



DIPLOMARBEIT

Enzymatische und Biomimetische Depolymerisation von Lignin

ausgeführt am Institut für
Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften
der Technischen Universität Wien

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

durch
RAINER KROISMAYR
Obere Klaus 80
8970 Schladming

Wien, am 28. August 2015

Zusammenfassung

Der enzymatische Abbau von Lignin führt in vitro aufgrund der Repolymerisation radikalischer Abbauprodukte üblicherweise zu einer Erhöhung des Molekulargewichts der Ligninfraktion. In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte, aus Weizenstroh mittels eines neu entwickelten Organosolv-Verfahrens hergestellte Ligninfraktionen während der enzymatischen Behandlung in einem Säulenreaktor einer räumlichen Trennung unterzogen, um die Repolymerisation zu verhindern. Dies scheint auch gelungen zu sein, jedoch bildeten sich temporär relativ stabile Abbauprodukte, die vermutlich außerhalb des Säulenreaktors wieder repolymerisierten. In der Folge wurden andere experimentelle Ansätze zur Depolymerisation von Lignin getestet. Eine davon war die Behandlung mit Proteasen auf Basis der Arbeitshypothese, dass Ligninmoleküle durch Proteine zu größeren Aggregaten vernetzt sein könnten. Es zeigte sich, dass die Proteasebehandlung nur bei bestimmten, sehr hochmolekularen Ligninfraktionen aus dem Organosolv-Verfahren einen signifikanten Einfluss auf das Molekulargewicht hat. Die drastische Abnahme des Molekulargewichts dieser Fraktion zeigt, dass hier Lignin stark mit Proteinen vergesellschaftet ist. Die Abbauprodukte haben unterschiedliche Molekulargewichte, die Polydispersität der Abbauprodukte nimmt stark zu. Ob tatsächlich eine Ligninvernetzung vorliegt, müsste allerdings durch Vergleich der absoluten Molekulargewichtsverteilungen auf Basis einer geeigneten Kalibration bestätigt werden. Die Anwendung des H_2O_2 -abhängigen (Mn-PSP-Cl)-Katalysators auf Lignin führte zu einer Erhöhung des Molekulargewichts M_w auf 150 % des Ausgangswerts. Die Erhöhung kann auf eine Repolymerisation von Spaltprodukten zurückgeführt werden. Bei Verwendung eines Vanadium-Katalysators in Dioxan war das Molekulargewicht der Ligninfraktion ebenfalls erhöht, jedoch entstand auch eine Abbaufraktion, wobei die geringe Peakbreite hier auf ein monomeres Produkt schließen ließ, das aber nicht weiter identifiziert wurde. Das vermeintliche Abbauprodukt blieb ohne räumliche Trennung stabil und repolymerisierte nicht mit dem verbleibenden Teil der behandelten Ligninfraktion. Weitere Versuche zeigten, dass sich der Einfluss des Vanadium-Katalysators auf das Abbauverhalten von Lignin durch Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel steuern lässt. Die Anwendung von Dioxan resultierte in einer Erhöhung des Molekulargewichts, wogegen die Verwendung von DMF als Lösungsmittel das Molekulargewicht des Ligninpolymers deutlich verringerte und die Ausbeute und Anzahl niedermolekularer Abbauprodukte erhöhte.

Abstract

In vitro the enzymatic degradation of lignin usually leads to an increase of the molecular weight of the lignin fraction due to the re-polymerization free-radical degradation products. In the present diploma thesis selected lignin fractions, derived from wheat straw by a newly developed organosolv process, were spatially separated during the enzymatic treatment in a column reactor to prevent degradation products from re-polymerization. This seems to be well managed, however, relatively stable temporarily degradation products re-polymerized again outside of the column reactor. In the following other experimental approaches for the depolymerization of lignin were tested. The treatment with proteases, which was based on the working hypothesis that lignin molecules could be crosslinked by proteins to form larger aggregates. It was found that the protease treatment has a significant influence on the molecular weight on a certain, very high molecular weight lignin fractions from the organosolv method only. The drastic decrease of the molecular weight of this fraction shows a strong association of lignin and proteins. The degradation products have different molecular weights, polydispersity of degradation products increases significantly. However, the presence of a crosslinked lignin structure, should be confirmed by comparison of the absolute molecular weight distributions based on an appropriate calibration. The use of H_2O_2 -dependent (Mn-PSP-Cl) catalyst on lignin led to an increase of the molecular weight Mw at 150% of the initial value. The increase can be attributed to a repolymerization of depolymerisation products. The use of a vanadium catalyst in dioxane leads to an increase in the molecular weight of the lignin fraction. However a degradation product detected with a small peak width refers to a monomeric product, which was not further identified. That presumed degradation product remained stable without spatial separation and did not repolymerizewith the remaining part of the treated lignin fraction. Further experiments showed that the influence of the vanadium catalyst on the degradation behavior of lignin can be controlled by the use of different solvents. The use of dioxane resulted in an increase of the molecular weight, whereas the use of DMF as solvent, leads to a significant decrease of the molecular weight of lignin polymers, whereas the yield and the number of low molecular weight degradation products increased.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	i
Zusammenfassung	i
Abstract	ii
Contents	iii
Danksagung	1
I Einführung	2
1 Einleitung	3
1.1 Überblick	3
1.2 Problemstellung	3
1.3 Lignin	3
1.3.1 Struktur von Lignin	4
1.3.2 Mikrobiologischer Abbau von Lignin	4
1.3.3 Ligninasen	6
1.3.4 Technischer Ligninabbau	11
2 Größenausschluss-Chromatographie	15
2.1 Prinzip der Größenausschluss-Chromatographie	15
2.1.1 Das durchschnittliche Molekulargewicht von Polymeren	15
2.1.2 Trennprinzip	16
3 Aufgabenstellung	19
II Versuchsteil	20
4 Enzymatische Depolymerisation von Lignin	21
4.1 Ligninabbau im Säulenreaktor	22
4.1.1 Versuchsaufbau	22
4.1.2 Durchführung	23
4.2 Proteasebehandlung von Lignin	24
4.2.1 Durchführung	24

5	Biomimetische Depolymerisation von Lignin	26
5.1	Mangan-Katalysator	26
5.1.1	Versuchsaufbau	27
5.1.2	Durchführung	27
5.2	Vanadium-Katalysator	27
5.2.1	Versuchsaufbau	27
5.2.2	Durchführung	28
6	HP-SEC	29
6.1	Geräteparameter	29
III	Ergebnisse und Diskussion	30
7	Enzymatische Depolymerisation von Lignin	31
7.1	Säulenreaktor	31
7.2	Proteasebehandlung von Lignin	34
8	Biomimetische Depolymerisation von Lignin	38
8.1	Mangan-Katalysator	38
8.2	Vanadium-Katalysator	39
8.2.1	Vanadium-Katalysator in Dioxan	39
8.2.2	Vanadium-Katalysator in DMF	39
IV	Appendix	42
	Abkürzungsverzeichnis	43
	Literaturverzeichnis	44

Danksagung

Diese Arbeit ist unter der Anleitung von *Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ewald Srebotnik* entstanden. Ihm und den Kollegen des Instituts für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit.

Ich widme diese Arbeit meinen *Eltern* und im Speziellen *Eva-Maria, Heinrich und Siegmar* in Liebe und Dankbarkeit.

Schladming im August 2015

Teil I

Einführung

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Überblick

In der zelluloseverarbeitenden Holzindustrie fällt Lignin als Begleitstoff an. Trotz intensiver Forschung wird Lignin in den meisten Fällen thermisch verwertet. Dies erscheint vor allem in Hinblick auf die hohe Verbrennungswärme von Lignin sinnvoll. Gegen eine energetische Verwertung sprechen allerdings funktionellen Eigenschaften von Lignin, die ein breites Anwendungsgebiet denkbar machen. Daher soll ausgehend von wirtschaftliche Überlegungen Lignin zu hochwertigen Produkten verarbeitet werden. Gerade im Hinblick auf alternative Lignozellulosequellen wie Stroh ist die Verwertung von Lignin für die Wirtschaftlichkeit ein Punkt von großer Bedeutung. Vor allem die aromatischen Grundbausteine liegen im Hauptblickfeld der Forschung.

1.2 Problemstellung

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Systeme zur Depolymerisation von Lignin entwickelt und untersucht. Lignin aus Weizenstroh wurde dabei enzymatisch oder katalytisch depolymerisiert. Da die Depolymerisation durch radikalische Reaktionen beschrieben wird, lag ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit in der Entwicklung eines Systems zur Verhinderung von Repolymerisationen.

Die Hauptanalysemethode zur Untersuchung des Depolymerisationsgrades war ein High Performance Size-Exclusion Chromatography (HP-SEC)-System.

1.3 Lignin

Lignin stellt neben Cellulose und Hemicellulose einen der drei Hauptbestandteile von Lignocellulosen dar. Lignin ist ein dreidimensionales, amorphes Polymer, dass in erster Linie aus den drei Monomeren p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol (Abbildung 1.1) aufgebaut ist. In Pflanzenzellen füllt Lignin den Raum zwischen Cellulose und Hemicellulose aus und verleiht der Pflanze dadurch Steifigkeit, die es der Pflanze ermöglichen ein Stamm und Äste zu entwickeln. In Holz besteht die Mittellamelle hauptsächlich aus Lignin, sodass die verschie-

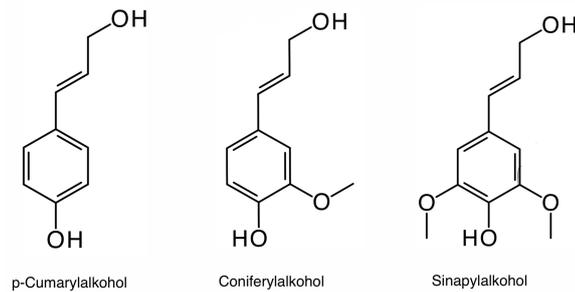


Abbildung 1.1: Monolignole

denen Zellen zusammengeklebt werden. Lignin ist hydrophob und verhindert dadurch einerseits unkontrollierte Wasseraufnahme durch die Zellen, was zum Platzen der Zellwand führen könnte. Andererseits ermöglicht die wasserfeste Ligninstruktur einen kontrollierten Wasser- und Nährstofftransport. Lignin schützt Holz vor mikrobiologischen Abbau, da lignifizierte (verholzte) Pflanzenteile nicht von celluloseabbauenden Enzymen der Mikroorganismen durchdrungen werden können. Neben dieser Barriere und wegen des komplexen und heterogenen Aufbaus des Ligninpolymers kann es von den meisten Pilzen nicht abgebaut werden. [Ek et al., 2009], [Zakzeski et al., 2010] Eine Ausnahme stellen Weißfäulepilze dar. Enzyme, die Lignin spalten können wurden erstmals 1983 im Pilz *Trametes versicolor* nachgewiesen. [Archibald, 1992]

1.3.1 Struktur von Lignin

Eine allgemeine Struktur von Lignin haben Chen und Chan 1985 vorgeschlagen. [Chen und Chang, 1985]. In Abbildung 1.2 ist die vermutliche Struktur von Lignin dargestellt. Die Monolignole (p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol) sind vorwiegend über drei Ether- und vier Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungen verknüpft. Diese sind in Tabelle 1.1 dargestellt. Die relative Häufigkeit der Bindungen ist abhängig von der Herkunft des Lignins. Bei Holzlignin unterscheidet man im Allgemeinen je nach Herkunft zwischen Weich- und Hartholz-lignin. Die häufigste Bindung in allen Holzarten ist die β -O-4-Bindung, die in Hartholz bis zu 70 % aller Bindungen ausmachen kann. Die Verknüpfung der Monolignole ergibt stabile Verbindungen, wobei die Stabilität der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen die der Ether-Bindungen übertrifft. [McCarthy, 1998]

1.3.2 Mikrobiologischer Abbau von Lignin

Da Lignin durch radikalische Kopplung der Monolignole entsteht, findet man keine definierte Struktur wie das zum Beispiel bei Cellulose der Fall ist. Vielmehr ist Lignin racemisch aufgebaut. Die komplexe Struktur, hervorgerufen durch die radikalische Kopplung einerseits und durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Monolignole andererseits hat weitreichende Folgen für den Ligninabbau. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die geringe Porosität von Lignocellulosen, die den Zugang von delignifizierenden Enzymen erschwert. [Hammel und Cullen, 2008], [Singh und Chen, 2008], [Ek et al., 2009]

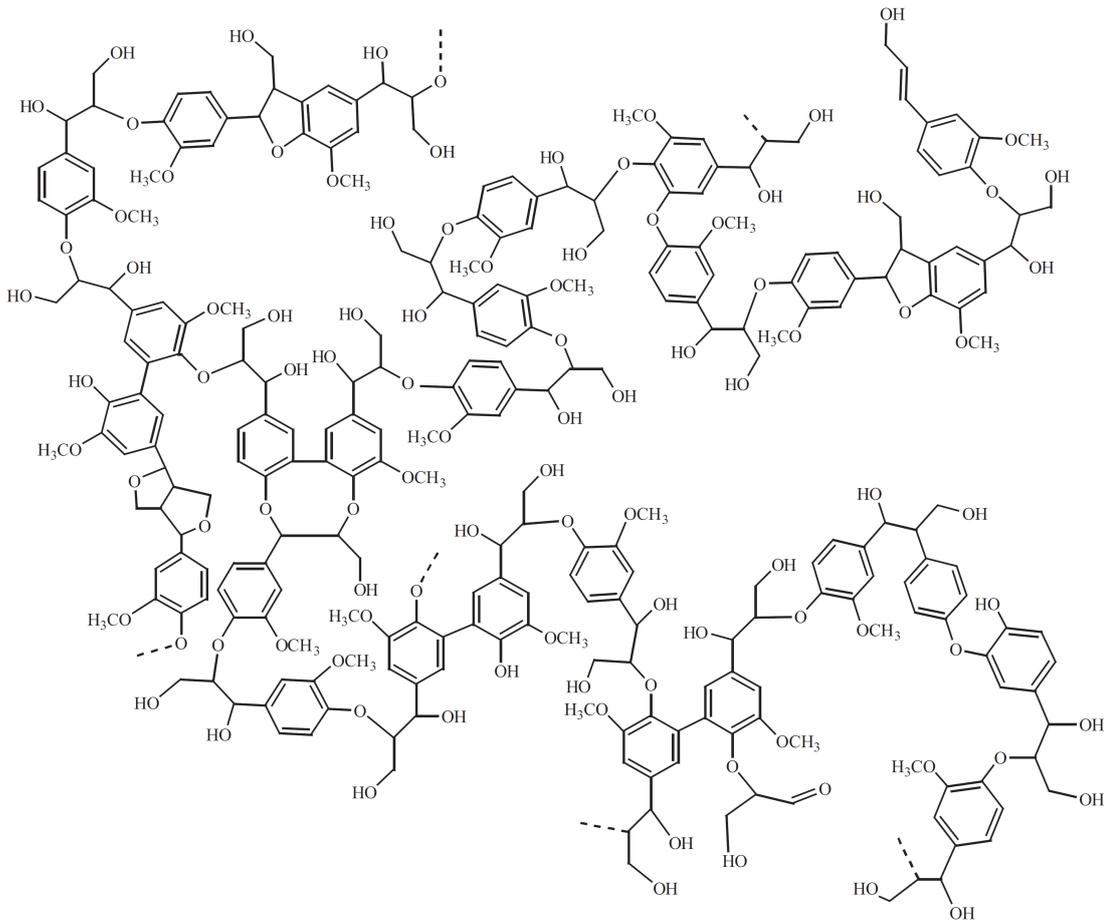


Abbildung 1.2: Vermutliche Ligninstruktur (nach [Ek et al., 2009])

Ein ausgereiftes System zum Abbau von Lignin haben Weißfäulepilze entwickelt. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Pilze aus der Abteilung der Basidiomycota (zum Beispiel *Phanerochaete chrysosporium*). Weißfäulepilze können im Gegensatz zu Braunfäulepilzen (zum Beispiel *Fomitopsis pinicola*) Lignin abbauen und es zu CO_2 zu veratmen.

