

Fonds zur Förderung der Wald- und Holzforschung
c/o Bundesamt für Umwelt BAFU Abteilung Wald
Herrn M. Gautschi
Papiermühlestr.17
3003 Bern

Projektnummer 2009.03

Schlussbericht an den Fonds zur Förderung der Wald- und Holzforschung (WHFF-2009.03)

Behandlung von Nadelholz mit Laccase zur Verbesserung der Widerstandsfähigkeit gegenüber holzverfärbenden Pilzen

Verfasser: Mark Schubert und Julian Ihssen

Projektleitung: Francis Schwarze, Julian Ihssen und Mark Schubert

Datum: Dezember 2010

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	4
2 Einleitung.....	5
2.1 Zielsetzungen.....	6
3 Herstellung Al(OH)₃-immobilisierter Laccase.....	7
3.1 Hintergrund.....	7
3.2 Material und Methoden.....	7
3.3 Ergebnisse.....	8
3.4 Schlussfolgerungen.....	10
4 Screening für biologische Effekte von enzymatischen Holzbehandlungen.....	10
4.1 Hintergrund.....	10
4.2 Material und Methoden.....	11
4.3 Ergebnisse.....	12
4.4 Schlussfolgerungen.....	15
5 Determinierung der Wirkung von Laccase an Ligninmodellsubstanzen und an Holz	16
5.1 Hintergrund.....	16
5.2 Material und Methoden	17
5.3 Ergebnisse.....	20
5.4 Schlussfolgerungen.....	26
6 Wirkung verschiedener Laccasebehandlungen auf Bäumeipilze.....	27
6.1 Hintergrund.....	27
6.2 Material und Methoden.....	28
6.3 Ergebnisse.....	30
6.4 Schlussfolgerungen.....	34

7 Wirkung verschiedener Laccasebehandlungen auf holzersetzende Pilze.....	34
7.1 Hintergrund.....	34
7.2 Material und Methoden.....	35
7.3 Ergebnisse.....	37
7.4 Schlussfolgerungen.....	42
8 Fazit.....	42
9 Literatur	45

1 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund bereits existierender Arbeiten über die Verwendung von umweltverträglichen Substanzen im Holzschutz sowie die enzymatische Funktionalisierung der Holzoberfläche entstand die Projektidee beide Ansätze miteinander zu verbinden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob mit einer Laccasebehandlung eine auswaschungsresistente biozide bzw. biostatische Wirkung auf der Oberfläche von Fichtenholz erzielt werden kann. Die durch Laccase vermittelte Bindung von Substanzen mit fungizider Wirkung an Holz ist eine potenzielle Methode, um die Dauerhaftigkeit gegen Mikroorganismen zu erhöhen und könnte eine umweltfreundliche Alternative zu herkömmlichen Holzschutzverfahren darstellen.

Die prinzipielle Machbarkeit einer enzymatischen Holzbehandlung mit dem Ziel eines auswaschungsresistenten antimikrobiellen Effekts konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Die Anwendung der Laccase in Kombination mit einer geeigneten Substanz zeigte in unseren Studien eine Wirkung gegen ein breites Spektrum von Organismen: Bakterien, Hefepilze sowie gegen filamentöse Pilze aus der Klasse der Ascomyceten und Basidiomyceten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, ein kostengünstiges Verfahren für die Laccaseherstellung zu entwickeln und zudem die Kultivierungsbedingungen für einen Laccase-produzierenden Weissfäulepilz zu optimieren und eine einfache Methode für die Gewinnung immobilisierter Laccase aus dem Kulturüberstand zu etablieren.

Im Laufe der Studien konnte ein potenter Laccaseproduzent (*Heterobasidion annosum*) identifiziert werden. Die Bildung von extrazellulärer Laccase durch diesen Pilz wurde sehr stark durch die Kultivierungsbedingungen und das verwendete Medium beeinflusst. Optimale Bedingungen für die Laccaseproduktion waren belüftete Schottflaschen, Glucosemedium mit Hefeextrakt und Veratrylalkohol als Induktor. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass $\text{Al}(\text{OH})_3$ Partikel geeignet sind, um Laccase aus dem Kulturüberstand schnell und effizient zu „ernten“, aufzukonzentrieren und zu immobilisieren. Zusammen mit den optimierten Kultivierungsbedingungen besteht somit die Möglichkeit, ein einfaches Verfahren zu etablieren, um Laccase für eine enzymatische Holzbehandlung herzustellen.

2 Einleitung

Die vermehrte Verwendung des Werkstoffes Holz in der Schweiz ist aus Gründen der Nachhaltigkeit (CO₂ Bilanz) und der lokalen Wertschöpfung insbesondere in ländlichen Regionen (Berggebiete) wünschenswert. Ein wichtiger Grund, warum viele Bauherren vor der Verwendung von Holz vor allem im Aussenbereich (Fassaden) absehen, ist die geringere Haltbarkeit im Vergleich zu anderen Werkstoffen. Das Problem eines langfristig wirksamen Holzschutzes im Aussenbereich ohne Verwendung umweltschädlicher und gesundheitsgefährdender Chemikalien ist nach wie vor nur unbefriedigend gelöst. Ein besonderes Problem stellt die Besiedlung witterungsexponierter Holzbauteile mit Schimmel- und Bläuepilzen dar, die häufig selbst bei Verwendung moderner Anstrichsysteme nicht verhindert werden kann. So zeigte sich im Rahmen eines KTI-Projektes (2651.DWH) „Entwicklung eines dauerhaften, fungizidarmen Beschichtungssystems auf Holzfassaden unter Berücksichtigung des integrierten Holzschutz“ an der Empa und der Berner Fachhochschule, dass durch den Einsatz von IPBC es möglich ist einen fungiziden Schutz zu erreichen. Dieser Schutz lässt allerdings im zeitlichen Verlauf der Bewitterung deutlich nach. Bereits nach 6 Monaten Freilandbewitterung sind durchschnittlich bis zu 80% des Wirkstoffes im Vergleich zum Ausgangszustand abgebaut.

Mit der im Folgenden beschriebenen Machbarkeitsstudie wurde ein neuer, auf einem biologischen Verfahren basierender Ansatz für effizienten Holzschutz evaluiert und mit dem konventionellen Holzschutzmittel IPBC verglichen. Die Methode basiert auf enzymatischer Aktivierung von Molekülen mit biozider/biostatischer Wirkung und nachfolgender kovalenter Bindung an Holzfasern. Der Vorteil gegenüber konventionellen Holzschutzmitteln wäre hierbei, dass die bioaktiven Substanzen weniger schnell ausgewaschen werden und damit länger wirksam sind. Zudem können möglicherweise umweltfreundliche und wenig toxische Vorläufermoleküle verwendet werden, deren Wirksamkeit durch eine enzymatische Polymerisation auf der Oberfläche stark erhöht wird.

Für das enzymatische Holzbehandlungsverfahren wurde das Enzym Laccase verwendet, da dieses für die Kopplung von Molekülen wie z.B. Phenolsäuren an die Holzoberfläche bzw. an Lignin besonders gut geeignet ist (Abb. 1). Laccasen sind eine Gruppe von Enzymen, die die Oxidation einer Vielzahl von Phenolen, Aminen und weiterer Moleküle katalysieren bei gleichzeitiger Reduktion von Sauerstoff zu Wasser (Abb. 1). Die hierbei gebildeten Radikale können selbst wiederum Reaktionen mit sich selbst (Polymerisation) oder mit anderen Molekülen (z.B. Lignin) eingehen. Laccasen sind robust, benötigen keine besonderen Zusätze und sind bereits in grösseren Mengen und zu bezahlbaren Preisen erhältlich. Es wird prognostiziert, dass Laccasen in Zukunft eine wichtige Rolle spielen bei ungiftigen und energieeffizienten Herstellungsverfahren in der Chemie-, Textil- und Papierindustrie („Green chemistry“).

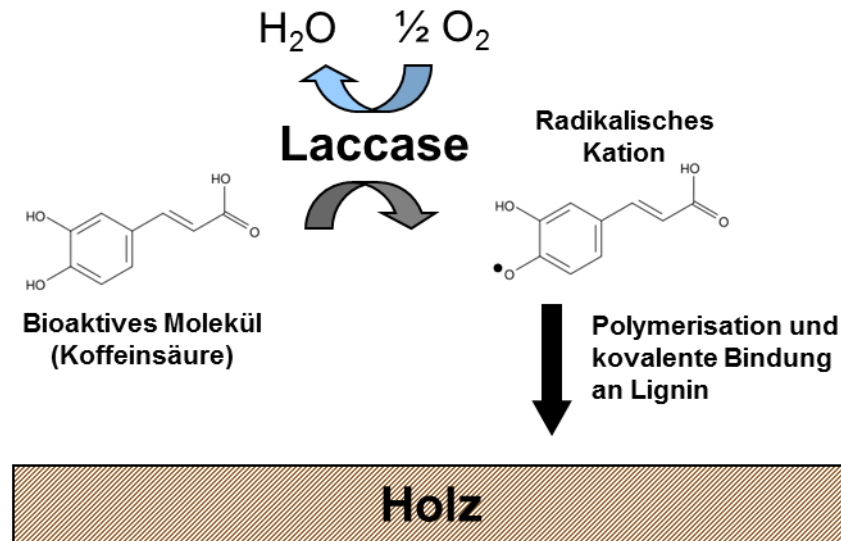


Abbildung 1: Prinzip einer potentiellen Holzbehandlung mit Laccase.

2.1 Zielsetzungen

Hauptzielsetzung der vorliegenden Studie war, zu untersuchen ob mit einer Laccasebehandlung eine auswaschungsresistente biozide bzw. biostatische Wirkung auf der Oberfläche von Fichtenholz erzielt werden kann. Um zu einem kostengünstigen Verfahren für die Laccaseherstellung zu kommen, wurden ausserdem die Kultivierungsbedingungen für einen Laccase-produzierenden Weissfäulepilz optimiert und eine einfache Methode für die Gewinnung immobilisierter Laccase aus dem Kulturüberstand etabliert. Im Laufe der Studie wurde zudem eine einfache, schnelle und effiziente Screeningmethode für die biologische Wirkung von mit spezifischen Substanzen behandelten Holzoberflächen entwickelt.

Konkret sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Welches sind die optimalen Bedingungen für die Produktion von Laccase mit dem Weissfäulepilz *Heterobasidion annosum*?
- Ist fein dispergiertes Aluminiumhydroxid geeignet, um Laccase direkt aus dem Kulturüberstand von *H. annosum* zu immobilisieren?
- Kann mittels einer Laccase-katalysierten Aktivierung geeigneter Enzymsubstrate eine biologische Wirkung auf der Holzoberfläche erreicht werden, die einem intensiven Auswaschungsprozess widersteht?
- Gegen welche Klassen von Organismen wirkt eine Laccase-Behandlung (Bakterien, Hefen, Bläuepilze, Holzzersetzende Pilze)?

- Wie hoch wären die Kosten pro Liter für ein Anstrichsystem mit kommerziell erhältlicher Laccase?

