de/seiten/braunfaeule.html>; 30.06.2014.
- 28 De Sousa, F.; Reimann, A.; Marianne, B.;Nilvebrant, N.-O-; *In Estimating the Amount of Phenolic Hydroxyl Groups in Lignins ; 11th Internationals Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Nice, France, 2001; pp 649-653.*
- 29 Beatson, R.P.;*Determination of Sulfonate Groups and Total Sulfur; Methods in*

- Lignin Chemistry p 473-483; Springer-Verlag 1992.
- 30 Faix, O.; Fourier Transform Infrared Spectroscopy; Methods in Lignin Chemistry p 81-106; Springer-Verlag 1992.
- 31 Hatakeyama, H.; *Thermal Analysis*; Methods in Lignin Chemistry p 200-214; Springer-Verlag 1992.
- 32 Widsten, P.; Kandelbauer, A.; Laccase applications in the forest products industry: A review; *Enzyme and Microbial Technology* 42 (2008) 293-307.