Anhand des Modellorganismus *P. chrysosporium* wurde viele Untersuchungen durchgeführt, um einerseits die Enzyme, die für den Ligninabbau verantwortlich sind, zu finden und andererseits den Abbaumechanismus zu bestimmen. Der Ligninabbau von *P. chrysosporium* wird durch die Oxidation von Ligin bewerkstelligt. Dabei werden Bindungen zwischen C_α und C_β der aliphatischen Seitenketten gelöst. Diese Reaktion wird durch den Transfer von einem Elektron initiiert. Diese Reaktion hat sich als einheitliches Prinzip des Ligninabbaus herausgestellt. [Kirk, 1987]

Da ligninabbauende Enzyme Lignin aufgrund der kompakten Struktur nicht direkt abbauen können, haben sich in der Natur Mediatorsysteme entwickelt. Redox-Mediatoren, deren Molekulargewicht klein genug ist, um durch die engen Poren der lignifizierten Zellwand zu diffundieren, werden von Ligninasen ¹ aktiviert. Im Inneren der Zelle oxidieren die Redox-Mediatoren

¹In dieser Arbeit wird der Begriff Ligninase als Sammelbegriff für ligninabbauende Enzyme verwendet

Bindung	Struktur	Bindung	Struktur
β -O-4		4-O-5	
1-O-4			
5-5		β -5	
β - β		β -1	

Tabelle 1.1: Bindungen zwischen Monolignolen

Lignin an unspezifischer Stelle. In Abhängigkeit vom Redoxpotential der Ligninase und des Redox-Mediators können phenolische und nicht-phenolische Strukturen oxidiert werden. Im fortgeschrittenen Stadium des Ligninabbaus kann es dann auch einen direkten Kontakt zwischen Ligninase und Lignin geben. [Teeri und Henriksson, 2009]

1.3.3 Ligninasen

Die Literatur beschreibt vier Ligninasen:

- Lignin-Peroxidase (LiP)
- Mangan-Perioxidase (MnP)
- Versatile peroxidase (VP)
- Laccase (LA)

LiP

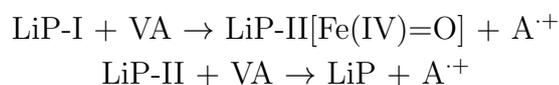
LiP [EC 1.11.1.14] katalysiert die H_2O_2 -abhängige oxidative Depolymerisation von Lignin. Durch das Redox-Potential von bis zu 1,4 V ermöglicht LiP die Oxidation von phenolischen und nicht-phenolischen Substraten. Die Reaktion läuft unspezifisch ab. LiP gehört zu den Glycoproteinen, ist globulär aufgebaut und hat eine Größe von $50 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$. Eine Eisen-Protoporphyrin-IX-Gruppe (Häm) (siehe Abbildung 1.3) ist zwischen einer proximalen und distalen Domäne lokalisiert. Neben acht Cys-Resten findet man auf jeder der zwei Domänen zwei Calcium-Bindungsstellen, die vermutlich zur Stabilisierung des aktiven Zentrums dienen. In der Nähe der Häm-Gruppe befindet sich die Peroxid-Bindungsstelle, die einen Kanal zur Proteinoberfläche beinhaltet. Eine wichtige Rolle spielt Trp 171 an der Enzymoberfläche, was für die Bindung und Oxidation von 3,4-Dimethoxybenzylalkohol (Veratrylalkohol) (VA) durch den Elektronentransfer vom aktiven Zentrum zur Oberfläche des Enzyms verantwortlich ist. VA, das von *P. chrysosporium* gleichzeitig mit LiP sekretiert, fungiert als Redox-Mediator wodurch die katalytische Wirkung des Enzyms stark erhöht wird.

Im ersten Schritt des katalytischen Kreislaufs wird das Enzym oxidiert. Es entsteht das Intermediat I, das als Porphyrinradikal-Kation vorliegt ($\text{LiP-I}[\text{Fe(IV)=O}^+]$). H_2O_2 wird dabei gespalten:



Bei dieser Reaktion werden zwei Elektronen übertragen, Eisen(III) wird zu Eisen(IV) oxidiert.

Nun folgen zwei ein-Elektronen-Transfers, die den katalytischen Kreislauf abschließen und das Enzym in die native Form zurückbringt. Die erste ein-Elektronen-Reduktion reduziert LiP-I zum Intermediat LiP-II. VA wirkt als Reduktionsmittel. Es entsteht ein VAradikal-Kation. Es folgt eine zweite ein-Elektronen-Reduktion. Dabei entsteht die native Form des Enzyms und ein weiteres VAradikal-Kation:



Während die Reaktion von LiP mit H_2O_2 zu LiP-I im Bereich von pH 2 bis 7,5 unabhängig vom pH ist, sinkt die Reaktion von LiP-I mit dem Reduktionsmittel (VA) mit steigendem pH, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird bei pH 3,1 erreicht. In Abwesenheit des Reduktionsmittels geht die aktive Form des Enzyms in Anwesenheit von H_2O_2 bei pH 3 in die inaktive Form des Intermediat LiP-III über. Die Häm-Gruppe liegt hier als superoxo-Komplex vor ($[\text{Fe(III)=O}_2^-]$). LiP-III kann durch das VAradikal-Kation oder durch eine spontane Autooxidation in die aktive Form übergeführt werden.

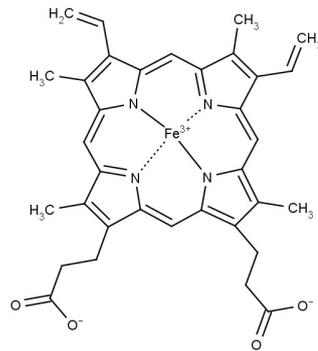


Abbildung 1.3: Häm-Gruppe der LiP

Obwohl sich LiP von anderen Peroxidasen wie Horseradish peroxidase, Meerrettich Peroxidase (HRP) im mechanistischen Sinn nur wenig unterscheidet, ist das hohe Redoxpotential und das pH-Optimum bei ungefähr pH 3 von LiP einzigartig. Der Grund für das hohe Redoxpotential liegt einerseits darin, dass das Eisen im Porphyrinring eine stärkere oxidative Wirkung aufweist als in anderen Peroxidasen. Andererseits unterstützt Trp171, das an der Enzymoberfläche lokalisiert ist, den Elektronentransfer von Substraten die nicht in direkten Kontakt mit dem aktiven Zentrum des Enzyms treten können. [Wong, 2009], [Hammel und Cullen, 2008], [Schoemaker und Piontek, 1996], [Hammel et al., 1993], [Martinez et al., 2002], [Yadav und Yadav, 2005]

MnP

MnP [EC 1.11.1.3] ist ein Mangan-abhängiges Enzym, dass die Reaktion



katalysiert. Im Weißfäulepilzen der Art *Bjerkandera* konnte festgestellt werden, dass nicht nur Mn(II) einen stimulierend Effekt auf die MnP-Produktion haben, sondern auch organische Säuren wie Glycolat oder Malonat.

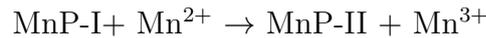
MnP ist wie LiP ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 46000 Da. Es besitzt ebenfalls eine Eisen-Protoporphyrin-IX-Gruppe (Häm). Die maximale Aktivität wird bei einer Mn(II) Konzentration von 100 μM erreicht. Die Struktur von MnP ist jener von LiP sehr ähnlich, die Häm-Gruppe ist zwischen zwei Domänen lokalisiert. Mn(II) ist an einer Kationen-Bindungsstelle an der Oberfläche des Enzyms lokalisiert. Zwei Ca-Ionen, je eines an der proximalen und an der distalen Seite der Häm-Gruppe lokalisiert, haben einen großen Einfluß auf die Thermostabilität des Enzyms.

Die Verwendung von Mangan als reduzierende Spezies ist nur bei MnP bekannt. Dabei wird Mn(II) zu Mn(III) oxidiert. Mn(III) wiederum ist in der Lage phenolische Ligninsubstrate direkt zu oxidieren. Der katalytische Kreislauf kann über zwei MnP-Intermediate (MnP-I, MnP-II) dargestellt werden. Im ersten Schritt reagiert MnP bei Anwesenheit von

H_2O_2 zu MnP-I, es bildet sich ein ein Fe(IV)-oxo-porphyrin-radikal-Kation. Dies ist eine Zwei-Elektronen-Transfer-Reaktion:



Die Reaktion ist pH unabhängig. Im nächsten Schritt wird MnP-I in Anwesenheit von Mn^{2+} in MnP-II reduziert, es entsteht Mn^{3+} .



Ein weiteres Mn^{2+} reduziert MnP-II und führt das Enzym dadurch in die native Form über. Mn^{2+} wird dabei zu Mn^{3+} oxidiert.



Wie im katalytischen Kreislauf von LiP folgen einem Zwei-Elektronen-Transfer zwei Ein-Elektronen-Transfers. Mn^{3+} ist nun in der Lage organische Substrate zu oxidieren:



Das entstehende Mn^{3+} dissoziiert vom Enzym, wobei es zur Stabilisierung mit α -hydroxy-Säuren Komplexe bildet. Als Komplexbildner werden von *P. chrysosporium* Oxalat und Malat sekretiert. Oxalat werden neben der Wirkung als Komplexbildner noch weitere Funktionen zugeschrieben. Einerseits soll Oxalat zur Regulation des extrazellulären pH-Wertes dienen. Andererseits soll Oxalat durch die Maskierung von Ca-Ionen zur Vergrößerung der Poren der Pflanzenzellwand beitragen, wodurch die Diffusion von MnP erleichtert wird. Der Mn(III)-Komplex wirkt als Redoxmediator, der in der Lage ist in die Zellwand zu diffundieren und dort phenolische Substrate zu oxidieren. Zuerst entsteht ein Phenoxy-Radikal, das meist durch eine Spaltung zwischen C_α und C_β in verschiedene Produkte zerfällt. Das Redoxpotential des Mn(III)-Komplexes liegt bei 0,8 bis 0,9 V. Nicht-phenolische Substrate benötigen im Unterschied zur LiP einen zweiten Mediator. Neben Thiolen reagiert MnP mit Lipiden. Thiole werden zu Thiyl-Radikalen oxidiert, welche wiederum Wasserstoff vom Substrat binden, wodurch ein Benzyl-Radikal entsteht. Das Benzylradikal zerfällt in mehreren Schritten in die Endprodukte. Durch die Peroxidation der Lipide wird ebenfalls die Spaltung nicht-phenolischer Substrate eingeleitet.

Liegt kein H_2O_2 vor, ist MnP in der Lage H_2O_2 zu generieren. Diese Eigenschaft ist von großer Bedeutung für den Ligninabbau durch die Weißfäulepilze, da so der katalytische Kreislauf gestartet werden kann. Bei einem H_2O_2 -Überschuss bildet sich aus MnP-II die inaktive Form des Enzyms MnP-III. Der Fe(III)-superoxo-Komplex kann bei weiterer Reaktion mit H_2O_2 zur irreversiblen Inaktivierung des Enzyms führen. Mn(III) kann zur Reaktivierung des MnP-III Intermediats beitragen. [Bao et al., 1994], [Wariishi et al., 1992], [Wong, 2009], [Hammel und Cullen, 2008]

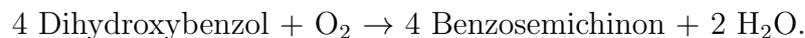
VP

VP reagieren nicht nur mit Mn(II) wie MnP, sondern oxidieren auch in der Abwesenheit von Mn(II) phenolische und nicht-phenolische Substrate wie es von LiP bekannt ist. Die molekulare Struktur von VP ist der von LiP ähnlicher als jener von MnP. VP weist sowohl eine Bindungsstelle für Mn(II) als auch eine Bindungsstelle für VA auf. Weiters findet sich Trp164 an der Enzymoberfläche, was die gleiche Rolle wie Trp171 in LiP spielt.

Der katalytische Kreislauf ist jenem von LiP ähnlich. Dem Zwei-Elektronen-Transfer von VP zum Intermediat VP-I folgen zwei Ein-Elektronen-Transfers zu VP-II und zurück zum nativen Enzym. VP ist ein Hybrid aus MnP und LiP. Durch Mutagenese-Versuche wurde MnP-Aktivität in LiP eingeführt und umgekehrt und so künstliche VP geschaffen. Aus diesen Versuchen lässt sich auf eine strukturelle Entwicklung der nativen VP schließen. [Wong, 2009], [Hammel und Cullen, 2008], [Higuchi, 2004]

LA

LA [EC 1.10.3.2] ist eine Cu-hältige Oxidoreduktase. Formal katalysieren LA die Reaktion



Im aktiven Zentrum von LA befinden sich vier Cu-Ionen. Typ 1 Cu (T1) besteht aus einem Cu-Ion und ist in einer Senke an der Enzymoberfläche lokalisiert. Typ 2 Cu (T2), ebenfalls ein Cu-Ion und Typ 3 (T3), bestehend aus 2 Cu-Ionen bilden ein trinukleares Cluster (T2/T3), das im Inneren des Enzyms lokalisiert ist. In der Ausgangsposition liegen die Cu-Ionen als Cu²⁺-Ionen vor. Zu Beginn des katalytischen Kreislaufs empfängt T1 ein Elektron vom Reduktionsmittel und überträgt es auf das trinukleare Cluster von T2/T3. Dieser Schritt wird viermal wiederholt, bis alle vier Cu-Ionen als Cu⁺ vorliegen. Dabei stellt der Elektronentransfer von T1 zu T2/T3 den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Nun folgen zwei Zwei-Elektronen-Transfers um Cu²⁺ zu regenerieren, die Elektronen werden auf O₂ übertragen. Die Reduktion von O₂ findet an T2/T3 statt und läuft in zwei Schritten ab. Zunächst wird O₂ an T2/T3 gebunden. T3 überträgt nun zwei Elektronen, wobei sich eine Peroxidstruktur ausbildet. Ein weiteres Elektron wird von T1 übertragen, die Peroxidstruktur wird unter Wasserabspaltung aufgelöst. Abschließend überträgt T2 ein Elektron, wodurch ein weiteres Wassermolekül entsteht und alle vier Cu-Ionen in oxidiert Form vorliegen. Von LA wird die Übertragung von Elektronen aus phenolischen Substraten katalysiert wobei Phenoxy-Radikale entstehen.