3 Herstellung $\text{Al}(\text{OH})_3$ -immobilisierter Laccase mit *H. annosum*

3.1 Hintergrund

In einer vorangegangenen Studie wurden alle Weissfäulepilze der Empa-Stammsammlung in Bezug auf die Bildung sekretierter Laccase hin untersucht. *H. annosum* (Empa No. 620) war zusammen mit *Physisporinus vitreus* (Empa No. 642) der eindeutig produktivste Stamm, d. h. der Stamm mit der höchsten Aktivität von Laccase im Kulturüberstand.

Um den Stamm für eine effiziente Laccaseproduktion nutzbar machen zu können, wurden diejenigen Kulturbedingungen ermittelt, die die höchste Enzymausbeute ermöglichen.

Zusätzlich wurde eine einfache Methode, basierend auf dem kostengünstigen Adsorbent Aluminiumhydroxid ($\text{Al}(\text{OH})_3$), evaluiert, um Laccase aus dem Kulturüberstand zu konzentrieren und zu immobilisieren. Immobilisierte, wiederverwendbare Laccase könnte die Kosten einer enzymatischen Holzbehandlung nochmals senken.

3.2 Material und Methoden

Kultivierungsexperimente wurden sowohl in Erlenmeyerkolben mit einem Gesamtvolumen von 0.5 L und einem Kulturvolumen von 67 mL, als auch in mit Fritten belüfteten Schottflaschen mit einem Gesamtvolumen von 0.5 L und einem Kulturvolumen von 0.4 L durchgeführt. Die Kulturgefäße wurden mit aus Malzagarplatten ausgestanzten Scheiben, die mit Myzelium von *H. annosum* (Empa No. 620) bedeckt waren, beimpft und bei 25°C inkubiert. Folgendes Grundmedium wurde verwendet: 1.0 g L⁻¹ NH_4NO_3 , 0.8 g L⁻¹ KH_2PO_4 , 0.2 g L⁻¹ Na_2HPO_4 , 0.5 g L⁻¹ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7 mg L⁻¹ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.6 mg L⁻¹ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.5 mg L⁻¹ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.7 mg L⁻¹ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 mg L⁻¹ Na_4EDTA (Herpoel et al. 2000; Songulashvili et al. 2007). Als Wachstumssubstrat wurde entweder 40 g L⁻¹ Fichtensägemehl oder 20 g L⁻¹ Glucose zugegeben. Zu einigen Kulturen wurde ausserdem 2.0 g L⁻¹ Hefeextrakt und/oder 4 mM Veratrylalkohol oder 2 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ zugegeben. Die Laccaseaktivität im Kulturüberstand wurde bei Raumtemperatur (22-25°C) in 50 mM Weinsäurepuffer (pH 4.0) mit 0.5 mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) als Enzymsubstrat bestimmt (Herpoel et al. 2000; Lomascolo et al. 2003). Ein Unit (U) wurde definiert als die Menge Enzym, die 1 µmol ABTS pro Minute umsetzt.

Aluminiumhydroxidpartikel wurden durch langsame Neutralisierung einer 0.5 M AlCl_3 Lösung mit 0.5 M NaOH hergestellt (Ahn et al. 2007). Adsorptionsexperimente wurden mit 25 mg mL^{-1} gewaschenem und gefriergetrocknetem $\text{Al}(\text{OH})_3$ durchgeführt. Zum Vergleich wurde die Adsorption von Laccase an zwei kommerziell erhältliche Adsorbentien, Bentonit (Sigma, Buchs, CH) und Styrol-Divinylbenzol-Partikel (Sepabeads SP-20SS, Mitsubishi/Sigma) untersucht.

3.3 Ergebnisse

Die Bildung von extrazellulärer Laccase durch *H. annosum* wurde sehr stark durch die Kultivierungsbedingungen und das verwendete Medium beeinflusst (Abb. 2). Bei Verwendung von Glucose als Wachstumssubstrat war sowohl der Zusatz von Hefeextrakt als auch von Veratrylalkohol für eine maximale Akkumulation von Laccase im Kulturüberstand nötig (Abb. 2 A). Veratrylalkohol ist ein aromatisches Molekül, das bereits in früheren Studien für die Induktion der Laccasebildung bei Weissfäulepilzen genutzt wurde (Meza et al. 2007). Die Verwendung von belüfteten Schottflaschen für die Kultivierung an Stelle von Erlenmeyerflaschen ermöglichte eine nochmals um den Faktor drei höhere Laccaseausbeute (Abb. 2 B). Mit dem kostengünstigeren Sägemehl als Wachstumssubstrat konnte keine so starke Laccasebildung erreicht werden wie mit Glucose (Abb. 2 B), trotz einer starken Biomassebildung.

Kulturüberstand von Kulturen mit den optimalen Bedingungen (belüftete Schottflaschen, Glucosemedium mit Hefeextrakt und Veratrylalkohol) wurde im Nachfolgenden für Immobilisierungsexperimente verwendet. Es zeigte sich, dass Laccase direkt an $\text{Al}(\text{OH})_3$ Partikel gebunden werden kann mit einer Ausbeute an aktivem Enzym von ca. 40% (WP, Abb. 3). Für eine vollständige Adsorption war eine Inkubationszeit von 20 h nötig (Abb. 3). Zwei kommerziell erhältliche Adsorbentien waren nicht für die Immobilisierung aktiver Laccase geeignet (Abb. 3).

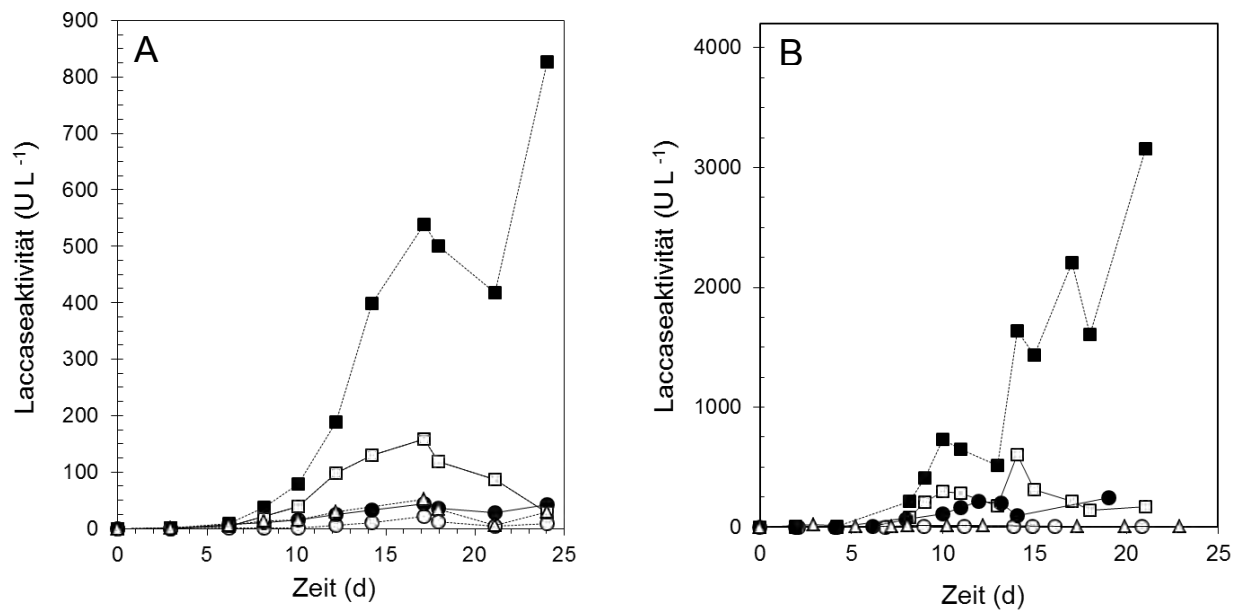


Abbildung 2: Effekt verschiedener Kultivierungsbedingungen auf die Laccaseproduktion von *H. annosum*. (A) Statisch inkubierte Erlenmeyerkolben mit Glucosemedium ■ + Hefeextrakt + Veratrylalkohol, □ + Hefeextrakt, ● + Veratrylalkohol, Δ + CuSO₄, ○ keine Zusätze. (B) Belüftete Schottflaschen; ■ Glucosemedium + Hefeextrakt + Veratrylalkohol, ● Fichtensägemehlmedium + Hefeextrakt + Veratrylalkohol, □ Fichtensägemehlmedium + Hefeextrakt, Δ Fichtensägemehlmedium + Veratrylalkohol, ○ Fichtensägemehlmedium ohne Zusätze. Mittelwert von jeweils zwei Parallelexperimenten pro Bedingung.

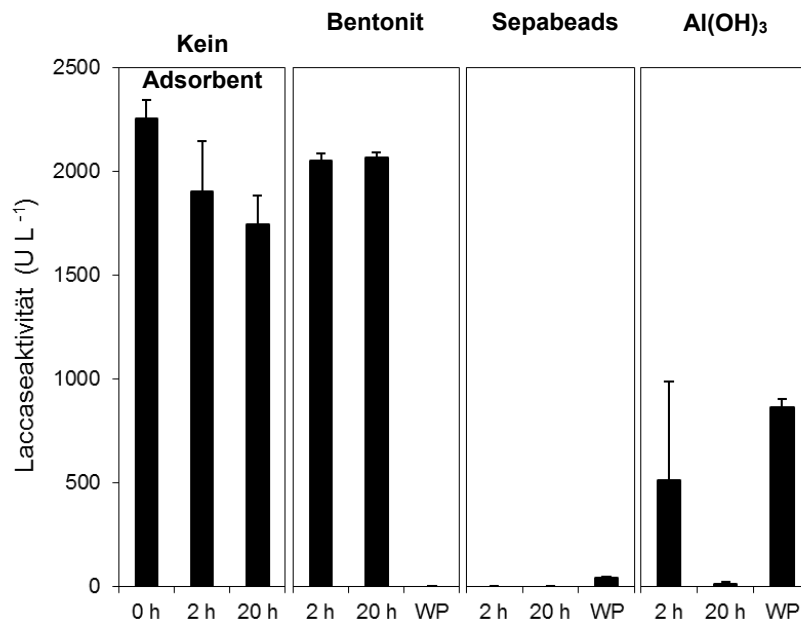


Abbildung 3: Direkte Immobilisierung von Laccase aus Kulturüberstand von *H. annosum* an Al(OH)₃ Partikel. Aktivität in der Flüssigphase nach verschiedenen Inkubationszeiten (Mittelwert und Standardabweichung von n = 3 Parallelansätzen). WP: An Partikel gebundene Aktivität nach dreimaligem Waschen und Resuspension in gleichem Volumen von 5 g L⁻¹ NaCl.

3.4 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie wurden Kultivierungsbedingungen definiert, die eine effiziente Produktion von Laccase mit dem Weissfäulepilz *H. annosum* erlauben. Bevor Sägemehl, ein kostengünstiges Nebenprodukt aus der Holzverarbeitenden Industrie, als Wachstumssubstrat einsetzen zu können, sind allerdings weitere Untersuchungen nötig. Es konnte ausserdem gezeigt werden, dass $\text{Al}(\text{OH})_3$ Partikel geeignet sind, um Laccase aus dem Kulturüberstand zu „ernten“, aufzukonzentrieren und zu immobilisieren. Zusammen mit den optimierten Kultivierungsbedingungen besteht somit die Möglichkeit, ein einfaches Verfahren zu etablieren, um Laccase für eine enzymatische Holzbehandlung herzustellen. Allerdings muss das Verfahren zunächst noch im Pilot- und Industriemassstab getestet werden (up-scaling).