In Lignin führt die Oxidation von β -1-Strukturen zur Spaltung der C _{α} -C _{β} -Bindung, zur Spaltung am aromatischen Ring oder zur C _{α} -Oxidation. Nicht-phenolische Struk-

turen werden über ein Mediator-System oxidiert. Als Mediatoren wurden 2,2'-Azinodi-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) und 3-Hydroxyanthranilsäure (HAA) untersucht, wobei HAA als natürliche Mediator in *Pyrenopeziza cinnabarius* vorkommt. Das Redoxpotential von HOBT liegt bei ungefähr 1,1 V, jenes von ABTS bei maximal 0,9 V. Der Abbau von β -O-4-Strukturen mit dem Laccase/HOBT-Mediator-System wird durch vier Reaktionen katalysiert:

- C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ -Spaltung
- Spaltung am aromatischen Ring
- C $_{\alpha}$ -Oxidation
- β -Ether-Spaltung

LA-Mediator-Systeme finden Anwendung in der Papierindustrie zur Delignifizierung des Zellstoffes. ([Wong, 2009], [Srebotnik und Hammel, 2000], [Higuchi, 2004])

1.3.4 Technischer Ligninabbau

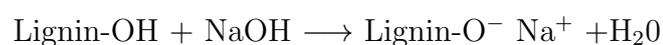
Das größte Anwendungsgebiet des Ligninabbaus in technischer Hinsicht findet sich in der Papierindustrie. In diesem Bereich kommen hauptsächlich chemische Verfahren zur Anwendung, wobei das Sulfit- und das Sulfatverfahren die zwei wichtigsten Verfahren darstellen. Daneben haben sich unter anderem auch Soda- und Organosolv-Verfahren etabliert. Eine mikrobiologische Holzbehandlung findet in der Erzeugung von Holzfasertafeln Anwendung.

Soda-Verfahren

Der Sodaaufschluss von Holz findet im alkalischen Milieu statt. Als Aufschluss Reagens wird NaOH verwendet. Der Name Sodaaufschluss kommt daher, dass bei der Rückgewinnung von Natronlauge Na₂CO₃ verwendet wird. Beim Sodaverfahren werden Hackschnitzel mit NaOH unter Druck einige Stunden gekocht. Dabei finden folgende Reaktion zur Ligninspaltung statt:

- **Ionisierung der Phenolgruppen**

Das Hydroxylion der Natronlauge spaltet von Phenolgruppen des Lignins unter Bildung von Phenolatgruppen Wasser ab.



Durch die Phenolatbildung wird die Löslichkeit von Lignin erhöht.

- **Spaltung der Etherbindungen an C_α**

Hydrolytische Spaltung der Etherbrücken von Lignin am C_α unter Anlagerung von Wasser und Abspaltung eines Alkohols.

Dadurch entsteht die Möglichkeit der Abspaltung einer Phenolatgruppe von C_β . Da das an C_β verbleibende Wasserstoff Atom stark sauer ist, kann es leicht abgespalten werden. Die verbleibende negative Ladung an C_β wird auf den Sauerstoff des abgehende Phenolats übertragen.

- **Spaltung von Methoxygruppen**

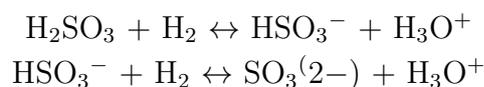
Durch die Spaltung von Methoxygruppen entsteht neben dem Phenolat Methanol. Methanol stellt ein gutes Lösungsmittel für Lignin dar und unterstützt den Abbauprozess. Methanol unterstützt aber den schrittweisen Abbau von Cellulose von ihrem reduzierenden Ende her. ([Gruber, 2011])

Sulfat-Verfahren

Das Sulfat oder Kraft Verfahren stellt eine Weiterentwicklung des Sodaverfahrens dar und wurde durch Dahl 1884 zum Patent angemeldet. Auch das Sulfat Verfahren ist nach dem Rückgewinnungs-Reagens Natriumsulfat benannt. Als Aufschlusschemikalie wirkt Natriumsulfid (Na_2S). Beim Sulfat-Aufschluss beschleunigt Natriumsulfid (Na_2S) die Ligninspaltung. Na_2S wirkt als Nucleophil, die Spaltung der Etherbrücken an C_β wird dadurch erleichtert. Na_2S wird vollständig zu Natriumhydrogensulfid (NaSH) hydrolysiert. Der nucleophile Angriff des Sulfidanion führt zur Spaltung der Etherbindung an C_β . Der Mechanismus ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Der Aufschluss erfolgt bei 170°C und 9 bar statt. ([Gruber, 2011], ([Müller, 2004])

Sulfit-Verfahren

Beim Sulfit Verfahren wird Lignin sulfoniert gespalten. Durch die Sulfonierung werden die Spaltprodukte wasserlöslich. Der Aufschluss erfolgt bei 6-8 bar Druck und ca. 140°C . Als reaktiver Stoff wirkt SO_2 . Es liegt im Wasser als schwefelige Säure (H_2SO_3) und abhängig vom pH Wert dissoziiert vor:



Der Sulfitaufschluss kann bei unterschiedlichen pH-Bereichen durchgeführt werden. Dazu wird SO_2 in Wasser beziehungsweise in wässrige Lauge eingeleitet. Es entsteht die

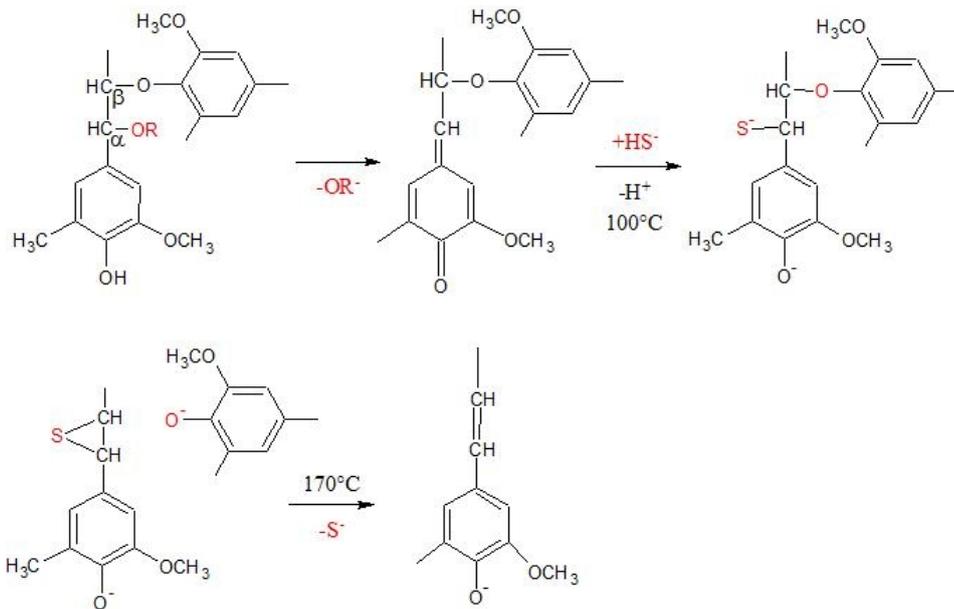


Abbildung 1.4: Sulfataufschluss

Kochsäure (*Kochlauge*). Das ursprüngliche Sulfitverfahren ist der Calcium-Bisulfid Aufschluss bei stark sauren Bedingungen bei pH Werten kleiner 2,8. Bei größeren pH Werten fällt Calciumbisulfid ($\text{Ca}(\text{HSO}_3)$) aus. Die gängigsten Sulfitaufschluss Varianten sind der Bisulfidaufschluss mit Magnesiumhydroxid als Base im neutralen pH Bereich und ein alkalischer Aufschluss mit NaOH.

Der Abbau des Lignins wird durch die Sulfonierung an C_β eingeleitet. Durch die Sulfonierung wird die Löslichkeit von Lignin erhöht. In einem weiteren Sulfonierungsschritt an C_α werden Etherbrücken gespalten. Dadurch steigt die Löslichkeit weiter. In Abbildung 1.5 ist der Mechanismus des Abbaus dargestellt.

[Gruber, 2011]

Organosolv-Verfahren

Neuere Aufschlussverfahren verwenden organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische bei niedrigeren Temperaturen. Dadurch bleibt die Ligninstruktur während des Aufschlusses weitgehend vorhanden. Dies ermöglicht eine höherwertige Weiterverarbeitung des Lignins, als bei den anorganischen Aufschlüssen, wo Lignin in der Regel der thermischen Verwertung zugeführt wird.

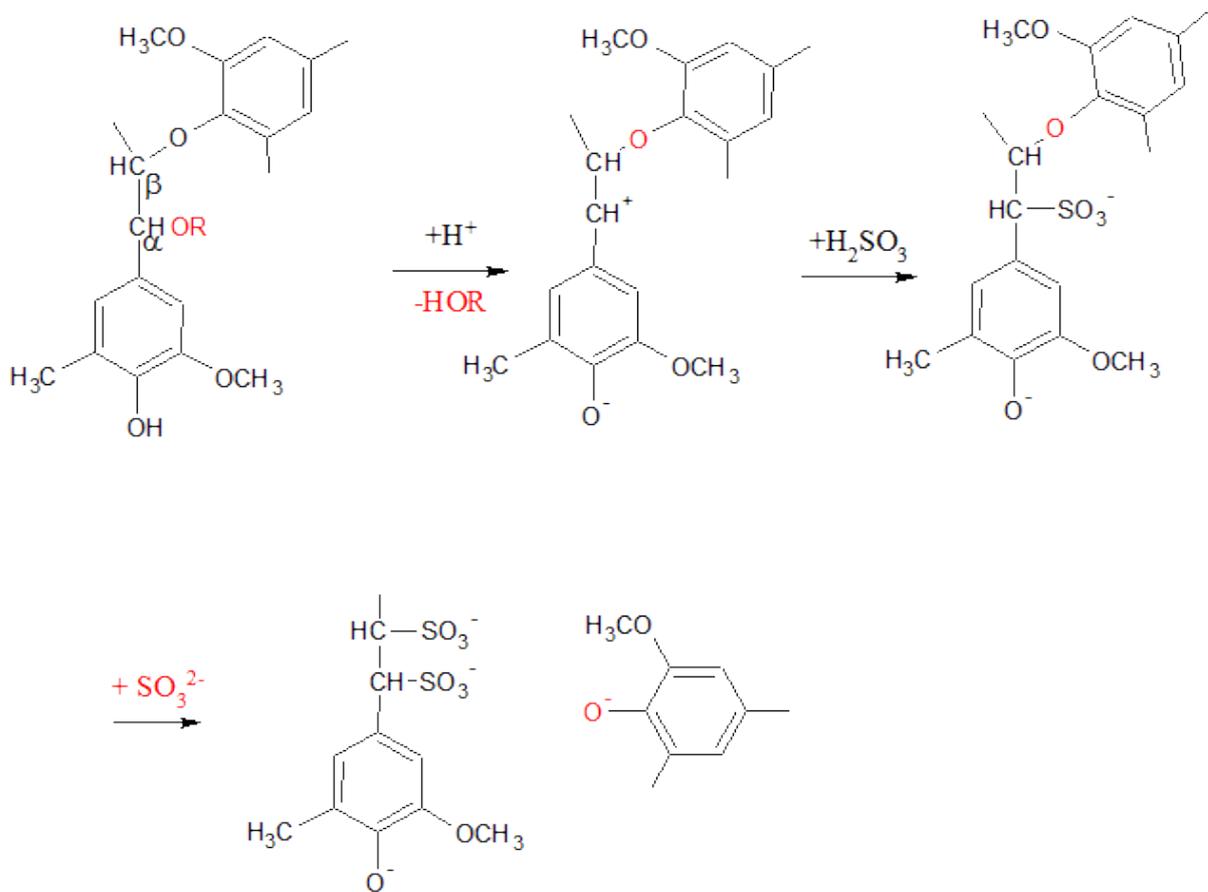


Abbildung 1.5: Sulfitverfahren

Kapitel 2

Größenausschluss-Chromatographie

Größenausschluss-Chromatographie (SEC) ist ein Analysenverfahren, bei dem Moleküle aufgrund ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Probe wird auf eine Säule aufgetragen und mit einer geeigneten mobilen Phase durchströmt. Die Auftrennung der Probe erfolgt gemäß dem Molekulargewicht aufgrund der Wechselwirkung mit der stationären Phase. Aufgrund der Verwendung von Gelen als mobile Phase wird auch der Term *Gelpermeationschromatographie* für diese Separationstechnik verwendet. Da die Trennung der Probe auf Basis der Größe der Moleküle stattfindet wird ferner der Ausdruck *Gelfiltration* verwendet. Beide Ausdrücke meinen den gleichen Prozess der *Größenausschluss-Chromatographie*, der hier ausschließlich Anwendung findet und erläutert werden soll. [Striegel, 2009]

2.1 Prinzip der Größenausschluss-Chromatographie

2.1.1 Das durchschnittliche Molekulargewicht von Polymeren

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, das durchschnittliche Molekulargewicht von (Bio)Polymeren darzustellen:

- M_n
- M_w
- M_z

wobei

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} = \frac{\sum W_i}{\sum W_i / M_i} \quad (2.1)$$

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} \quad (2.2)$$

$$M_z = \frac{\sum N_i M_i^3}{\sum N_i M_i^2} \quad (2.3)$$

Aufgrund der Reaktionsmechanismen entstehen bei der Polymerisation von Monomeren Polymere unterschiedlicher Länge, respektive von unterschiedlichem Molekulargewicht. Eine Möglichkeit das durchschnittliche Molekulargewicht darzustellen ist das arithmetische Mittel der Molekularmasse M_n bezogen auf die Anzahl der Polymere zu berechnen. M_n ist definiert als Masse der Probe $\sum W_i$ geteilt durch die Zahl an Polymeren N .

Eine weitere Möglichkeit das durchschnittliche Molekulargewicht von Polymeren darzustellen, besteht darin, das arithmetische Mittel der Molekularmasse M_w bezogen auf das Molekulargewicht zu berechnen. M_w ist definiert als Summe der Produkte der Masse der Probe W_i mit Molekulargewicht M_i ($\sum W_i M_i$) geteilt durch die Masse der Probe $\sum W_i$.

Das Verhältnis von M_w/M_n wird als *Polydispersität* der Probe bezeichnet. Sie ist ein Maß für die Breite der Verteilung der Molekulargewichte. In monodispersen Systemen ist $M_w/M_n = 1$, wohingegen hochvernetzte Polymere Polydispersitätswerte von deutlich größer als 1 erreichen.

Das durchschnittliche Molekulargewicht M_z bezieht sich auf ein höheres Momentum der Verteilung unter stärkerer Berücksichtigung des Molekulargewichtes. M_z steht in Korrelation mit Materialeigenschaften der Polymere wie zum Beispiel der Steifigkeit. [Striegel, 2009]

2.1.2 Trennprinzip

Chromatographische Trennverfahren beruhen darauf, dass sich Bestandteile der Probe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch eine stationäre Phase bewegen. In der Säulenchromatographie eluieren die Komponenten der Probe daher zu unterschiedlichen Zeiten. Die Auftrennung erfolgt aufgrund von unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten der Komponenten zwischen stationärer und mobiler Phase. Moleküle die längere Zeit mit der stationären Phase interagieren eluieren entsprechend langsamer als Moleküle, die weniger mit der stationären Phase wechselwirken. Als mobile Phase finden in der Chromatographie Gase (*Gaschromatographie (GC)*) oder Flüssigkeiten (*Flüssigchromatographie (LC)*) Anwendung. Stationäre Phasen in der LC sind entweder Feststoffe oder Flüssigkeiten. Entsprechend der Rückhaltemechanismen unterscheidet man zwischen

- Ionenaustauschchromatographie
- Adsorption
- Verteilungschromatographie
- Größenausschlusschromatographie

Es muss festgehalten werden, dass die Rückhalte-mechanismen in der Größenausschlusschromatographie einzigartig im Vergleich zu den übrig genannten sind, da bei der Größenausschlusschromatographie die treibenden Kräfte der Verteilung des Analyten zwischen der mobilen und der stationären Phasen entropischer Natur sind und nicht enthalpischen Ursprungs. Die Auftrennung des Analyten in der SEC erfolgt aufgrund der Tatsache, dass größere Moleküle nicht oder teilweise aus den Poren der stationären Phase ausgeschlossen werden. Daher eluieren große Moleküle schneller als kleine Moleküle, die in die Poren eindringen können, wodurch sich die Wegstrecke der kleinen Moleküle verlängert. Die Verringerung der Bewegungsfreiheit der Moleküle in den Poren ist verbunden mit einer Abnahme der Entropie. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Chromatogramme der LC auszuwerten. Einerseits kann die Auswertung über die Retentionszeit (t_r) erfolgen. Die Retentionszeit kann einfach gemessen werden, ist jedoch stark vom Aufbau des Messsystems (Säulendurchmesser, Flussrate, etc.) abhängig. Andererseits kann das Retentionsvolumen (V_r) bestimmt werden, dabei muss aber die Flussrate (F) der mobilen Phase bekannt sein, da $V_r = Ft_r$. ([Striegel, 2009])

Weiters kann der Retentionsfaktor (k') als

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (2.4)$$

und

$$k' = \frac{V_r - V_m}{V_m} \quad (2.5)$$

mit t_0 als Retentionszeit des nicht zurückgehaltenen Peaks und $V_m = Ft_0$.

Schließlich kann Verteilungskoeffizient (K_{LC}) angegeben werden. K_{LC} ist das Verhältnis der Analytkonzentration in der stationären und der mobilen Phase. Somit kann k' ausgedrückt werden als

$$k' = \frac{K_{LC}V_s}{V_m} \quad (2.6)$$

mit V_s als Volumen der stationären Phase dargestellt werden.

Daraus folgt

$$V_r = V_m + K_{LC}V_s \quad (2.7)$$

In der SEC eluieren die gelösten Stoffe (Analyten) vor dem Lösungspik, da die Analyten gemäß ihrer Größe in die Poren der stationären Phase diffundieren. Dadurch werden große Moleküle weniger lang zurück gehalten als kleine. Das Trennprinzip in der SEC kann als Verteilung der Analyten innerhalb und ausserhalb der Poren der stationären Phase beschreiben werden. Der Verteilungskoeffizient (K_{SEC}) gibt die durchschnittliche Konzentrationsverteilung innerhalb und ausserhalb der Poren wieder. Da abhängig von ihrer Größe nicht allen Analyten das Innenvolumen der Poren (V_i) zur Verfügung steht, nimmt die Konzentration der Analyten gemäß ihrer Größe innerhalb der Poren ab. Daher

ist das Gesamtvolumen das einem Analyten mit definierter Größe zur Verfügung steht nicht die Summe aus Ausschlussvolumen (V_0) und Innenvolumen der Poren (V_i) sondern $V_0 + K_S ECV_i$. Das Retentionsvolumen, das der mobilen Phase zur Verfügung steht, berechnet sich aus der Summe des Ausschlussvolumen (V_0) und Innenvolumen der Poren (V_i):

$$V_m = V_0 + V_i \quad (2.8)$$

Somit kann das Retentionsvolumen V_r angegeben werden als:

$$V_r = V_0 + K_S ECV_i + K_L CV_s \quad (2.9)$$

Unter Vernachlässigung von Oberflächeneffekten kann die Retention näherungsweise als

$$V_r = V_0 + K_S ECV_i \quad (2.10)$$

dargestellt werden.

Aus dieser Gleichung kann abgeleitet werden, dass alle Moleküle, die groß genug sind, um nicht in die Poren der stationären Phase zu diffundieren, gemeinsam am Anfang im Ausschlussvolumen eluieren, während alle Moleküle, den das gesamte Porenvolumen zur Verfügung steht, am Ende eluieren. Dazwischen erfolgt die Auftrennung nach dem Molekulargewicht der Analyten. Um in der SEC Verteilungen von Molekulargewichten über V_r quantitativ darstellen zu können muss eine Kalibrierung erfolgen. [Zikeli, 2010]

Kapitel 3

Aufgabenstellung

Im Zuge dieser Arbeit sollen verschiedene Systeme zum Abbau von Lignin untersucht werden. Das untersuchte Lignin stammt aus Weizenstroh. Dies wurde mit einem neu entwickelten Bioraffinerie-Prozess gewonnen. Untersucht werden definierte, vorab mittels HP-SEC in Fraktionen unterschiedlicher Molekulargewichte aufgetrennte, Ligninfraktionen, die Mittels enzymatischer und biomimetischer Versuchsanordnungen in niedermolekulare bzw. monomerische Bestandteile abgebaut werden sollen. Der enzymatische Abbau von Lignin soll einerseits in einem Säulenreaktor mit LiP erfolgen. Durch räumliche Trennung der Abbauprodukte von Reaktionssubstrat im Säulenreaktor sollen Rückreaktionen verhindert werden, die aufgrund der Natur der Abbaureaktion zu einer Erhöhung des Molekulargewichts des eingesetzten Lignins führen soll. Eine weitere enzymatische Behandlung von Lignin mit Proteasen soll Rückschlüsse auf die die Anwesenheit von Lignin-Protein-Konjugaten im verwendeten bioraffinierten Lignin erlauben. Der biomimetische Abbau von Lignin wird mit verschiedenen Katalysatoren durchgeführt. Es sollen die Wirksamkeit der verschiedenen H_2O_2 -abhängigen und H_2O_2 - unabhängigen Katalysatoren auf die Fähigkeit, definierte Ligninfraktionen abzubauen, untersucht werden. Ziel der verschiedenen Versuchsanordnungen (enzymatischer oder biomimetischer Abbau) ist es, Lignin von möglichst kleinem Molekulargewicht darzustellen. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgt mittels HP-SEC.

Teil II

Versuchsteil

Kapitel 4

Enzymatische Depolymerisation von Lignin

Das eingesetzte Lignin stammt aus einem Organosolv-Aufschluss von Weizenstroh. Abbildung 4.1 zeigt den gesamten Prozess der Strohverwertung. Nach dem Aufschluss des Weizenstrohs (Pretreatment) wurde der Feststoff von der Flüssigkeit Pretreatment liquor (PTL) mittels einer Filterpresse abgetrennt. Durch Ansäuern wurde nun Lignin ausgefällt. Das so entstandene Rohlignin wurde in Vorarbeiten zu dieser Diplomarbeit mittels präparativer Gelfiltration (Sephadex LH-60) nach Molmasse fraktioniert. Für die unten beschriebenen Versuche wurden entweder Einzelfractionen (Proteasebehandlung) oder die Vereinigung aller Einzelfractionen verwendet.

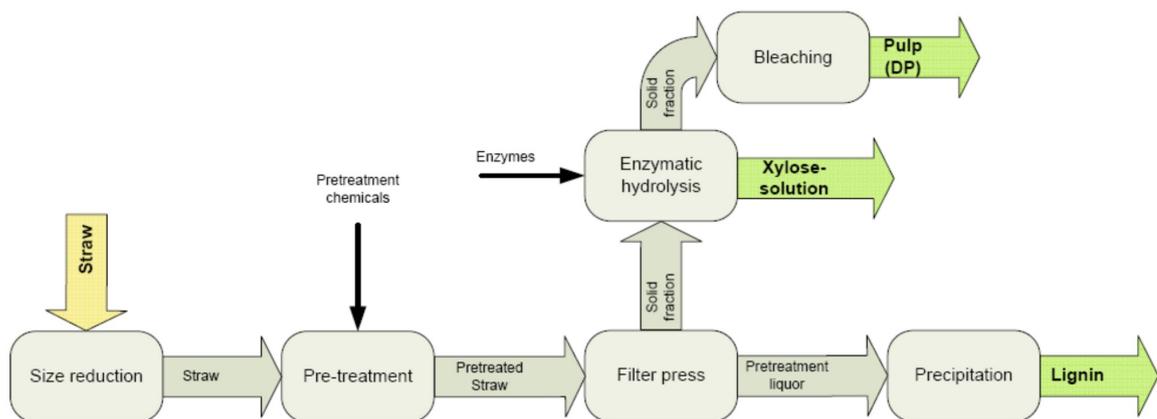


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Strohverwertung

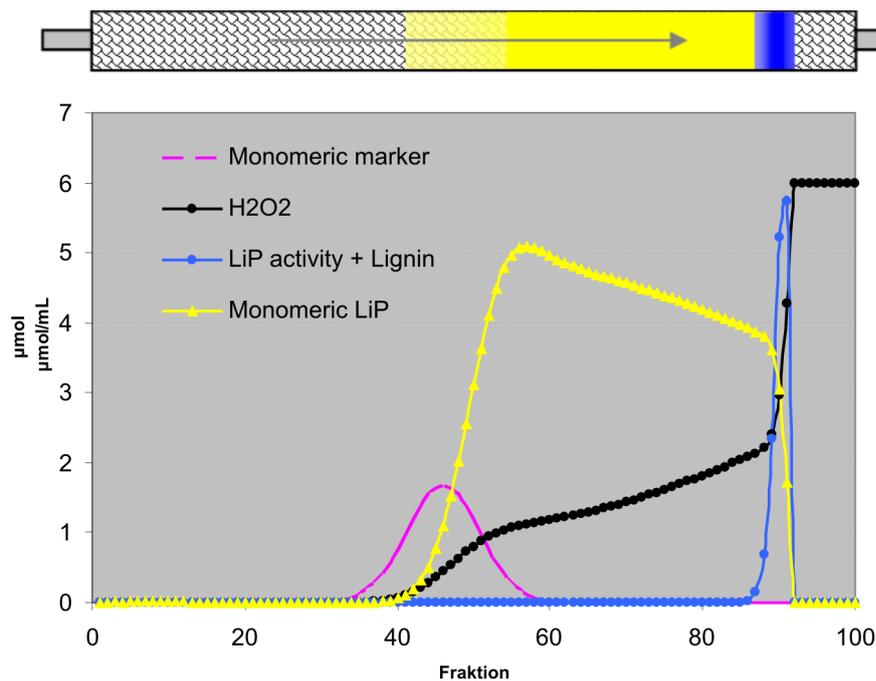


Abbildung 4.2: Zustandsbild des Säulenreaktors

4.1 Ligninabbau im Säulenreaktor

4.1.1 Versuchsaufbau

Wie im Teil I beschrieben, ist der Ligninabbau durch Ligninperoxidasen ein radikalischer Prozess. Um die Repolymerisation der Abbauprodukte mit dem Hauptpolymer zu verhindern, wurde ein System entwickelt, um die Abbauprodukte vom Polymer und vom Enzym LiP zu trennen. Diese räumliche Trennung basiert auf dem Prinzip der Gelfiltration.

Eine Reaktionslösung bestehend aus Lignin (Fraktion), LiP und Pufferlösung wurde auf einen Säulenreaktor aufgegeben, der mit einem Filtrationsgel gefüllt war. Das Gel wurde so gewählt, dass sich Lignin und LiP im Ausschlussvolumen des Reaktors befanden. Die niedermolekularen Abbauprodukte hingegen konnten mit der stationären Phase des Systems interagieren. Dadurch wurden die Abbauprodukte vom Hauptpolymer und von der LiP getrennt.

In Abbildung 4.2 wird der Zustand der Säule zu einem bestimmten Zeitpunkt nach einer Modellberechnung dargestellt.¹ Man sieht, dass LiP und Lignin in der Lösungsmittelfront laufen (blaue Linie) und mit dem Ausschlussvolumen die Säule verlassen. LiP verbraucht beim Durchlaufen der Säule Wasserstoffperoxid (schwarze Linie). Die Abbauprodukte (gelbe Linie) verteilt sich über die Säule. Ein Marker (rosa Linie) mit definierter molekularer Masse dient der Bestimmung der molekularen Masse der Abbauprodukte.

¹Das Modell wurde von E. Srebotnik zur Verfügung gestellt.

4.1.2 Durchführung

Als Säulenreaktor wurden 50 mL Chromatographiesäulen verwendet. 50 g Sephadex[®] G-10 wurde in 150 mL Acetatpuffer (20 mM) bei pH 4,5 über Nacht gequellt. Anschließend wurden die Säulen gepackt und mit 20 mM Acetatpuffer (pH 4,5) gespült, bis sich ein konstanter Fluss einstellte. So wurden zwei Säulenreaktoren vorbereitet. Nun wurden die Reaktoren equilibriert. Reaktor eins wurde mit einem Puffer bestehend aus

- 100 mM Acetatpuffer, pH 3,7
- 0,5 mM Wasserstoffperoxid (H₂O₂)
- 4 mM VA

equilibriert.