4 Screening für biologische Effekte von enzymatischer Holzbehandlung

4.1 Hintergrund

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass mit Laccase Holz bzw. Lignin modifiziert werden kann und dass eine Laccase-katalysierte Kopplung von aromatischen Molekülen an Holz oder andere geeignete Fasern möglich ist (Hüttermann et al. 2001; Rättö et al. 2004; Elegir et al. 2008; Kudanga et al. 2008; Schroeder et al. 2008). In der Arbeit von Elegir et al. (2008) konnte ein starker antimikrobieller Effekt nach Behandlung von ungebleichten (d.h. Ligninhaltigen) Papierhandtüchern mit Laccase und verschiedenen Substanzen, die vom Enzym aktiviert werden, nachgewiesen werden. Zwei der effektivsten Enzymsubstrate waren hierbei Isoeugenol und Koffeinsäure. Von Isoeugenol, ein Bestandteil bestimmter ätherischer Öle aus Pflanzen, ist ausserdem eine antipilzliche Wirkung bekannt (Voda et al. 2003b). In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob eine auswaschungsresistente antimikrobielle Wirkung nach einer Laccasebehandlung mit diesen und weiteren von Laccase direkt oder indirekt oxidierbaren Substanzen auch auf Fichtenholzoberflächen nachgewiesen werden kann. Der weniger zeitaufwendiger Nachweis einer inhibierenden Wirkung auf schnellwachsende einzellige Mikroorganismen (Bakterien, Hefen) sollte ausserdem dazu verwendet werden, aus einer grösseren Zahl von Substanzen solche auszuwählen, die eventuelle für ein enzymatisches Holzschutzverfahren geeignet sind. Die Oxidation vieler Moleküle durch Laccase kann mit Hilfe von sogenannten Redoxmediatoren, das sind leicht oxidierbare Laccasesubstrate, die zwischen oxidiertem und reduzierten Zustand pendeln können und dadurch Sekundärsubstrate umsetzen, deutlich beschleunigt werden. Aus diesem Grund wurden mehrere Behandlungsvarianten auch mit Zugabe von Mediatoren durchgeführt.

4.2 Material und Methoden

Für das Screening antimikrobieller Effekte wurde Fichtenholzstücke einer Grösse von 1 x 1 x 0.5 cm verwendet. Die Holzstückchen wurden zunächst durch Hitze (120°C, 20 min) sterilisiert und dann für 18 h unter sterilen Bedingung in Puffer (Kontrolle 1), in Puffer mit Enzymsubstrat (Kontrolle 2), in Puffer mit Laccase (Kontrolle 3), und in Puffer mit Laccase und Enzymsubstrat (Behandlung) inkubiert (bei Raumtemperatur, geschüttelt, in Bechergläsern oder Reagenzgläsern). In der ersten Serie von Experimenten wurde anschliessend 5 x 10 min mit destilliertem Wasser gewaschen, in der zweiten Serie wurde 5 x über Nacht mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde überschüssige Flüssigkeit durch Aufsetzen auf ein Steriles Kleenex-Tuch absaugt (10 min) und anschliessend wurde die Oberfläche mit 40 µL frischer Bakterien- oder Hefesuspension beimpft, die 5-fach verdünntes Komplexmedium enthält zur Nährstoffversorgung der Zellen. Die beimpften Holzstückchen wurden 18-20 h bei der jeweils optimalen Wachstumstemperatur in wassergesättigter Atmosphäre inkubiert. Die Oberfläche wurde anschliessend für 2-3 sec auf eine Komplexmedium-Agarplatte gedrückt („gestempelt“) und nach weiterer Inkubation für 20-48 h wurde das Wachstum visuell analysiert. Folgende Testorganismen wurden verwendet: *Escherichia coli* ATTC 11229 (Gram-negatives Bakterium), *Staphylococcus aureus* ATCC 3536 (Gram-positives, pathogenes Bakterium) und *Saccharomyces cerevisiae* DSM 70449 (einzelliger Hefepilz). In Serie 1 wurden die in Abbildung 4 aufgeführten Substanzen (Substrate) getestet, wobei bei Thymol und 1-Naphtol auch eine Behandlung mit gleichzeitiger Zugabe des Redoxmediators ABTS untersucht wurde. In Serie 2 wurde eine weitere Substanz X (vertraulich, da eventuell Patentierung geplant) evaluiert, die sowohl ohne als auch mit den Mediatoren ABTS und Acetosyringon (ACS) eingesetzt wurde. Die folgenden Konzentrationen wurden in den Ansätzen verwendet: Phenolische Substrate 4 mM, Substanz X 10 mM und 50 mM, ABTS 10 µM, ACS 50 µM, kommerzielle Laccase aus *Trametes versicolor* (Sigma) 50 mg L⁻¹ (entspricht ca. 1000 U L⁻¹).

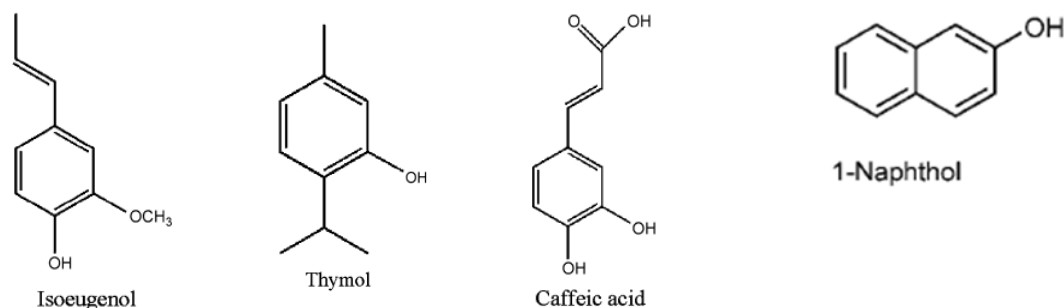


Abbildung 4: In Serie 1 untersuchte, potentiell antimikrobiell wirksame Substanzen bzw. Enzymsubstrate.

4.3 Ergebnisse

Für keine der vier untersuchten phenolischen Moleküle konnte ein durch Reaktion mit Laccase erwirkter, inhibierender und auswaschungsresistenter Effekt auf Bakterien oder Hefepilze festgestellt werden (Abb. 5). Für Thymol, Isoeugenol und 1-Naphtol war im Gegenteil sogar eine Detoxifizierung in Folge der Reaktion mit Laccase zu beobachten (Abb. 5). Die Behandlung mit Thymol, Isoeugenol und 1-Naphtol ohne Laccase wirkte stärker inhibierend auf *S. aureus* und *S. cerevisiae* als auf *E. coli*.

In Serie 2 wurde eine weitere Substanz (X) untersucht, die sowohl direkt als auch indirekt über Redoxmediatoren von Laccase oxidiert werden kann. Die Oxidation von Substanz X durch Laccase konnte spektrophotometrisch nachgewiesen werden, und die Reaktion wurde in Anwesenheit katalytischer Konzentrationen der Mediatoren ABTS (synthetisch) und ACS (natürlich vorkommend) stark beschleunigt (Daten nicht gezeigt). Durch eine Oberflächenbehandlung mittels Laccase-katalysierte Oxidation von Substanz X konnte sowohl mit und als auch ohne Redoxmediatoren eine vollständige Wachstumsinhibition bzw. Abtötung aller drei Testorganismen erreicht werden (Abb. 6). Die durch Laccase und Substanz X erzielte antimikrobielle Wirkung war stark auswaschungsresistent, da der Effekt auch nach fünf aufeinanderfolgende Waschschrte von jeweils mindestens 16 h, unter Schütteln und mit vollständigem Austausch des Waschwassers nach jedem Schritt vorhanden war.

Für die Holzbehandlung mit Laccase, Substanz X und den Mediatoren ABTS und ACS wurden weitere Varianten untersucht. Insbesondere war von Interesse, ob die Behandlungszeit und die Konzentration von Substanz X reduziert werden können. Für diese Testreihe wurde der in den vorangegangenen Experimenten resistensteste Mikroorganismus verwendet, d.h. *E. coli*. Es zeigte sich, dass 2 h Inkubationszeit zu kurz sind, dass aber die eingesetzte Konzentration von Substanz X um den Faktor 5 verringert werden kann ohne Verlust der antimikrobiellen Wirkung, zumindest bei Verwendung von ABTS als Mediator (Abb. 7).











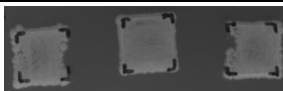
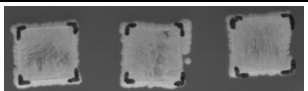
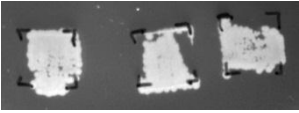
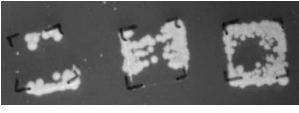
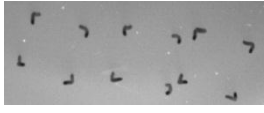
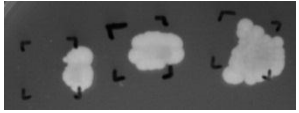
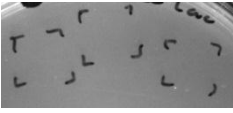
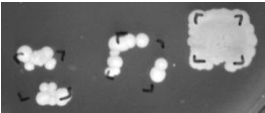
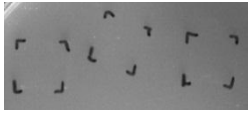
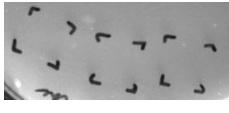
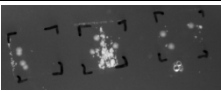
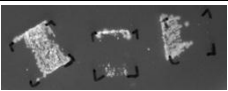

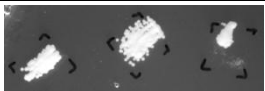
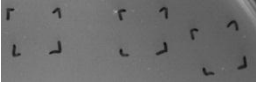

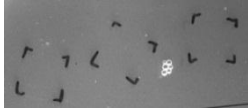

<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229			
Puffer pH5 + Isoeugenol	Puffer pH5 + Isoeugenol + Laccase	Puffer pH5 + Thymol	Puffer pH5 + Thymol + Laccase
			
Puffer pH4 + Thymol + ABTS	Puffer pH4 + Thymol + ABTS + Laccase	Puffer pH5 + 1-Naphtol	Puffer pH5 + 1-Naphtol + Laccase
			
Puffer pH4 + 1-Naphtol + ABTS	buffer pH4 + 1-Naphtol + ABTS + Laccase	Puffer pH5 + Koffein-säure	Puffer pH5 + Koffein-säure + Laccase
			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538			
Puffer pH5	Puffer pH5 + Laccase	Puffer pH5 + Isoeugenol	Puffer pH5 + Isoeugenol + Laccase
			
Puffer pH4 + Thymol + ABTS	Puffer pH4 + Thymol + ABTS + Laccase	Puffer pH5 + 1-Naphtol	buffer pH5 + 1-Naphtol + Laccase
			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSM 70449			
Puffer pH5	Puffer pH5 + Laccase	Puffer pH5 + Isoeugenol	Puffer pH5 + Isoeugenol + Laccase
			
Puffer pH4 + Thymol + ABTS	Puffer pH4 + Thymol + ABTS + Laccase	Puffer pH5 + 1-Naphtol	Puffer pH5 + 1-Naphtol + Laccase
			

Abbildung 5: Effekt verschiedener Behandlungsvarianten (Serie 1) mit und ohne Laccase auf das Wachstum und Überleben von Bakterien und Hefen auf der Oberfläche von Fichtenholz (Wachstum auf Agaroberfläche nach „Stempeln“).