Reaktor zwei wurde ohne H₂O₂ equilibriert:

- 100 mM Acetatpuffer, pH 3,7
- 4 mM VA

Nach der Equilibrierung wurde auf Reaktor 1 die Reaktionslösung bestehend aus

- Lignin gelöst in Dimethylformamid (DMF) $1 \frac{mg}{mL}$
- LiP $0,1 \frac{U}{mL}$
- 100 mM Acetatpuffer, pH 3,7

aufgegeben.

Reaktor zwei wurde folgendermaßen beladen:

- Lignin
- 20 mM Acetatpuffer, pH 4,5

Es wurde jeweils 1 mL Lösung aufgegeben. Als Flussrate wurde 25 mL pro Stunde gewählt. Nun wurden mit dem Fraktionensammler Gilson[®] FC 203B 1 mL Fraktionen gesammelt, wobei in in jeder Fraktion 0,1 mL einer Stopplösung vorgelegt wurde, um die enzymatische Aktivität zu stoppen. Die Stopplösung bestand aus:

- 0,5 M NaH₂PO₄
- 0,02 % NaN₃

Die Molekulargewichtsverteilung der Fraktionen wurde mittels HP-SEC bestimmt.

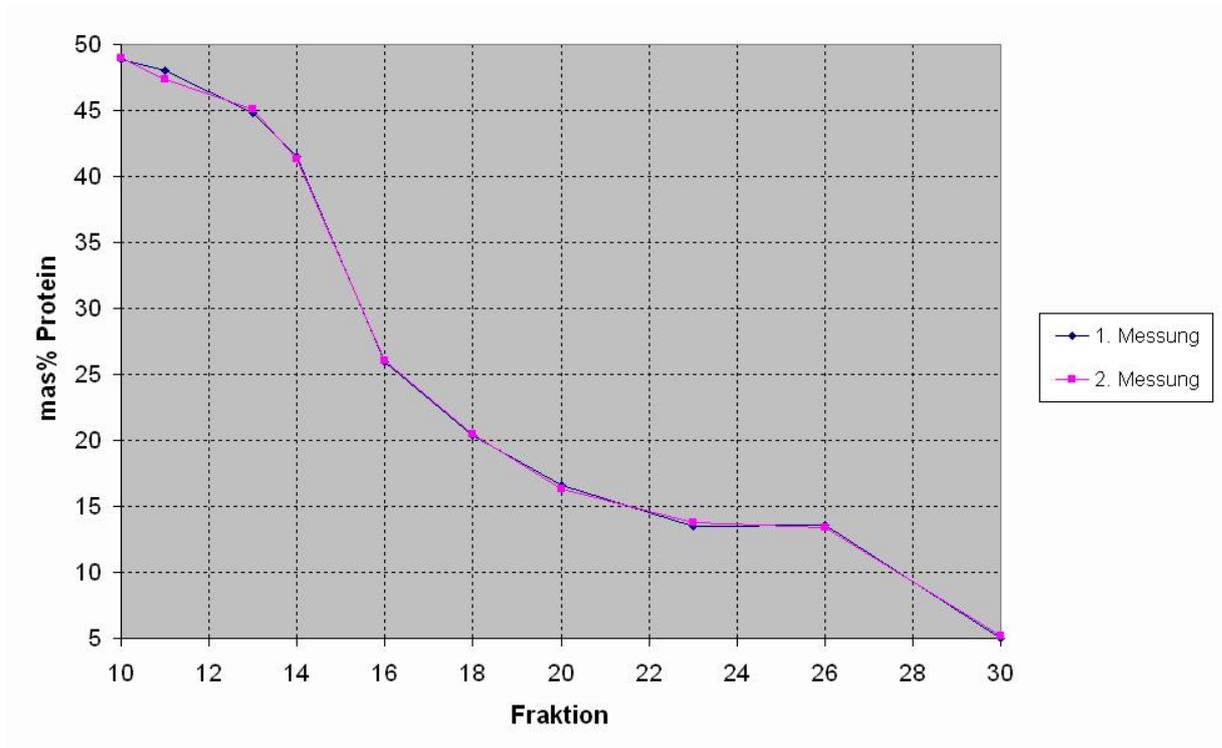


Abbildung 4.3: Proteinanteil in gereinigten Ligninfraktionen

4.2 Proteasebehandlung von Lignin

Die extern am Institut für Wassergüte der TU Wien durchgeführte Elementaranalyse der gereinigten Ligninfraktionen zeigte abnehmende Proteingehalte mit kleiner werdendem Molekulargewicht der Ligninfraktion. Abbildung 4.3 zeigt, dass der Proteingehalt von mehr als 45% auf rund 5% sinkt. Diese Daten geben einen Hinweis darauf, dass Proteine vor allem von den großen Ligninpolymeren während des Ligninaufschlusses nicht oder nur unzureichend entfernt werden. Allerdings berichtet die Literatur von kovalent gebundenen Protein-Lignin-Komplexen in der Zellwand, deren Spaltung ein niedrigeres Molekulargewicht des eingesetzten Lignins zur Folge haben sollte. Um dies zu untersuchen, wurde Lignin einer Proteasebehandlung unterzogen. Nach der Proteasebehandlung wurde mittels HP-SEC die Molekulargewichtsverteilung des Lignins ermittelt.

4.2.1 Durchführung

Die Ligninfraktionen wurden, nachdem sie wie im Kapitel 4 beschrieben, mittels Gelfiltration gereinigt wurden, als Einzelfraktionen im Mörser homogenisiert. Anschließend wurde für jede Fraktion ein Lösung mit der Konzentration $5 \frac{mg}{mL}$ hergestellt. Als Lösungsmittel wurde 25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) verwendet.

Nachdem mehrere Proteaseprodukte auf ihre Wirksamkeit auf Lignin getestet wurden,

wurde in weiterer Folge die Protease P5147 der Firma Sigma-Aldric[®] verwendet. Die Reaktionslösung bestehend aus

- 5 $\frac{mg}{mL}$ Lignin
- 1,6 $\frac{U}{mL}$ Protease P5147
- 25 mM Tris

wurde für acht Stunden bei 37°C sanft geschüttelt.

Die behandelten Proben wurden abschließend mittels HP-SEC auf ihre Molekulargewichtsverteilung untersucht.

Kapitel 5

Biomimetische Depolymerisation von Lignin

Im Kapitel 1 wird die Lignindepolymerisation mit Ligninasen beschrieben. In der Literatur ([Crestini et al., 2005], [Bernini et al., 2009], [Son und Toste, 2010]) sind jedoch auch biomimetische Katalysatoren zum Ligninabbau beschrieben. Die Wirkung der Katalysatoren wird neben Modellverbindungen, die die charakteristische β -O-4-Bindung aufweisen, auch an verschiedenen Ligninen getestet. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Wirkung zweier ausgewählter Katalysatoren an einer ausgewählten Ligninfraktion unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen untersucht. Die Verwendung eines Mangan-Katalysators ist aufgrund des Wirkmechanismus der MnP offenkundig. Weiters wurde ein nicht oxidativer Vanadium-Katalysator eingesetzt.

5.1 Mangan-Katalysator

Abbildung 5.1 zeigt den eingesetzten Mangan Katalysator.

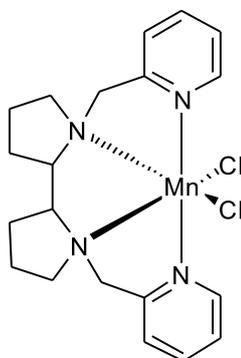


Abbildung 5.1: Mn-PSP-Cl

5.1.1 Versuchsaufbau

Als Lösungsmittel für den Katalysator wurde eine 50 prozentige Ethanollösung verwendet. Die Reaktion wurde in 10 mL Glasgefäßen angesetzt. Zum Rühren wurde ein Magnetrührstäbchen verwendet. Die H_2O_2 -Zugabe erfolgte kontinuierlich über den gesamten Reaktionszeitraum von 24 Stunden über eine Spritzenpumpe. Vor der chromatographischen Bestimmung des Molekulargewichts und der Molekulargewichtsverteilung des Lignins mittels HP-SEC wurde der pH-Wert der Reaktionslösung pH 12 gestellt und die Reaktionslösung zentrifugiert. Etwaige Niederschläge wurden entfernt.

5.1.2 Durchführung

Der H_2O_2 -abhängige Katalysator Mn-PSP-Cl wurde unter folgenden Bedingungen eingesetzt:

- Mn-PSP-Cl 1,9 mg
- 250 μL Ethanol
- 250 μL entionisiertes Wasser
- Lignin gelöst in DMF 1 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$
- 850 μL 15%-ige H_2O_2 -Lösung ¹
- Raumtemperatur

Diese Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur 24 Stunden mäßig gerührt. Nun wurde der pH-Wert der Lösung mit 1N NaOH auf 12 gestellt und kräftig geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde nun der Molekulargewichtsanalyse mittels HP-SEC zugeführt.

5.2 Vanadium-Katalysator

In Abbildung 5.2 ist der Vanadium-Katalysator dargestellt.

5.2.1 Versuchsaufbau

Bei der Verwendung des eingesetzten Vanadium-Katalysators wurde darauf geachtet, in wasserfreiem Milieu zu arbeiten. Als Lösungsmittel für diese Reaktion wurde Dioxan verwendet. Als alternatives Lösungsmittel wurde DMF eingesetzt. Der Versuch wurde bei 80°C in 10 mL Glasgefäßen durchgeführt. Zur optimalen Durchmischung wurde mit Magnetrührstäbchen mäßig gerührt. Nach Beendigung des Versuchs wurde der pH-Wert der Lösung auf 12 gestellt und etwaige Niederschläge entfernt.

¹Die Zugabe erfolgte über eine Spritzenpumpe über einen Zeitraum von 24 Stunden

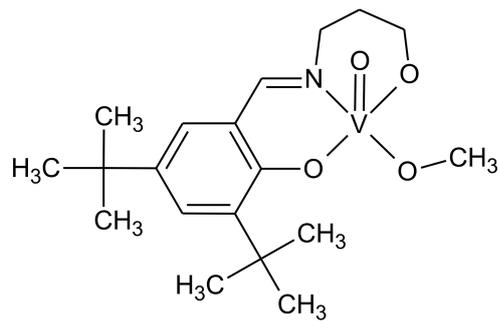


Abbildung 5.2: Vanadium-Katalysator

5.2.2 Durchführung

Der Vanadium-Katalysator wurde unter folgenden Bedingungen eingesetzt:

- Vanadium-Katalysator 1,2 mg
- 500 μL Dioxan
- Lignin gelöst in DMF 1 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$
- 80°C

Alternativ wurde ein Ansatz verwendet, in dem DMF als Lösungsmittel eingesetzt wurde:

- Vanadium-Katalysator 1,2 mg
- 500 μL DMF
- Lignin gelöst in DMF 1 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$
- 80°C

Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei 80°C gerührt. Nun wurde ein pH-Wert von 12 mit 1N NaOH eingestellt. Nach kräftigem Schütteln wurde die Reaktionslösung fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand der Lösung wurde nun mittels HP-SEC analysiert.

Kapitel 6

HP-SEC

Die Durchführung der HP-SEC erfolgte auf einem Agilent 1200-HPLC-System. Es wurden drei TSK-Gel Säulen (PW5000, PW4000, PW3000, TOSOH Bioscience, Stuttgart, Germany) in Serie verwendet. Proben wurden vor der Aufgabe auf das HP-SEC fünf Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Die Auswertung erfolgte nach der Kalibrierung mit externen Standards.

6.1 Geräteparameter

- Laufmittel: 10 mM NaOH
- Flussrate: 1 mL/min
- Injektionsvolumen: 20 μ L
- Säulentemperatur: 40°C
- Detektion: DAD bei 280 nm

Teil III

Ergebnisse und Diskussion

Kapitel 7

Enzymatische Depolymerisation von Lignin

7.1 Säulenreaktor

Abbildung 7.1 zeigt das Elutionsprofil von Lignin, das im Säulenreaktor mit LiP behandelt wurde. Weiters ist eine Kontrollprobe dargestellt, bei der unbehandeltes Lignin durch die Säule eluiert wurde. Die Hauptmenge von Lignin eluiert in den Fraktionen 14 bis 17. Das Elutionsprofil von LiP behandeltem Lignin verschiebt sich leicht. Das Peakmaximum liegt nun klar in Fraktion 15 während unbehandeltes Lignin das Maximum noch in Fraktion 14 zeigt. Dies lässt auf einen Abbau des eingesetzten Lignins schließen. Die Fraktionen 14 bis 17 wurden mittels HP-SEC einer Molekulargewichtsanalyse unterzogen. Die Abbildungen 7.2 und 7.3 zeigen jeweils die Molekulargewichtsverteilungen von behandeltem und unbehandeltem Lignin. Zusätzlich ist in den Tabellen 7.1 und 7.2 die Molekulargewichtsverteilung der jeweiligen Fraktionen numerisch dargestellt.

In Abbildung 7.4 sind die Ergebnisse der Abbildungen 7.3 und 7.2 zusammengefasst dargestellt. Obwohl Abbildung 7.1 aufgrund der Peak-Verschiebung auf einen Abbau von Lignin hindeutet, zeigt die anschließende Analyse der Eluat-Fraktionen mittels HP-SEC, dass sich entgegen der Erwartung die Molekulargewichtsverteilung von LiP behandeltem Lignin in Richtung größerer Molekulargewichte verschiebt. Dies ist sowohl innerhalb der

Tabelle 7.1: HP-SEC der Ligninfraktionen mit LiP

Fraktion	14	15	16	17	
M_w	2800	2600	2550	2250	$[\frac{g}{mol}]$
M_n	1700	1650	1600	1450	$[\frac{g}{mol}]$
M_p	22500	2650	2650	2100	$[\frac{g}{mol}]$
P_d	1,68	1,59	1,58	1,59	$[-]$
Integration	18,8 - 21,7	18,8 - 21,8	18,8 - 21,8	18,9 - 21,8	$[mL]$

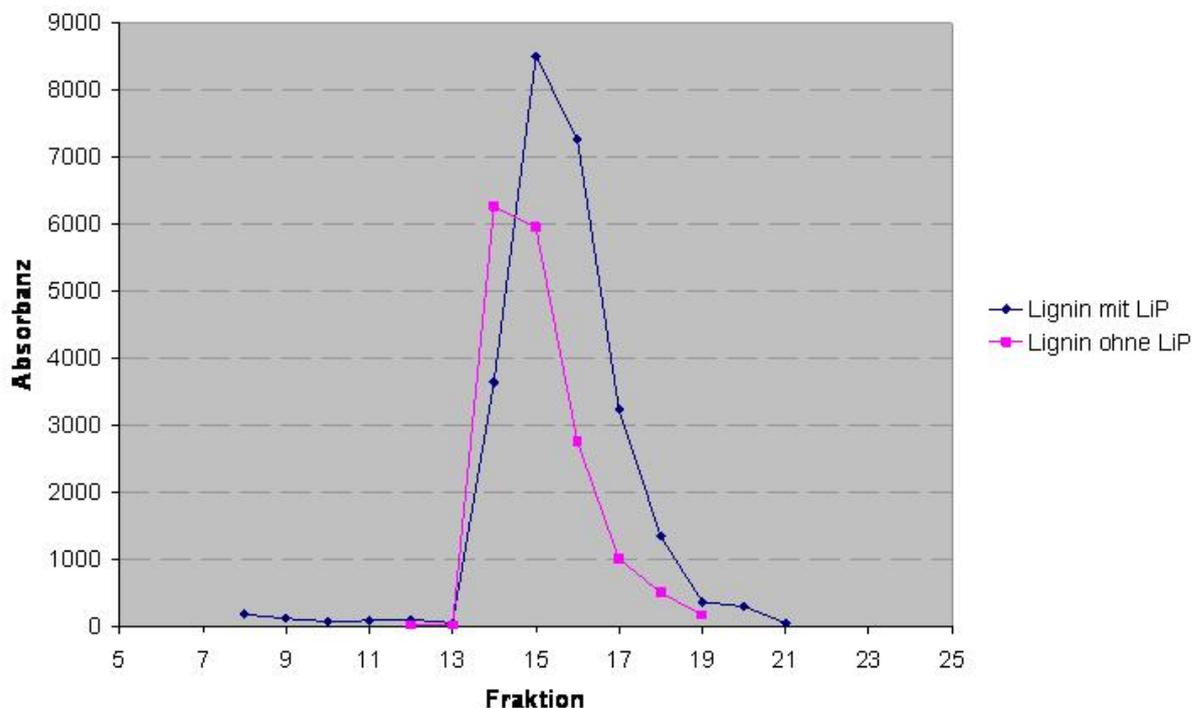


Abbildung 7.1: Elutionsprofil Säulenreaktor

Tabelle 7.2: HP-SEC der Ligninfraktionen ohne LiP

Fraktion	14	15	16	17	
M_w	1600	1600	1600	1800	$[\frac{g}{mol}]$
M_n	1200	1200	1250	1500	$[\frac{g}{mol}]$
M_p	1500	1550	1250	1550	$[\frac{g}{mol}]$
P_d	1,32	1,32	1,29	1,20	$[-]$
Integration	18,7 - 21,7	18,8 - 21,7	18,7 - 21,5	18,6 - 21,1	$[mL]$

einzelnen Fraktionen ersichtlich, aber auch in der Summenkurve. Es findet kein permanenter Abbau von Lignin statt. Stattdessen repolymerisieren die Abbauprodukte. Eine mögliche Erklärung für den Widerspruch zwischen den in den Abbildungen 7.1 und 7.4 dargestellten Ergebnissen kann durch die Bildung von temporär stabilen Depolymerisationsprodukte im Säulenreaktor gegeben werden, welche jedoch Verlauf der weiteren Aufarbeitung repolymerisieren. Durch Zugabe oder Vorlage von Radikalfängern beziehungsweise Reduktionsmitteln im Eluat könnten die Abbauprodukte stabilisiert werden und damit die Repolymerisationsreaktion möglicherweise verhindert werden. Dies müsste

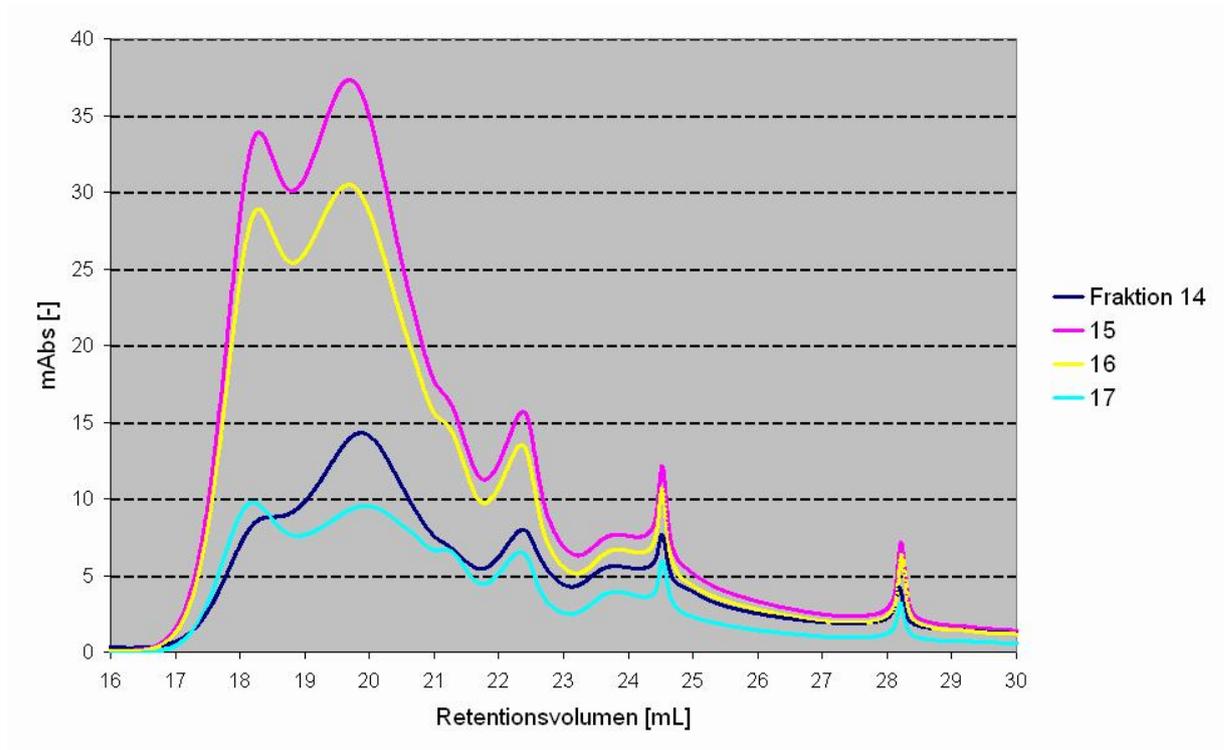


Abbildung 7.2: HP-SEC mit LiP

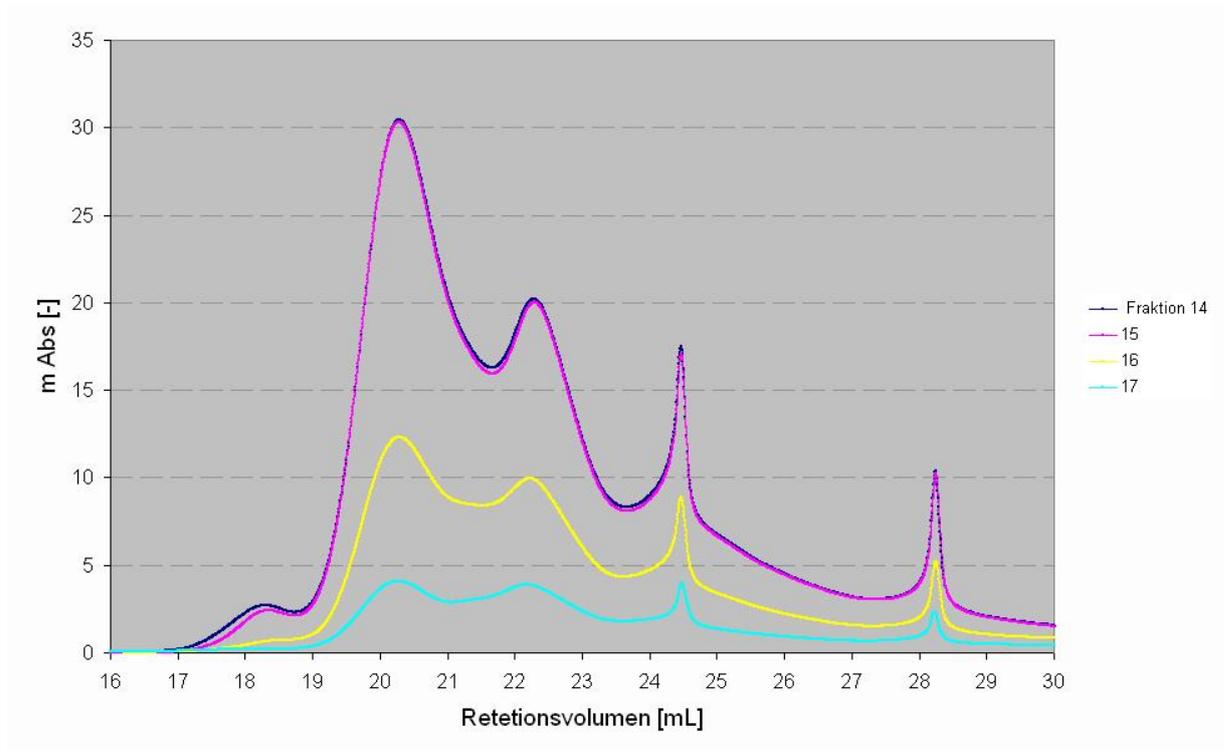


Abbildung 7.3: HP-SEC ohne LiP

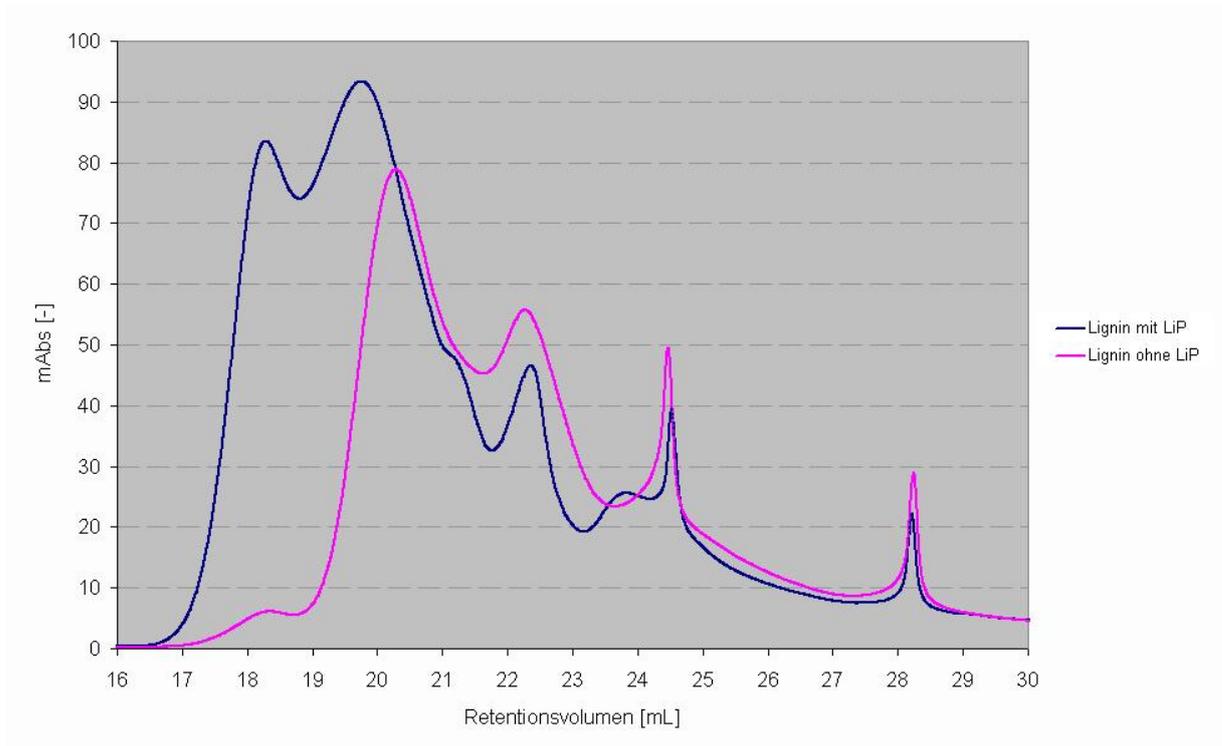


Abbildung 7.4: Summenkurve der Ligninfraktionen

in einem eigenen Versuchsaufbau überprüft werden.

Weiters ist ersichtlich, dass die Polydispersität der Molekulargewichtsverteilung innerhalb der Ligninfraktionen steigt. Auch dies ist ein Anzeichen für ungerichtete Repolymerisation, sei es nun außerhalb oder innerhalb des Säulenreaktors.