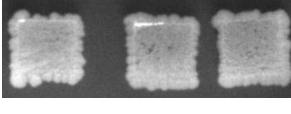
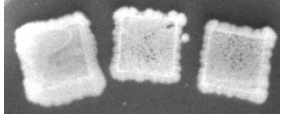
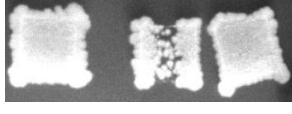
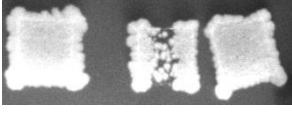


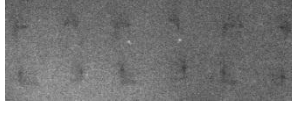





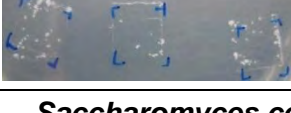







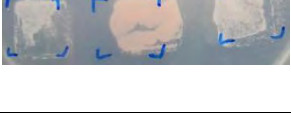


<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229			
Puffer	Puffer + Laccase	Puffer + ABTS	Puffer + Substanz X
			
Puffer + ABTS + Laccase	Puffer + ABTS + Substanz X	buffer + Substanz X + Laccase	Puffer + ABTS + Substanz X + Laccase
			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538			
Puffer	Puffer + Laccase	Puffer + ABTS	Puffer + Substanz X
			
Puffer + ABTS + Laccase	Puffer + ABTS + Substanz X	Puffer + Substanz X + Laccase	Puffer + ABTS + Substanz X + Laccase
			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSM 70449			
Puffer	Puffer + Laccase	Puffer + ABTS	Puffer + Substanz X
			
Puffer + ABTS + Laccase	Puffer + ABTS + Substanz X	Puffer + Substanz X + Laccase	Puffer + ABTS + Substanz X + Laccase
			

Abbildung 6: Effekt verschiedener Behandlungsvarianten (Serie 2) mit und ohne Laccase und Substanz X auf das Wachstum und Überleben von Bakterien und Hefen auf der Oberfläche von Fichtenholz (Wachstum auf Agaroberfläche nach „Stempeln“).



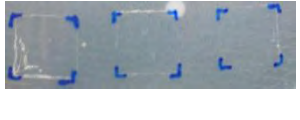







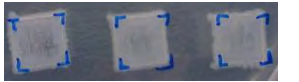



<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 – Mediator ABTS			
50 mM Weinsäure-puffer pH4 Mediator: 10 μM ABTS	Puffer + ABTS + 50 mM Substanz X (Kontrolle)	Puffer + ABTS + 50 mM Substanz X + Laccase	Puffer + ABTS + 10 mM Substanz X + Laccase
Reaktionszeit 20 h			
Reaktionszeit 2 h			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 – Mediator ACS			
100 mM Zitrat-Phosphat- Puffer pH5 Mediator: 50 μM ACS	Puffer + ACS + 50 mM Substanz X (Kontrolle)	Puffer + ACS + 50 mM Substanz X + Laccase	Puffer + ACS + 10 mM Substanz X + Laccase
Reaktionszeit 20 h			
Reaktionszeit 2 h			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 – ohne Mediator			
100 mM Zitrat-Phosphat- Puffer pH5	Puffer + 50 mM Substanz X (Kontrolle)	Puffer + 50 mM Substanz X + Laccase	
Reaktionszeit 20 h			

Abbildung 7: Test verringerter Substratkonzentrationen und Inkubationszeiten auf die antimikrobielle Wirkung bei der enzymatischen Holzbehandlung mit Substanz X (Wachstum auf Agaroberfläche nach „Stempeln“).

4.4 Schlussfolgerungen

Die prinzipielle Machbarkeit einer enzymatischen Holzbehandlung mit dem Ziel eines auswaschungsresistenten antimikrobiellen Effekts konnte nachgewiesen werden. Allerdings kommt es entscheidend darauf an, das richtige Enzymsubstrat zu wählen. Mit von anderen Autoren als wirksam beschriebenen phenolischen Substanzen konnte in unseren Experimenten keine Laccase-abhängige Inhibition von Mikroorganismen erzielt werden. Die in dieser Studie entwickelte, sehr einfache Screeningmethode für antimikrobielle Effekte von (Holz-)oberflächen könnte sich für ein Vorscreening von potentiellen neuen Holzschutzwirkstoffen als wertvoll erweisen, da so der Umfang von Tests mit holzzersetzenden Pilzen, die wesentlich aufwändiger sind, reduziert werden kann.

5 Determinierung der Wirkung von Laccase an Ligninmodellsubstanzen und an Holz

5.1 Hintergrund

Nach der Cellulose ist das Lignin der zweitwichtigste Bestandteil der pflanzlichen Biomasse und damit auch die zweithäufigste organische Verbindung der Natur. Es verleiht der Zellwand Druckfestigkeit und ist meist in Wänden von verholzten Pflanzenzellen mit Stütz- und Festigungsfunktion vorhanden. So ist das Lignin der eigentliche Verholzungsstoff. Es ist die Zellwandkomponente, die aus pflanzlichen Geweben Holz entstehen lässt. Lignin ist ein dreidimensional verzweigtes Polymer und besteht in erster Linie aus aromatischen Bausteinen in Form von Phenylpropaneinheiten. Auf natürlichem Wege entsteht Lignin durch die oxidative Polymerisation der Phenylpropaneinheiten, die meistens durch C-C-Bindungen und Etherbindungen miteinander verbunden sind (Abb. 8).

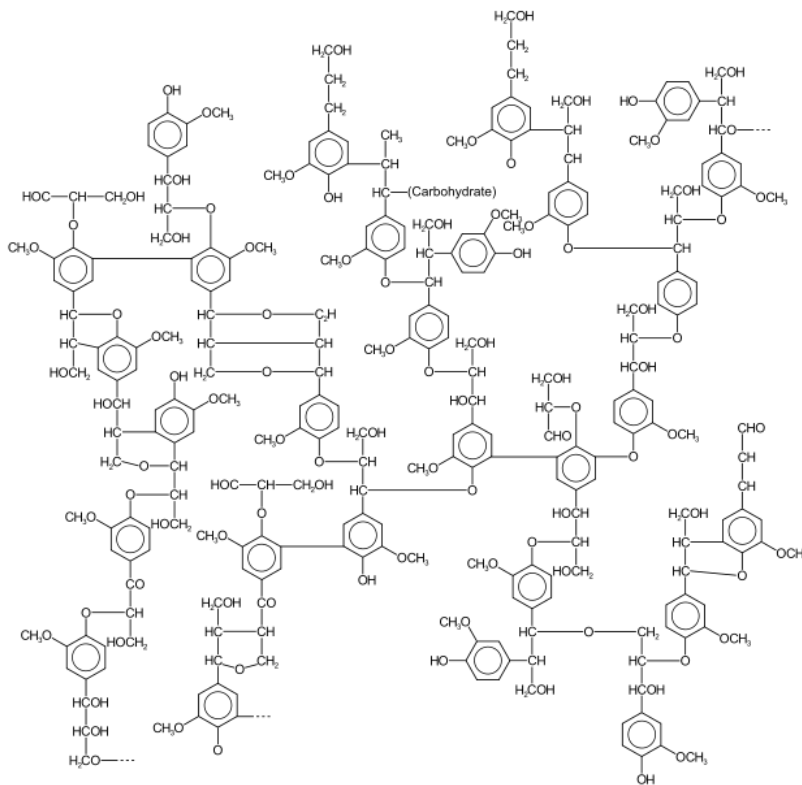


Abbildung 8: Vereinfachter und unvollständiger Aufbau eines Ligninmoleküls nach Adler (1977).

Grundbausteine des Lignins sind Guaiacyl, Syringyl und p-Hydroxyphenyl. Das Verhältnis zwischen diesen Grundbausteinen ist art- und sogar organspezifisch. Vorläufersubstanz von Guaiacyl ist Coniferylalkohol, Syringyl entsteht aus Sinapylalkohol, p-Hydroxyphenyl aus p-Cumarylalkohol (Abb. 9)

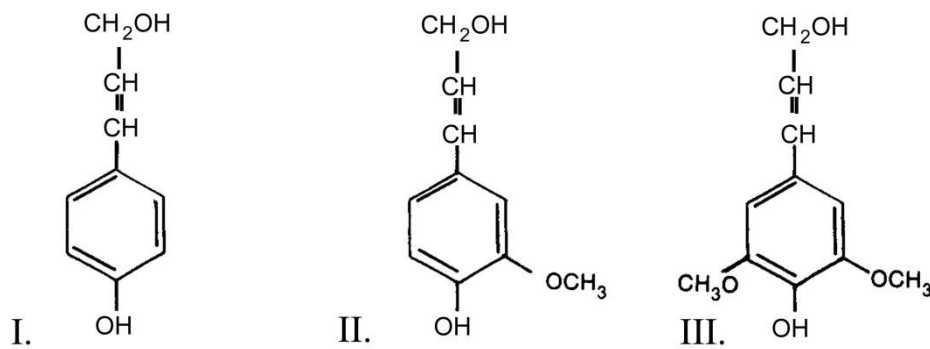
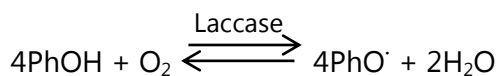


Abbildung 9: Strukturformeln von p-Cumarylalkohol (I), Guaiacyl (II) und Syringyl (III) (Schwarze 2008)

Die Vorläufersubstanzen werden im Laufe der Ligninsynthese von Enzymen wie Laccasen oder Peroxidasen durch Abspaltung des phenolischen Hydrogenatoms in reaktionsfreudige Radikale umgewandelt. Diese Radikale polymerisieren und bilden das Ligninmolekül.

Da sich Lignin u.a. aus phenolischen Verbindungen zusammensetzt führt eine Behandlung mit Laccase zur Oxidation und Radikalisierung der sich an der Holzoberfläche befindlichen Ligninmoleküle (Grönqvist et al. 2006; Widsten and Kandelbauer 2008; Kudanga et al. 2010).