7.2 Proteasebehandlung von Lignin

In Kapitel 4.2 ist der Proteingehalt von Ligninfraktionen dargestellt. Um zu untersuchen, ob Ligninmoleküle über Proteine vernetzt sind, wurde eine Proteasebehandlung von Lignin durchgeführt. Sollte eine Vernetzung von Ligninmolekülen über Proteine vorliegen, würde eine Proteasebehandlung zum Abbau dieser Vernetzung und somit zur starken Verkleinerung des Molekulargewichts von Lignin führen. In Abbildung 7.5 sieht man das Chromatogramm von Gesamtlignin (Vereinigung aller Fraktionen). Die blaue Kurve zeigt proteasebehandeltes Lignin, während die rote Kurve die Kontrollprobe, also unbehandeltes Lignin darstellt. Es ist ersichtlich, dass durch die Proteasebehandlung ein Abbau von Lignin stattfindet. Das Chromatogramm der Kontrollprobe zeigt eine Schulter zwischen ca. 18 und 19 mL Retentionsvolumen. Die Schulter ist im proteasebehandelten Lignin nicht mehr zu sehen. Dafür sieht man ein stärker ausgeprägtes Peakmaximum zwischen 20 und 21 mL, sowie einen kleinen Peak bei ca. 26 mL. Dies lässt auf einen Abbau von Lignin

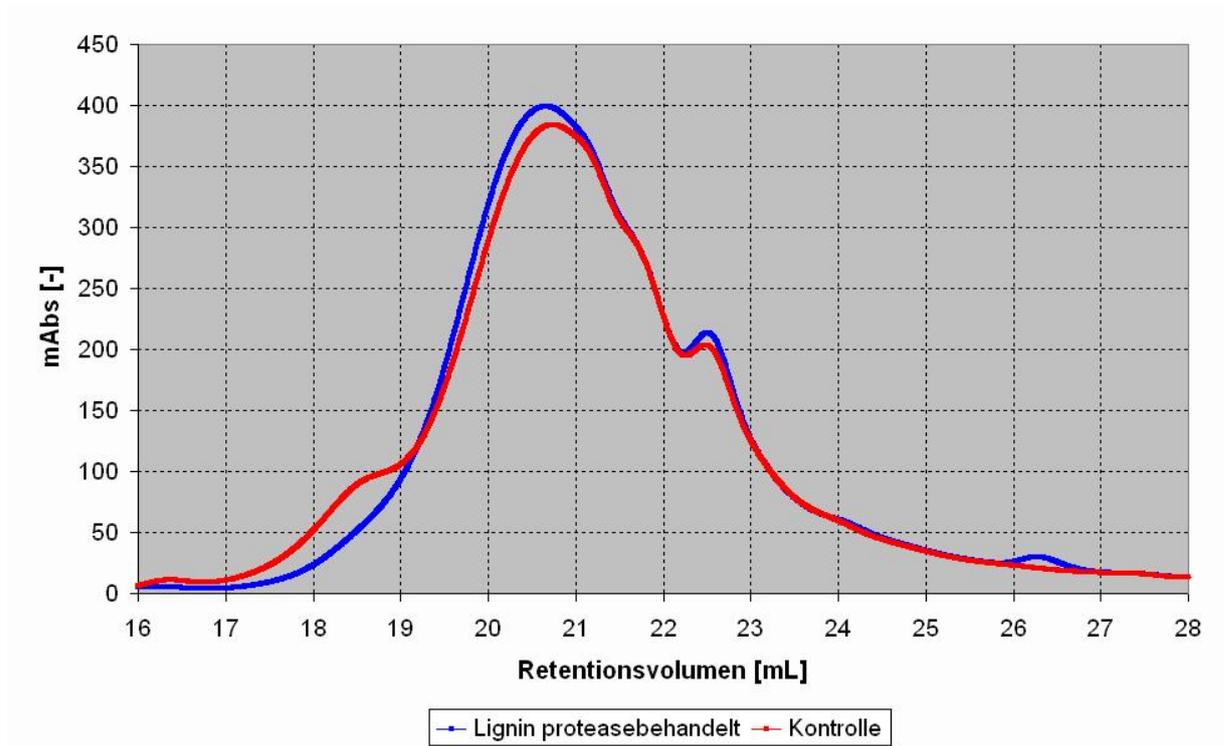


Abbildung 7.5: Proteasebehandlung von Lignin

Tabelle 7.3: HP-SEC von proteasebehandeltem Lignin

	Lignin proteasebehandelt	Kontrolle	
M_w	1450	1800	$\left[\frac{g}{mol}\right]$
M_n	1100	1100	$\left[\frac{g}{mol}\right]$
M_p	1200	1100	$\left[\frac{g}{mol}\right]$
P_d	1,33	1,64	$[-]$
Integration	17,0 - 22,2	17,0 - 22,2	$[mL]$

im hochmolekularen Bereich nach Proteasebehandlung schließen. Eine starke Vernetzung von Ligninmolekülen über Proteine als essentieller Bestandteil der Gesamtstruktur von Lignin ist nicht erkennbar, da in diesem Fall ein ausgeprägtes Peakmaximum bei höheren Retentionsvolumina erkennbar sein sollte. Es ist aber ersichtlich, dass ein gewisser Teil des hochmolekularen Lignins stark von der proteolytischen Reaktion betroffen ist. Dies lässt auf eine die Anwesenheit von großen Proteinmolekülen in der Ausgangssubstanz schließen.

Da Lignin offensichtlich nicht über Proteine vernetzt ist, ein gewisser Teil von Lignin aber stark auf proteolytischen Abbau reagiert, wurden an ausgewählten Ligninfraktionen weitere Proteasebehandlungen durchgeführt. Abbildung 7.6 zeigt das Chromatogramm von drei ausgewählten Ligninfraktionen von unterschiedlichem Molekulargewicht.

Die Legende ist wie folgt zu lesen:

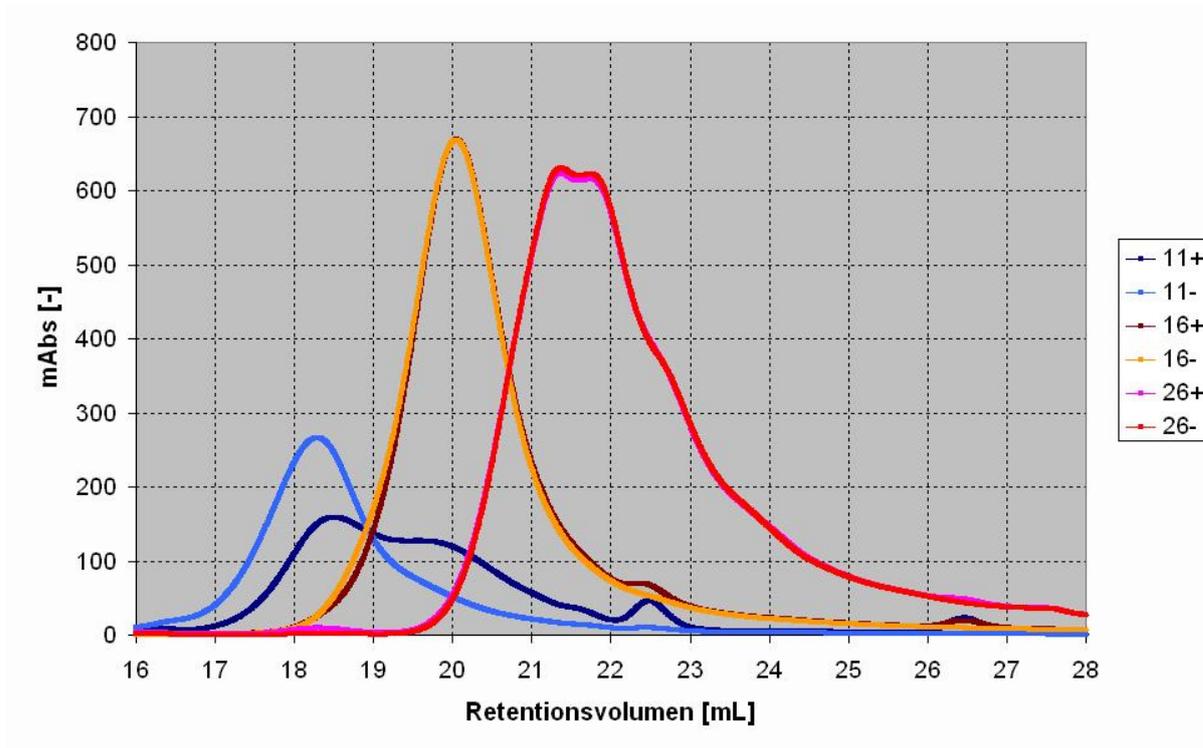


Abbildung 7.6: Proteasebehandlung von Ligninfraktionen

Tabelle 7.4: HP-SEC von proteasebehandelten Ligninfraktionen

Fraktion	11		16		26		
	+	-	+	-	+	-	
M_w	9400	17000	2200	2350	600	600	$[\frac{g}{mol}]$
M_n	2900	7000	1650	1700	450	450	$[\frac{g}{mol}]$
M_p	1100	1450	1900	1900	700	700	$[\frac{g}{mol}]$
P_d	3,26	2,42	1,36	1,39	1,29	1,29	$[-]$
Integration	16,8 - 22,0	17,0 - 22,0	17,0 - 22,0	17,0 - 22,0	19,2 - 27,0	19,2 - 27,0	$[mL]$

- Die Zahl gibt die Nummer der Fraktion an
- + meint die proteasebehandelte Fraktion
- - meint die jeweilige Kontrollprobe

Aus 7.6 ist ersichtlich, dass Protease nur auf Ligninfraktion 11 einen entscheidenden Einfluß hat. Dies ist innerhalb dieser Messreihe die Ligninfraktion mit dem höchsten Molekulargewicht. Die drastische Abnahme des Molekulargewichts dieser Fraktion zeigt, dass hier Lignin stark mit Proteinen vergesellschaftet ist. Die Proteasebehandlung führt zu einer Depolymerisation. Die Abbauprodukte haben unterschiedliche Molekulargewichte, die Polydispersität der Abbauprodukte nimmt stark zu. Dies lässt den Schluss zu, dass die Vergesellschaftung von Lignin und Proteinen an undefinierten Stellen des Gesamt-

moleküls stattfindet. Die Ligninfraktionen 16 und 26 sind vom Proteaseabbau kaum bzw. gar nicht betroffen. Da die Ligninfraktionen gemäß Abbildung 4.3 unterschiedlichen Stickstoffgehalt zeigen, erscheint dieses Ergebnis plausibel. Ligninfraktionen mit einem hohen Proteinanteil zeigen einen drastischen Abbau bei Proteasebehandlung. Eine Vernetzung von Ligninmolekülen mit Protein erscheint daher für diese hochmolekulare Fraktion plausibel, müsste jedoch durch Vergleich der absoluten Molekulargewichtsverteilungen auf Basis einer geeigneten Kalibration der HP-SEC bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass die Behandlung von Ligninfraktionen mit hohem Proteinanteil mittels Proteasen zur Aufreinigung von Lignin und somit zur Abreicherung von Protein angewendet werden könnte.

Kapitel 8

Biomimetische Depolymerisation von Lignin

8.1 Mangan-Katalysator

Abbildung 8.1 zeigt die Molekulargewichtsverteilung der Ligninfraktion 19 vor und nach der Ligninbehandlung. Tabelle 8.1 gibt das Ergebnis numerisch aus.

Es ist ersichtlich, dass der H_2O_2 -abhängigen Mn-PSP-Cl-Katalysator mit Lignin reagiert. Jedoch ist anstatt einer Depolymerisation eine Erhöhung des Molekulargewichts feststellbar. Das Molekulargewicht M_w erhöht sich beinahe auf 150 %, bezogen auf Lignin ohne Katalysator. Unter der Annahme, dass die Erhöhung des Molekulargewichts aufgrund der Repolymerisation von Spaltprodukten der Reaktion von H_2O_2 -abhängigen Mn-PSP-Cl-Katalysator mit Lignin stattfindet, könnte eine räumliche Trennung der Abbauprodukte vom Reaktionssubstrat eine Repolymerisation verhindern. Diese Hypothese müsste in weiteren Versuchen überprüft werden.

Einen Hinweis auf Abbau stellt der Peak bei ca. 24,5 mL dar. Allerdings zeigt auch die Kontrollprobe mit H_2O_2 und Mn-PSP-Cl-Katalysator in diesem Bereich Absorption. Um festzustellen, ob es sich um Abbauprodukte von Lignin, oder um ein Artefakt der Kontrollprobe handelt, müssten die Fraktionen isoliert und weiteren Untersuchungen zugeführt werden. Diese könnte beispielsweise mittels GC/MS durchgeführt werden.

Tabelle 8.1: Mangan-Katalysator

	Lignin mit Katalysator	Lignin ohne Katalysator	Lignin mit H_2O_2	
M_w	1250	850	900	$\left[\frac{g}{mol}\right]$
M_n	750	650	700	$\left[\frac{g}{mol}\right]$
M_p	1100	900	1000	$\left[\frac{g}{mol}\right]$
P_d	1,67	1,30	1,30	$[-]$
Integration	19,2 - 23,6	19,2 - 23,9	19,2 - 23,8	$[mL]$

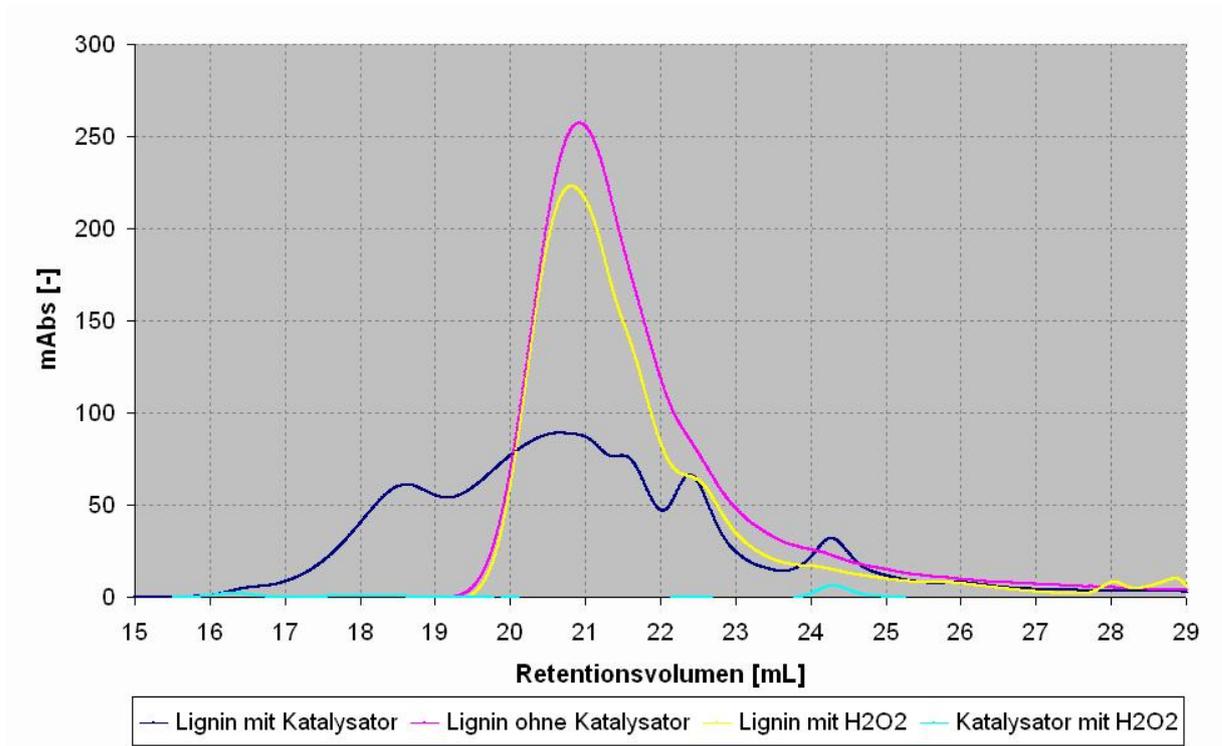


Abbildung 8.1: Mangan Katalysator

8.2 Vanadium-Katalysator

Es wurde der Einfluss von verschiedenen Lösungsmitteln auf das Abbauverhalten des H_2O_2 - unabhängigen Vanadium-Katalysators untersucht.

8.2.1 Vanadium-Katalysator in Dioxan

Abbildung 8.2 zeigt die Molekulargewichtsverteilung der Ligninfraktion 19 vor und nach der Ligninbehandlung mit dem Vanadium-Katalysator. Tabelle 8.2 gibt das Ergebnis numerisch aus. Als Lösungsmittel wurde Dioxan verwendet. Es ist erkennbar, dass sich das Molekulargewicht der Ligninfraktion erhöht. Jedoch ist auch ersichtlich, dass eine Abbaufraktion entsteht. Diese eluiert bei ca. 23 mL. Es lässt sich sagen, dass neben einer Repolymerisation auch ein gezielter Abbau stattfindet. Die geringe Peakbreite lässt auf ein hier auf ein monomeres Produkt schließen, was aber nicht überprüft wurde. Das vermeintliche Abbauprodukt bei ca. 23 mL bleibt ohne räumliche Trennung stabil und repolymerisiert nicht mit dem verbleibenden Teil der behandelten Ligninfraktion.

8.2.2 Vanadium-Katalysator in DMF

In Abbildung 8.3 sieht man die Molekulargewichtsverteilung der Ligninfraktion 19 vor und nach der Ligninbehandlung mit dem Vanadium-Katalysator. Tabelle 8.3 zeigt das

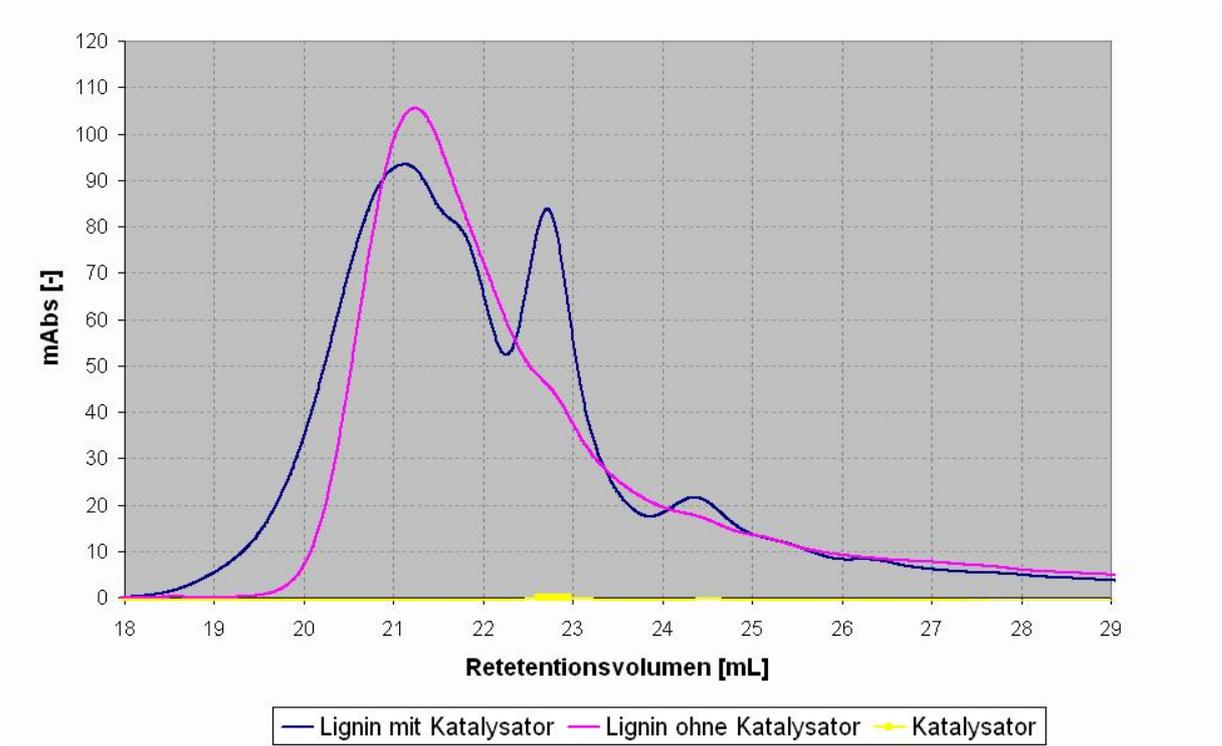


Abbildung 8.2: Vanadium-Katalysator in Dioxan

Tabelle 8.2: Vanadium-Katalysator in Dioxan

	Lignin mit Katalysator	Lignin ohne Katalysator	
M_w	900	700	$\left[\frac{g}{mol}\right]$
M_n	600	550	$\left[\frac{g}{mol}\right]$
M_p	800	750	$\left[\frac{g}{mol}\right]$
P_d	1,52	1,22	$[-]$
Integration	18,8 - 23,8	19,8 - 23,8	$[mL]$

Ergebnis tabellarisch. Als Lösungsmittel wurde DMF verwendet. Es ist ersichtlich, dass die Anwendung der Kombination Vanadium-Katalysator und DMF einen uneingeschränkten Ligninabbau hervorruft. Das Molekulargewicht der Ligninfraktion sinkt und es ist nur eine sehr geringfügige Repolymerisation bei 20 mL zu bemerken. Weiters sind klar Abbauprodukte bei ca 23 mL, 24,5 mL und 25,5 mL erkennbar. Es ist auch erkennbar, dass der Katalysator mit Ausnahme des Peaks bei 25,5 mL bei ähnlichen Retentionsvolumina Absorption zeigt. Jedoch ist die Intensität der Absorption im Chromatogramm der behandelten Fraktion (blaue Kurve in 8.3) wesentlich höher als beim Katalysator ohne Lignin, so dass es sich wahrscheinlich nicht um ein Artefakt, hervorgerufen durch den Katalysator, handelt. Um dies zu bestätigen müssten die Fraktionen isoliert und beispielsweise mittels GC/MS auf Abbauprodukte analysiert werden. Jedoch zeigt sich, dass durch den Einfluss des Lösungsmittels der Verlauf der Reaktion in Richtung Abbau gesteuert werden kann.

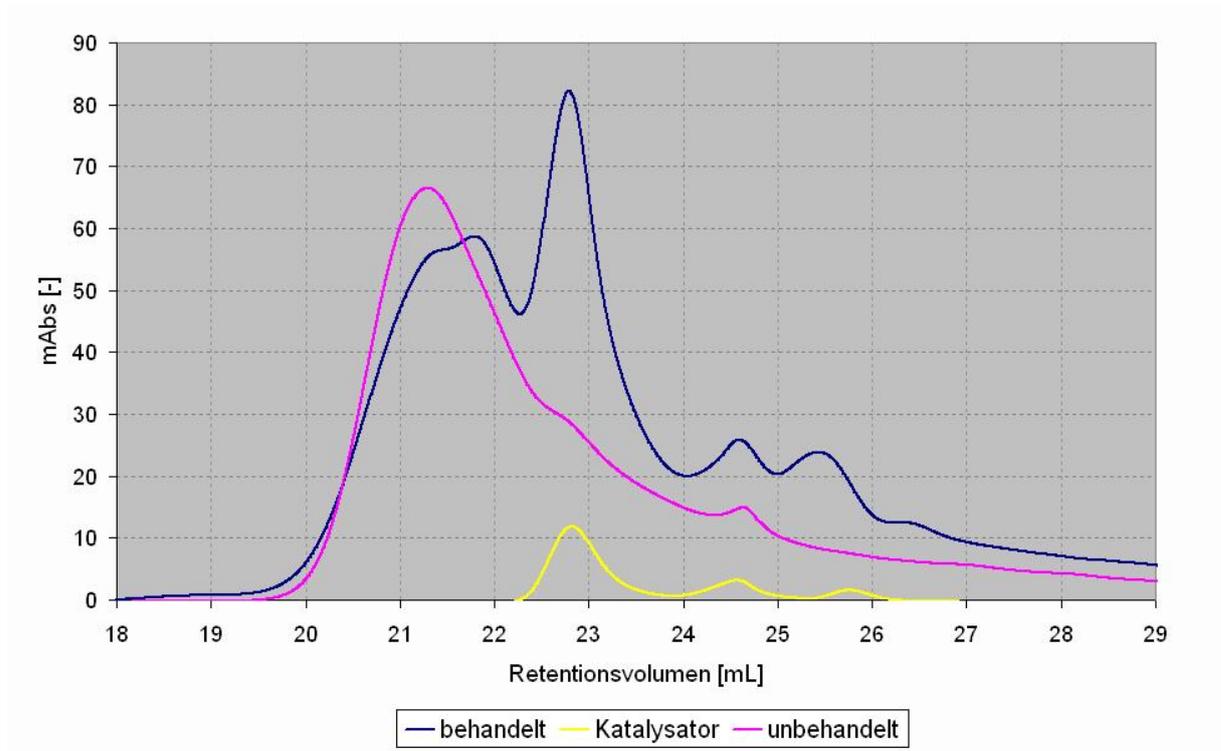


Abbildung 8.3: Vanadium-Katalysator in DMF

Tabelle 8.3: Vanadium-Katalysator in DMF

	Lignin mit Katalysator	Lignin ohne Katalysator	
M_w	750	850	$[\frac{g}{mol}]$
M_n	550	700	$[\frac{g}{mol}]$
M_p	650	900	$[\frac{g}{mol}]$
P_d	1,25	1,25	$[-]$
Integration	19,8 - 24,0	19,8 - 24,0	$[mL]$

Teil IV

Appendix

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
DMF	Dimethylformamid
HAA	3-Hydroxyanthranilsäure
HP-SEC	High Performance Size-Exclusion Chromatography
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettich Peroxidase
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
LA	Laccase
LiP	Lignin-Peroxidase
MnP	Mangan-Perioxidase
Mn-PSP-CI	
PTL	Pretreatment liquor
VA	3,4-Dimethoxybenzylalkohol(Veratrylalkohl)
VP	Versatile peroxidase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
SEC	Größenausschluss-Chromatographie
GC	Gaschromatographie
LC	Flüssigchromatographie

Literaturverzeichnis

- [Archibald, 1992] Archibald F. S (1992). Lignin peroxidase activity is not important in biological bleaching and delignification of unbleached kraft pulp by *trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(9), 3101–9.
- [Bao et al., 1994] Bao W, Fukushima Y, Jensen Jr K. A, Moen M. A, und Hammel K. E (1994). Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Letters*, 354(3), 297–300.
- [Bernini et al., 2009] Bernini R, Gualandi G, Crestini C, Barontini M, Belfiore M. C, Willfoer S, Eklund P, und Saladino R (2009). A novel and efficient synthesis of highly oxidized lignans by a methyltrioxorhenium/hydrogen peroxide catalytic system. studies on their apoptogenic and antioxidant activity. *Bioorg. Med. Chem.*, 17(15), 5676–5682.
- [Chen und Chang, 1985] Chen C. L und Chang H. M (1985). Chemistry of lignin biodegradation. *Biosynth. Biodegrad. Wood Compon., CAPLUS AN 1985:402228 (Conference; General Review)*, (pp. 535–56).
- [Crestini et al., 2005] Crestini C, Pro P, Neri V, und Saladino R (2005). Methyltrioxorhenium: a new catalyst for the activation of hydrogen peroxide to the oxidation of lignin and lignin model compounds. *Bioorg. Med. Chem.*, 13(7), 2569–2578.
- [Ek et al., 2009] Ek M, Gellerstedt G, und Henriksson G (2009). *Volume 1 Wood Chemistry and Wood Biotechnology*. Germany: DE GRUYTER.
- [Gruber, 2011] Gruber E (2011). Pflanzenaufschluss. In E Gruber (Ed.), *Chemische Grundlagen der Zellstoff und Papierherstellung*, volume 1. Germany: Eigenverlag.
- [Hammel und Cullen, 2008] Hammel K. E und Cullen D (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11(3), 349–355.
- [Hammel et al., 1993] Hammel K. E, Jensen, Kenneth A. J, Mozuch M. D, Landucci L. L, Tien M, und Pease E. A (1993). Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.*, 268(17), 12274–81.

- [Higuchi, 2004] Higuchi T (2004). Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 80(5), 204–214.
- [Kirk, 1987] Kirk T. K (1987). Enzymic combustion: the degradation of lignin by white-rot fungi. *Colloq. INRA*, 40(Lignin Enzymic Microb. Degrad.), 51–6.
- [Martinez et al., 2002] Martinez A. T, Ruiz-Duenas F. J, Martinez M. J, del Rio J. C, und Gutierrez A (2002). Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), 425–444.
- [McCarthy, 1998] McCarthy J. L (1998). Brief history of lignin chemistry, technology and utilization. (pp. CELL–030).
- [Müller, 2004] Müller S (2004). *Möglichkeiten der Verwendung von flüssigen Ammoniak bei der Herstellung und Aktivierung von Chemiezellstoffen*. PhD thesis, Universität Stuttgart.
- [Schoemaker und Piontek, 1996] Schoemaker H. E und Piontek K (1996). On the interaction of lignin peroxidase with lignin. *Pure Appl. Chem.*, 68(11), 2089–2096.
- [Singh und Chen, 2008] Singh D und Chen S (2008). The white-rot fungus phanerochaete chrysosporium: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81(3), 399–417.
- [Son und Toste, 2010] Son S und Toste F. D (2010). Non-oxidative vanadium-catalyzed C–O bond cleavage: Application to degradation of lignin model compounds. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 49(22), 3791–3794, S3791/1–S3791/120.
- [Srebotnik und Hammel, 2000] Srebotnik E und Hammel K. E (2000). Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *J. Biotechnol.*, 81(2,3), 179–188.
- [Striegel, 2009] Striegel A. M (2009). *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography - Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography*. New York: John Wiley and Sons, 2 edition.
- [Teeri und Henriksson, 2009] Teeri T und Henriksson G (2009). Enzymes degrading wood components. In E Monica, G Gellerstedt, und G Henriksson (Eds.), *Wood Chemistry and Wood Biotechnology*, volume 1. Germany: DE GRUYTER.
- [Wariishi et al., 1992] Wariishi H, Valli K, und Gold M. H (1992). Manganese(ii) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete phanerochaete chrysosporium. kinetic mechanism and role of chelators. *J Biol Chem*, 267(33), 23688–95.

- [Wong, 2009] Wong D. W. S (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 157(2), 174–209.
- [Yadav und Yadav, 2005] Yadav M und Yadav K. D. S (2005). Enzymatic characteristics of ligninperoxidases from penicillium citrinum, fusarium oxysporum and aspergillus terreus using n-propanol as substrate. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 43(1), 48–51.
- [Zakzeski et al., 2010] Zakzeski J, Bruijninx P. C. A, Jongerius A. L, und Weckhuysen B. M (2010). The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)*, 110(6), 3552–3599.
- [Zikeli, 2010] Zikeli F (2010). *Molmassenbestimmung von Lignin aus Weizenstroh mittels HP-SEC*. Diploma, Technische Unverisität Wien.