Dadurch wird die Holzoberfläche „aktiviert“ und für eine gewisse Zeit zur weiteren Reaktion mit anderen Stoffen befähigt. Auf diese Weise ist es möglich, verschiedenste Substanzen an die Holzoberfläche zu „binden“. Des Weiteren können sogenannte Anker-moleküle an die Holzoberfläche gekoppelt werden, welche diese dauerhaft aktivieren und so eine spätere Reaktion mit den gewünschten Stoffen ermöglicht (Kudanga et al. 2008; Kudanga et al. 2009).

Die im Folgenden vorgestellten Untersuchungen hatten zum Ziel die Wirkung der Laccase auf die Holzoberfläche genauer zu charakterisieren.

5.2 Material und Methoden

Oxidation der Ligninmodellsubstanzen und Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten

In diesem Versuch sollte die Reaktion zwischen Laccase und Lignin untersucht werden. Aufgrund des heterogenen Aufbaus von Lignin ist es in der Forschung üblich, dieses durch Ligninmodellsubstanzen für eine Vielzahl von Versuchen zu ersetzen. Der strukturelle Aufbau dieser Modellsubstan-

zen ist bekannt, so dass chemische Reaktionen besser kontrolliert und interpretiert werden können, als es mit natürlichem Lignin möglich wäre. Guaiacol und Syringol dienten als Modellsubstanzen für phenolische, Veratrylalkohol für nicht-phenolische Ligninverbindungen (Abb. 10) (Bourbonnais and Paice 1990; Johannes and Majcherczyk 2000; Leonowicz et al. 2001).

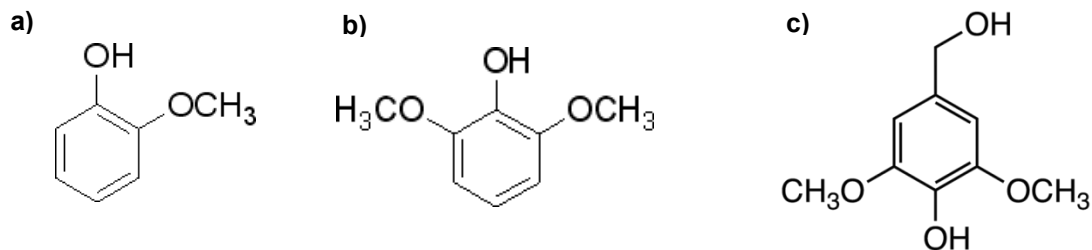


Abbildung 10: Ligninmodellsubstanzen. a) Guaiacol (2-methoxyphenol), b) Syringol (2,6-Dimethoxyphenol), c) Veratrylalkohol (3,4-Dimethoxybenzylalkohol)

Für jede der drei verwendeten Ligninmodellsubstanzen wurden jeweils drei Lösungen präpariert:

- Modellsubstanz (4 mM)
- Modellsubstanz mit Laccase (15 U / ml)
- Modellsubstanz mit Laccase (15 U / ml) und Mediator (5 mM)

Folgende Mediatoren wurden eingesetzt: ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure, CAS Nr. 30931-67-0), HBA (4-hydroxybenzoesäure, CAS Nr. 99-96-7), Violursäure (5-hydroxyimino-1,3-diazinane-2,4,6-trione, CAS Nr. 87-39-8) und PAS (4-amino-2-hydroxybenzoesäure, CAS Nr. 65-49-6) Sigma-Aldrich (Schweiz).

Als Lösungsmittel diente Citratpuffer. Die Konzentration der Modellsubstanzen betrug jeweils 4 mM. Unmittelbar nach der Herstellung jeder Lösung wurden deren Extinktionen im Wellenlängenbereich 200 nm – 800 nm mittels einer UV-Küvette (1,5 ml halbmikro, Brand, Wertheim, Deutschland) mit dem Photometer gemessen. Bei den Laccase- bzw. Laccase-Mediator-Lösungen erfolgte zusätzlich noch eine Messung nach 18 Stunden (Inkubation bei Raumtemperatur). Citratpuffer diente jeweils als Nullwert.

Um die Reaktion zwischen Enzym und Ligninmodellsubstanz zu charakterisieren, sollten die jeweiligen Michaelis-Menten-Konstanten ermittelt werden. Hierzu wurde von jeder Modellsubstanz eine Verdünnungsreihe hergestellt (Stammlösung der Modellsubstanz zu 12,5 mM; Verdünnungsschritte 1:2). Bei Guaiacol und Syringol wurden von jeder Verdünnung 800 µl zusammen mit 200 µl einer 1:100 verdünnten Laccase-Lösung (15 U / ml) in Küvetten pipettiert und die Extinktion während 10 Minuten bei 456 nm (Guaiacol) bzw. bei 468 nm (Syringol) gemessen (Heinfling et al. 1998). Bei Veratrylalkohol wurden 200 µl unverdünnte Laccase-Lösung verwendet, die Messung erfolgte bei 310 nm (Bourbonnais et al. 1998). Mit Hilfe der Messdaten wurde für Guaiacol und Syringol die je-

weilige spezifische katalytische Aktivität der Laccase errechnet und in Funktion der Substratkonzentration aufgetragen. Für die Berechnungen wurden folgende molare Extinktionskoeffizienten verwendet: $\epsilon_{456}=27.5\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{468}=27.5\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Heinfling et al. 1998). V_{MAX} wurde aus arithmetischer Mittelbildung der 3 höchsten spezifischen katalytischen Aktivitäten hergeleitet. Durch logarithmische Regression wurde der KM-Wert bestimmt.

Detektion von Oxidationsprodukten

Es wurde angenommen, dass Laccase bzw. Laccase in Verbindung mit Mediator mit Holz reagiert und die Reaktionsprodukte in eine sie umgebende Lösung übergehen würden. Da Lignin u.a. aus phenolischen Monomeren aufgebaut ist, ging man davon aus, dass die Reaktionsprodukte ebenfalls aus phenolischen Verbindungen bestehen würden, welche man bei 237 nm (Vivekanand et al. 2008) bzw. deren phenolische Hydroxylgruppen bei 280 nm (Müller et al. 2009) photometrisch detektieren könnte. Eine erhöhte Extinktion in diesen Wellenlängen liesse somit auf eine Reaktion zwischen Holz und Laccase schließen. Zu diesem Zweck wurden jeweils 11 Holzproben in Bechergläser zwischen zwei Metallgitter gelegt und mit einem Bleiklotz beschwert. 200 ml einer der folgenden Lösungen wurden dann in je ein Becherglas gegeben:

- Citratpuffer
- Citratpuffer mit Laccase (15 U / ml)
- Citratpuffer mit Laccase (15 U / ml) und Mediator (5 mM)

Die Bechergläser wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt und bei Raumtemperatur inkubiert. Der Versuch wurde zweimal mit unterschiedlicher Methodik durchgeführt: Bei der ersten Versuchsdurchführung wurden von jeder Lösung 1 ml nach 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 24 Stunden entnommen und die Extinktion bei 237 nm und 280 nm mit UV-Küvetten photometrisch gemessen. Für die Laccase-Mediator-Lösung wurde bei 280 nm jedoch die Messgrenze des Photometers überschritten, so dass hier keine verwertbaren Messdaten erhalten werden konnten. Bei der zweiten Versuchsdurchführung wurden von jeder Lösung 2 ml nach 10, 20 und 40 Minuten sowie nach 1, 2, 4 und 24 Stunden entnommen und während 30 Sekunden bei 14100 rpm zentrifugiert. Die Extinktion der Proben bei 280 nm wurde mit einer 1:10-Verdünnung gemessen, so dass die Messgrenze des Photometers nicht erreicht wurde. Verdünnungsmittel war Citratpuffer. Die Messung bei 237 nm erfolgte identisch zur ersten Versuchsdurchführung. Zur Extinktionsbestimmung wurden UV-Küvetten verwendet. Citratpuffer diente als Nullwert.

Untersuchung der Holzoberfläche mittels FTIR

Eine Veränderung der verschiedenen Holzbestandteile (v.a. Lignin) durch eine Behandlung mit Laccase und Laccase in Verbindung mit Mediatoren wurde mittels FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) untersucht. Es wurde angenommen, dass sich durch die Behandlungen v.a. eine Veränderung des Lignins erkennen lassen würde. Zu diesem Zweck wurden folgende Lösungen (Lösungsmittel: Citratpuffer) hergestellt, zu je 3 Holzproben in ein Becherglas gegeben und während 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert:

- reiner Citratpuffer
- Laccase (15 U / ml)
- Laccase (15 U / ml) + Mediator (5 mM)

Nach der Inkubationszeit erfolgte die Messung im FTIR-Gerät (BioRad FTS 6000 von Digilab, Philadelphia, USA) im Wellenzahlenbereich von 600 cm^{-1} – 4000 cm^{-1} (single reflection diamond ATR mode, P/N 10.500 series, golden gate; 32 scans, 4 cm^{-1} Auflösung). Da für jede Behandlungsvariante 3 Datensätze erhalten wurden, wurden die Messwerte zuerst gemittelt und dann jeweils nach für Zellulose oder Hemizellulose typischen Wellenzahlen (Faix 1991; Pandey 1999; Pandey and Pitman 2003) normalisiert (Tab. 1).

Tabelle 1: Charakteristische Wellenzahlen für Zellulose (Normalisierung der Daten)

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung
1738	C=O in Hemizellulose
1375	C-H in Zellulose und Hemizellulose
1158	C-O-C in Zellulose und Hemizellulose
898	C-H in Zellulose

5.3 Ergebnisse

Oxidation der Ligninmodellsubstanzen und Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten

Abbildungen 11 und 12 zeigen die spezifische katalytische Aktivität der Laccase für Guaiacol und Syringol in Funktion der Substratkonzentration (rote Kurven). Bei Veratrylalkohol konnte keine bzw. nur eine geringe Extinktionsänderung beobachtet werden. Das Laccase auf Grund des geringen Redox-Potentials nicht phenolische Bestandteile nicht bzw. nur im begrenzten Masse umsetzen kann, wurde von Bourbonnais and Paice (1990) gezeigt.

Für die logarithmische Regression (schwarze Kurven) sind jeweils das Bestimmtheitsmaß sowie die Gleichung angegeben. Die jeweiligen Michaelis-Menten-Konstanten (K_M) und $\frac{1}{2} V_{MAX}$ -Werte können aus Tabelle 2 entnommen werden.

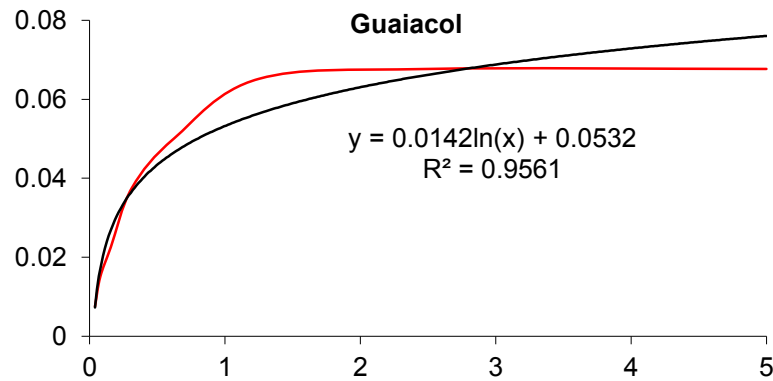


Abbildung 11: Michaelis-Menten-Diagramm vom Guaiacol-Laccase-System. Abszisse: Substratkonzentration (mM), Ordinate: spezifische katalytische Aktivität (U / mg Enzym)

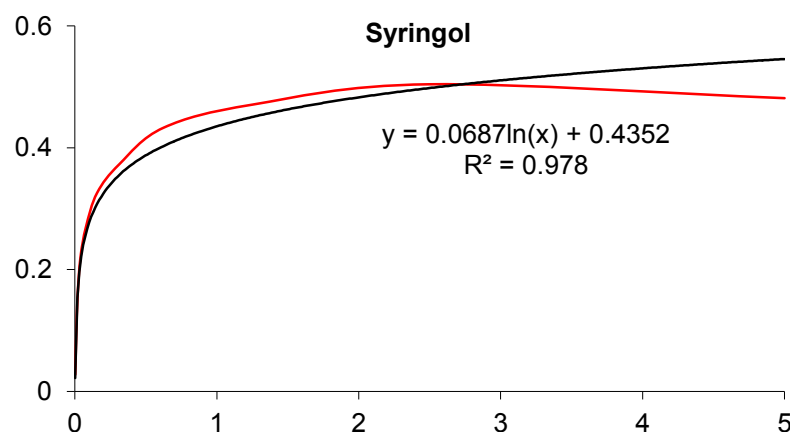


Abbildung 12: Michaelis-Menten-Diagramm vom Syringol-Laccase-System. Abszisse: Substratkonzentration (mM), Ordinate: spezifische katalytische Aktivität (U / mg Enzym)

Tabelle 2: enzymkinetische Kennwerte für Guaiacol und Syringol

Kinetik	Guaiacol	Syringol
$\frac{1}{2} V_{MAX}$ (U / mg)	0,033	0,24
K_M (mM)	0,248	0,061

Wie man sieht, ist der K_M -Wert für Syringol ungefähr viermal kleiner als der für Guaiacol, was bedeutet, dass die Laccase von *T. versicolor* eine höhere Affinität zu Syringol besitzt als zu Guaiacol. Bei Guaiacol wurde nach 18 h eine veränderte Extinktion im längerwelligen Spektralbereich gemessen, wohingegen bei Syringol keine größeren Unterschiede beobachtbar waren. Die Laccase scheint

das Syringol schon innerhalb kürzester Zeit umgesetzt zu haben, für die vollständige Reaktion mit Guaiacol war mehr Zeit erforderlich.

Detektion von Oxidationsprodukten

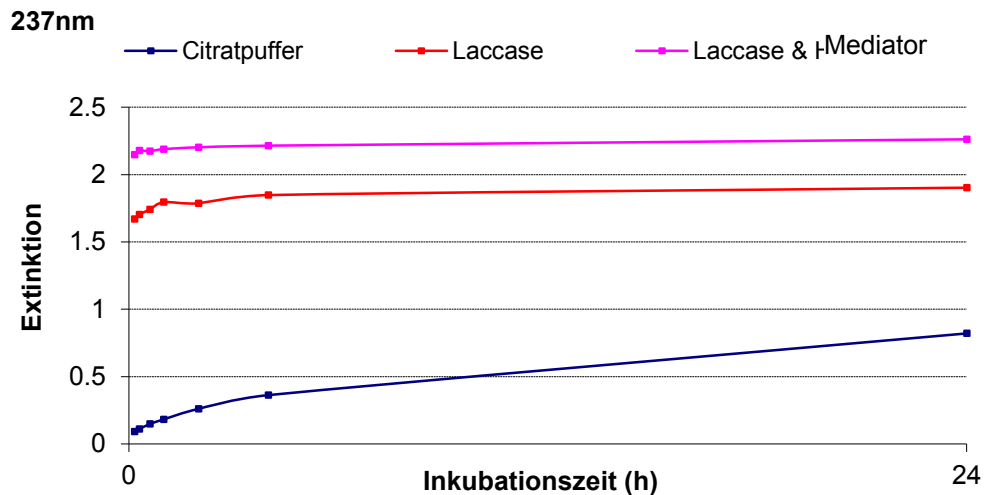


Abbildung 13: Extinktionswerte der Messungen nach 10, 20, 40 min und 1, 2, 4, 24 h bei 237 nm (unverdünnt).

Der kontinuierliche Anstieg der gemessenen Extinktionswerte bei 237 nm (Abb. 13), lässt darauf schließen, dass die Holzproben sowohl mit Laccase (rote Kurve) als auch mit einem Laccase-Mediator-System (rosa Kurve) reagierten, dadurch phenolische Produkte entstanden und diese in die Lösungen übergingen. Auch bei dem Citratpuffer (blaue Kurve) nahm die Extinktion mit der Zeit zu. Hier könnten unveränderte phenolische Bestandteile der Holzproben in Lösung gegangen sein und so eine verstärkte Absorption verursacht haben. Absolut gesehen sind die hier gemessenen Extinktionen jedoch viel geringer als bei den Laccase-haltigen Lösungen. Dies spricht wieder für eine Reaktion zwischen Holz und Laccase. Der Mediator scheint die Reaktion noch verstärkt zu haben, hier wurden die höchsten Extinktionswerte gemessen.

Bei den Laccase-haltigen Lösungen nahm die Extinktion zuerst stark zu und flachte dann allmählich ab. Die Geschwindigkeit der chemischen Reaktion scheint somit abhängig von der Inkubationszeit gewesen zu sein.

Auch die Messungen bei 280 nm (Abb. 14 und 15) sprechen für eine Reaktion zwischen den Holzproben und den Laccase-haltigen Lösungen. Wieder stieg die Extinktion anfangs stark an. Nach längerer Inkubationszeit erhöhte sich die Absorption weniger (Abb. 14 und 15). Die Detektion dieser Hydroxylgruppen ist deshalb von Interesse, da sie zur Bildung phenolischer Radikale nötig sind,

welche zur Funktionalisierung des Holzes dienen. Ein Nachweis solcher Radikale kann jedoch nur mit zusätzlichen Methoden, etwa FTIR oder ESR, erbracht werden.

Es scheint also, als dass mit der angewandten Methodik eine Interaktion zwischen Laccase (mit und ohne Mediator) und Holzproben zumindest tendenziell nachgewiesen werden konnte. Die angewandte Methode dient deshalb nur als indirektes Nachweisverfahren, durch welche zumindest tendenziell auf die Bildung von Reaktionsprodukten geschlossen werden kann.

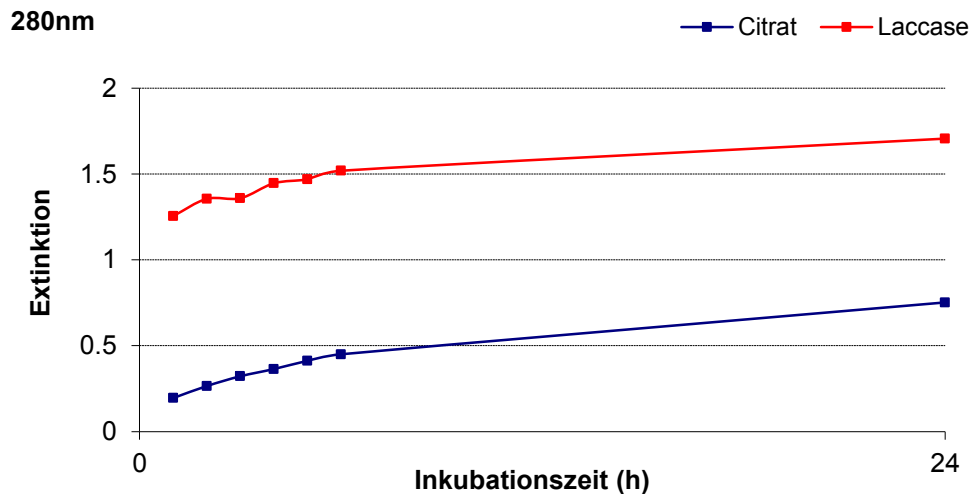


Abbildung 14: Extinktionswerte der Messungen nach 1, 2, 3, 4, 5, 6 h bei 280 nm (unverdünnt)

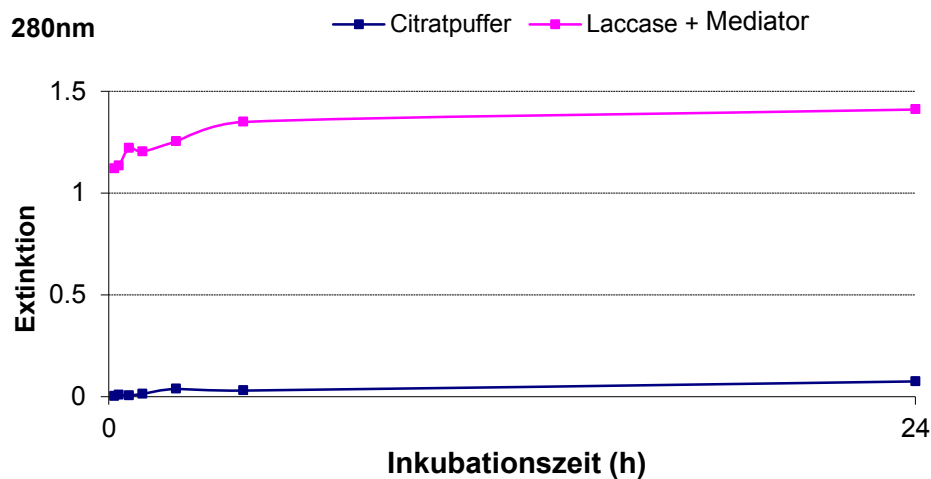


Abbildung 15: Extinktionswerte der Messungen nach 10, 20, 40 min und 1, 2, 4, 24 h bei 280 nm (1:10 verdünnt)

Untersuchung der Holzoberfläche mittels FTIR

Die FTIR-Untersuchungen zeigten, dass bei einer Behandlung der Holzproben mit Laccase und Laccase in Verbindung mit Mediator Unterschiede zur Behandlung mit reinem Citratpuffer bestanden.

In Abbildung 15 werden exemplarisch die Extinktionskurven der Citratpuffer-, Laccase- und Laccase-PAS-Behandlungen verglichen (Wellenzahl für Normalisierung: 898cm^{-1}).

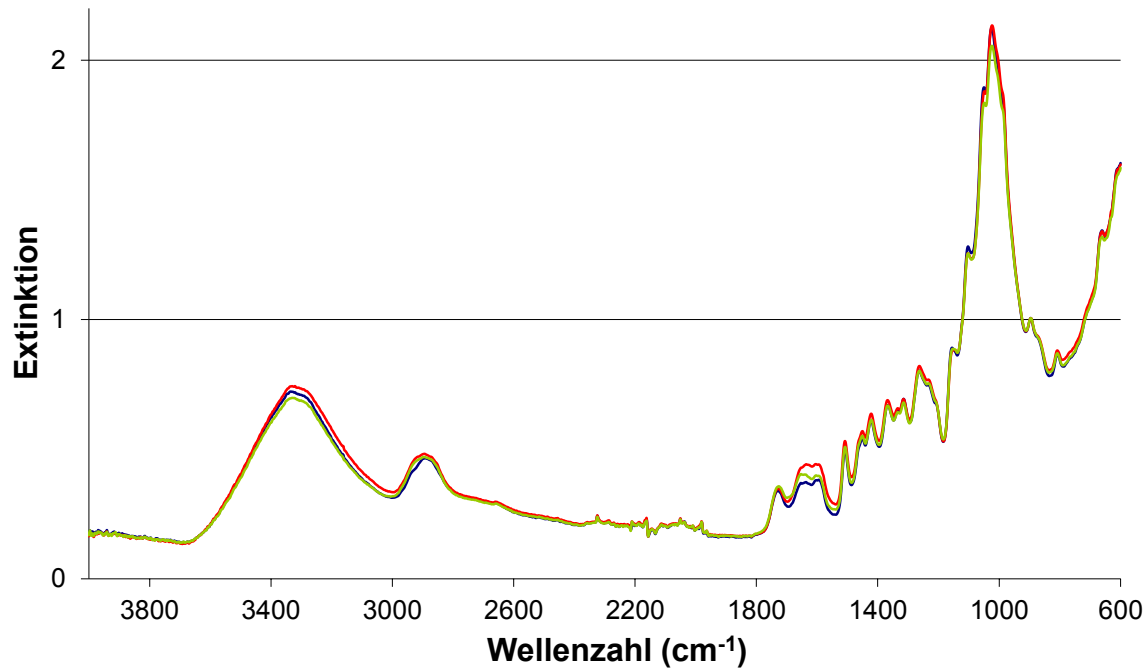


Abbildung 15: mittlere normalisierte FTIR-Spektren der Citratpuffer- (blau), Laccase- (grün) und Laccase-PAS (4-amino-2-hydroxybenzoesäure - (rot) Behandlungen. Referenzwellenzahl für die Normalisierung: 898 cm^{-1}

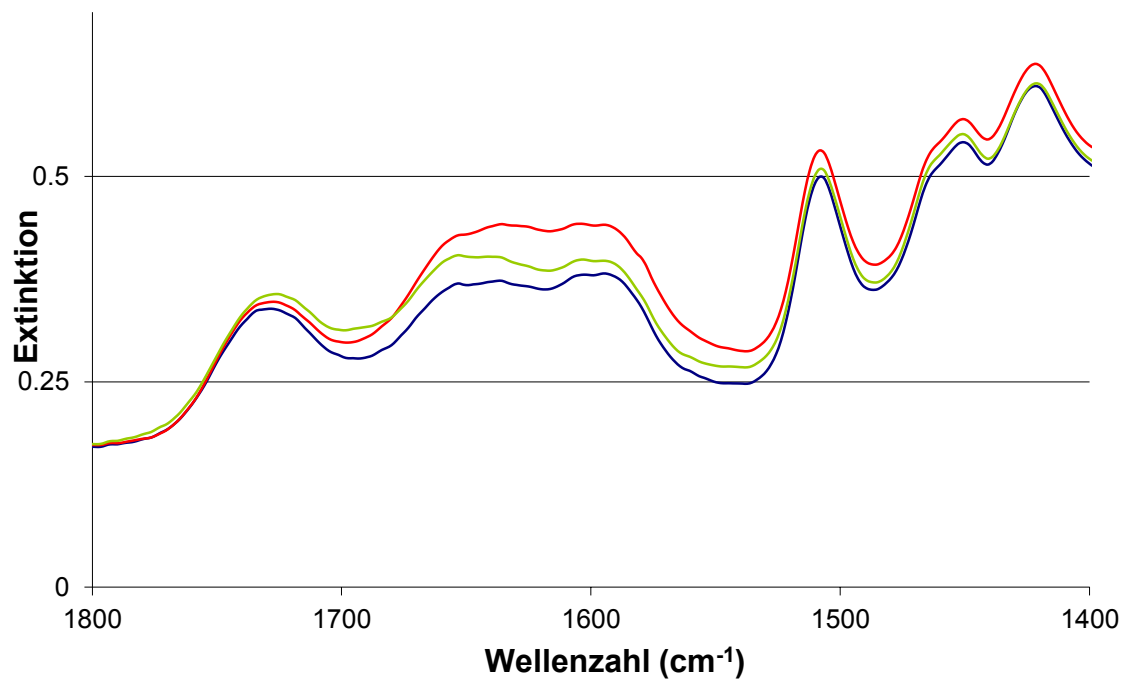


Abbildung 16: mittlere normalisierte FTIR-Spektren (Bereich 1800 bis 1400) der Citratpuffer- (blau), Laccase- (grün) und Laccase-PAS (4-amino-2-hydroxybenzoesäure) - (rot) Behandlungen. Referenzwellenzahl für die Normalisierung: 898 cm^{-1}

Man erkennt, dass sich die Extinktion der Citratpuffer-Behandlung bei bestimmten Wellenzahlen merklich von den Laccase- und Laccase-PAS unterscheiden, v.a. zwischen 1700 cm^{-1} und 1500 cm^{-1} (Abb. 16). Auch bei den anderen Normalisierungswellenzahlen (nicht abgebildet) waren hier die stärksten Unterschiede zu sehen.

In Abbildung 20 ist das Verhältnis der Messwerte bei 1511 cm^{-1} (charakteristisch für Ligninskelett) und 898 cm^{-1} (Zellulose) für alle Behandlungen dargestellt. Auch hier lässt sich ein klarer Unterschied zwischen den Laccase- bzw. Laccase + Mediator-Behandlungen und der Citratpuffer-Behandlung feststellen. Bei den anderen Referenzwellenzahlen konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden (nicht abgebildet).

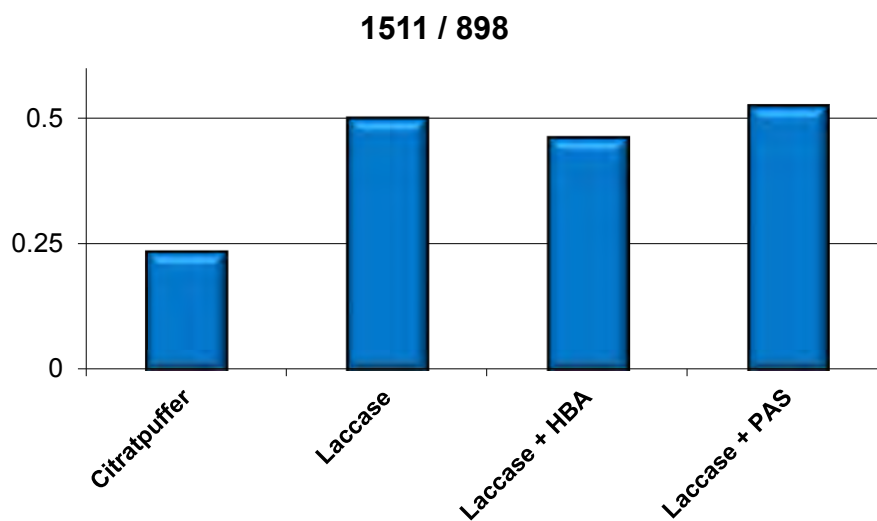


Abbildung 17: Verhältnis der Messwerte bei Wellenzahl 1511 cm^{-1} und 898 cm^{-1} der vier Behandlungen.

Diese Ergebnisse lassen auf eine durch die Behandlungen herbeigeführte chemische Reaktion der Holzbestandteile schließen. Wie in Abbildung 16 gut zu erkennen ist, wurden die Extinktionsspektren durch Laccase und Laccase-PAS u.a. im Bereich der Wellenzahlen 1718-1715, 1666-1659, 1602-1594, 1510-1507 und 1421 verändert. Bei diesen Wellenzahlen absorbieren v.a. Lignin und C=O Gruppen (Xu et al. 2006). Die Veränderung der Extinktionswerte scheint somit durch Lignin, welches durch die Behandlungen modifiziert wurde, bedingt zu sein.

Welche Veränderungen genau stattgefunden haben, kann jedoch nur vermutet werden. Nahe liegend wäre eine durch Laccase und / oder Mediator katalysierte Oxidation funktioneller Gruppen an Ligninmolekülen. So könnten etwa phenolische Hydroxylgruppen (–OH) zu Carbonylgruppen (–C=O) oxidiert worden sein (Xu et al. 2006; Kim et al. 2009). Andere Reaktionen mit Lignin, wie etwa die Bildung von Carboxylgruppen (Ibarra et al. 2007), Veresterungen (Grönqvist et al. 2006), Demethylierungen, die Spaltung aromatischer Ringe oder Polymerisierungen (Kim et al. 2009) könnten

ebenfalls stattgefunden haben. Eine Veränderung der Zellulose erscheint als eher unwahrscheinlich (Poppius-Levlin et al. 2001).

5.4 Schlussfolgerungen

Die in diesen Studien eingesetzte Laccase (Sigma Aldrich) stammt aus dem Weissfäulepilz *Trametes versicolor* und liess eine stärkere Affinität zu Syringol als zu Guaiacol erkennen. Die erhöhte Affinität zu Syringol ist nicht verwunderlich, da *T. versicolor* in der Natur hauptsächlich als Saprophyt an Laubholzstubben vorkommt. Laubholzlignin besteht zu ungefähr 50% aus Syringolmonomeren, während in Nadelholz kaum Syringol vorzufinden ist (Abb. 18). Die erhöhte Affinität zu Syringol erscheint somit evolutionär bedingt zu sein. Um Nadelholz zu behandeln wäre die Laccase eines vorwiegend an Nadelbäumen vorkommenden Pilzes also wahrscheinlich besser geeignet. Problematisch ist jedoch, dass an Nadelbäumen vorwiegend Braunfäuleerreger vorkommen, für welche bisher nur geringe bis gar keine Produktion von Laccase nachgewiesen wurde (Baldrian 2006).

In zukünftigen Studien sollte die Laccase aus *H. annosum*, einem Pilz der in unseren Studien eine hohe Laccaseproduktion aufwies und an Nadelholz vorkommt, isoliert und charakterisiert werden. Es ist zu erwarten, dass die Laccase von *H. annosum* eine stärkere Affinität zu Guaiacol (Guaiacyl-Hauptbestandteil von Nadelholz) aufweist als die kommerzielle Laccase und somit besser geeignet wäre zur Oberflächenaktivierung von Nadelholz.

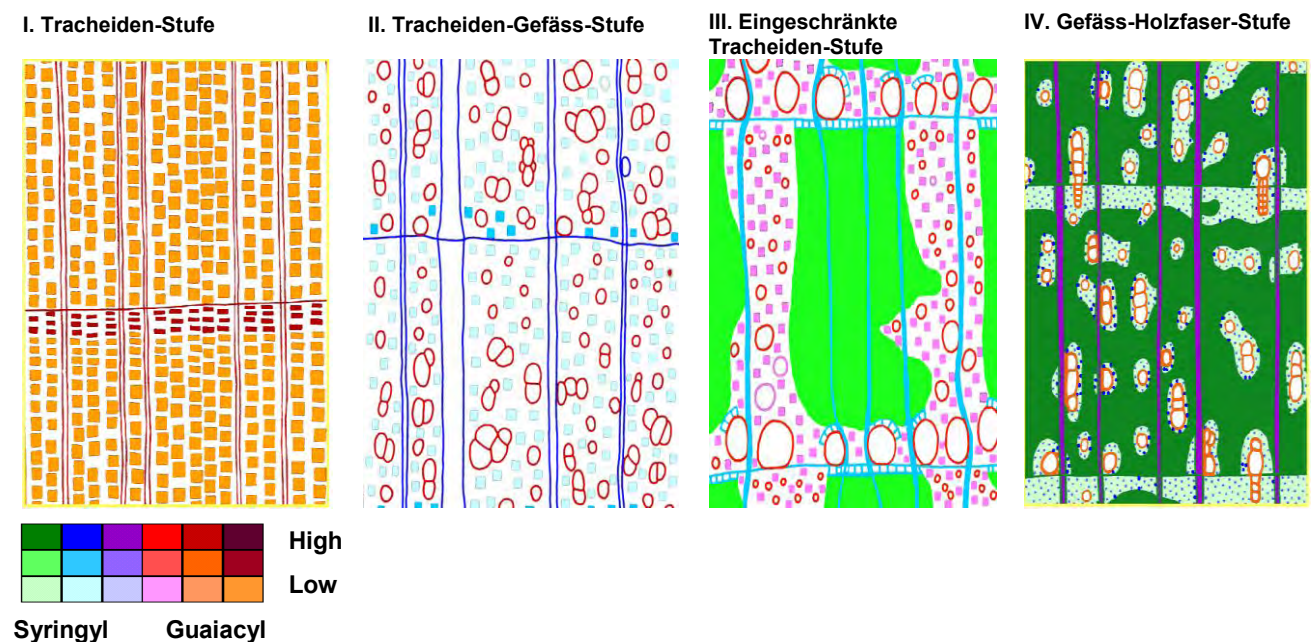


Abbildung 18: Organisationsstufen des Hydrosystems der Holzpflanzen (Braun, 1970, Schwarze 2008).

Um die Wirkung der Laccase auf die Holzstruktur zu detektieren wurden neben der photometrischen Messung von Reaktionsprodukten (phenolische Verbindungen und phenolische Hydroxylgruppen) und eine FTIR-Analyse durchgeführt. Es zeigte sich, dass die bei 237 und 280nm gemessenen Produkte auf eine Reaktion zwischen Laccase und Holzoberfläche schliessen lassen und dass die Verwendung eines Mediators diesen Effekt verstärkt. Zudem konnte mit dieser Methode gezeigt werden, dass die Reaktion (Laccase-Holz) bereits in den ersten Minuten und Stunden erfolgt und dass die gewählte Inkubationszeit von 18h und mehr zu lang war, da der Effekt der Laccase durch längere Inkubationszeiten nicht bzw. nur marginal gesteigert werden konnte.

Die photometrische Messung von Reaktionsprodukten im Überstand ist ein indirektes Nachweisverfahren der Funktionalisierung des Holzes durch Laccase und sollte daher in Kombination mit weiteren Analyseverfahren verwendet werden. Aus diesem Grund wurden die Holzoberflächen mittels FTIR-Spektroskopie tiefergehend analysiert. Die FTIR-Spektren liessen eine Veränderung des Ligninskelets durch Laccase erkennen, welche durch die Verwendung eines Mediators deutlich verstärkt wurde.

Ein Nachteil beim Einsatz von Laccasen ist deren geringes Redoxpotential, welches dazu führt das nicht phenolische Verbindungen nicht bzw. nur im geringen Masse umgesetzt werden. Aufgrund dieses geringen Redox-Potentials benötigen Laccasen daher in der Regel auch eine freie Phenol-Gruppe am aromatischen Ring zur Oxidation, was ihren Einsatz in der Ligninbiotechnologie naturgemäß hemmt, da im natürlichen Lignin aufgrund der bei der Synthese des Makromoleküls ablaufenden Radikalreaktionen die meisten Phenolgruppen substituiert vorliegen (Leonowicz et al. 2001). Bourbonnais und Paice (1990) konnten jedoch als Erste zeigen, dass nach der Zugabe von niedermolekularen Redox-Verbindungen (sog. Mediatoren = Mittler) Laccase in der Lage ist, auch nicht-phenolische Verbindungen anzugreifen. Alle in diesen Studien verwendeten Mediatoren, insbesondere HBA (4-hydroxybenzoesäure) und PAS (4-amino-2-hydroxybenzoesäure) erhöhten das Redoxpotential gegenüber der nicht-phenolischen Verbindung 3,4-Dimethoxybenzylalkohol.

6 Wirkung verschiedener Laccasebehandlungen auf Bläuepilze

6.1 Hintergrund

In dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, ob und inwiefern sich das Enzym Laccase, in Verbindung mit verschiedenen pilzwidrigen Substanzen, zu einer Erhöhung der Dauerhaftigkeit von Fichtensplintholz gegenüber Bläue- und holzzersetzenden Pilzen einsetzen lässt. Außerdem sollte geprüft werden, ob eine Behandlung mit Laccase einer Auswaschung der Schutzmittel entgegenwirkt. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob die Zugabe eines Mediators die gewünschten Effekte ver-

stärkt oder gar erst ermöglicht. Hierzu wurden zuerst die Reaktionen zwischen Fichtensplintholz und Laccase sowie pilzwidrigen Substanzen und Laccase untersucht. Der Einfluss eines Mediators wurde ebenfalls ermittelt. Anschließend wurde untersucht, ob sich Laccase und der Mediator zur verbesserten Ausstattung von Fichtensplintholz mit pilzwidrigen Substanzen einsetzen lässt und das behandelte Holz so einen erhöhten Schutz gegenüber holzverfärbenden und holzzersetzenden Pilzen aufzeigt.

6.2 Material und Methoden

Erhöhung der Dauerhaftigkeit gegenüber Bläuepilzen

Mit diesem Versuch sollte geklärt werden, ob und in wie weit sich Laccase zum Schutz von Fichtensplintholz gegenüber Bläuepilzen einsetzen lässt. Der Versuch erfolgte in Anlehnung an EN152 (European Standard EN 152-2, 1988). Abweichend zur EN152 wurde anstatt von Kiefernplintholz Fichtensplintholz für den Versuch verwendet, da alle anderen Versuche in dieser Arbeit ebenfalls mit Fichtensplintholz durchgeführt wurden und diese Baumart wirtschaftlich gesehen von höherer Bedeutung ist.

In 18 verschiedenen Varianten wurden je 12 Holzproben behandelt. Die einzelnen Varianten sind in Tabelle dargestellt.

Tabelle 3: Behandlungsvarianten

Nr.	Variante	Nr.	Variante
1	Holz (Kontrolle)	10	Holz + Substanz X 1 mM
2	Holz + Laccase	11	Holz + Substanz X 1 mM + Laccase
3	Holz + Laccase + Med.	12	Holz + Substanz X 1 mM + Laccase + Med
4	Holz + Isoeugenol 4 mM	13	Holz + Substanz X 50 mM
5	Holz + Isoeugenol 4 mM + Laccase	14	Holz + Substanz X 50 mM + Laccase
6	Holz + Isoeugenol 4 mM + Laccase + Med	15	Holz + Substanz X mM + Laccase + Med
7	Holz + Thymol 4 mM	16	Holz + VP7 / 260a 5% (v / v)
8	Holz + Thymol 4 mM + Laccase	17	Holz + VP7 / 260a 5% (v / v) + Laccase
9	Holz + Thymol 4 mM + Laccase + Med	18	Holz + VP7 / 260a 5% (v / v) + Laccase + Med

Die Volumenaktivität der Laccase betrug jeweils 15 U / ml, der Mediator besass eine Konzentration von 5 mM.

Die Holzproben wurden nach Varianten getrennt in je ein 2L-Becherglas zwischen 2 Metallgitter gelegt, mit einem Bleiklotz beschwert und sterilisiert. Unter sterilen Bedingungen wurden dann 200 ml der entsprechenden Lösungen zu den Holzproben in die Bechergläser gegeben.

Alle Varianten wurden bei Raumtemperatur während 18 Stunden im Labor inkubiert. In Anlehnung an EN 84 (European Standard EN 84, 1997) wurden dann von jeder Variante 6 Proben ausgewählt, indem sie unter sterilen Bedingungen während 2 Wochen bei siebenmaligem Wasserwechsel, nach Varianten getrennt in mit 200 ml destilliertem Wasser gefüllten Bechergläsern aufbewahrt wurden. Bechergläser und destilliertes Wasser waren jeweils autoklaviert. Die pro Variante verbleibenden 6 Holzproben wurden während diesen 2 Wochen ebenfalls nach Varianten getrennt in Plastikpetrischalen unter der Sterilbank aufbewahrt.

Nach der Auswaschung wurden die Holzproben in eine Sporensuspension (enthielt Sporen der Pilze *Discula pinicola* [DSM-4948], *Ceratocystis picea* [DSM-4842], *Cladosporium herbarum* [DSM-63422] und *Aureobasidium pullulans* [EMPA-316], dreiwöchige Vorkultivierung auf 2% MEA (Oxoid), Lösungsmittel war steriles, destilliertes Wasser) getaucht und in mit 18 g Vermiculit und 40 ml destilliertem Wasser befüllte Kolleschalen nach Varianten und Behandlung (ausgewaschen / nicht ausgewaschen) getrennt eingebaut, so dass man 36 Kolleschalen à 6 Holzproben erhielt. Abbildung zeigt eine Kolleschale mit eingebauten Holzproben. In jede der Kolleschalen wurden zusätzlich noch 40 ml der Sporensuspension gegeben. Kolleschalen samt Inhalt wurden vor Einbau der Holzproben sterilisiert. Dem Einbau folgte ein sechswöchige Inkubation im Klimaraum bei $22 \pm 1^\circ\text{C}$ und $70 \pm 5\%$ relativer Luftfeuchtigkeit.



Abbildung 19: Kolleflasche mit eingebauten Holzproben.

Nach der Inkubationszeit wurden die Holzproben ausgebaut, mit einem Pinsel von anhaftendem Myzel gereinigt und während 2 Tagen im Klimaraum (23°C , $50 \pm 5\%$ relative Luftfeuchtigkeit) getrocknet. Nach Tabelle erfolgte anschließend visuell die Bestimmung des Verblauungsgrades jeder Holzprobe. Die Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf den Anteil der verfärbten Holzprobenober-

fläche. Aus den pro Variante erhaltenen 6 Verblauungsgraden wurde das arithmetische Mittel errechnet, welches den Verblauungsgrad der jeweiligen Variante repräsentiert.

Tabelle 4: Einstufung des Verblauungsgrades der Holzoberflächen

Verblauungsgrad	Beschreibung
0	keine Verfärbung (0%)
1	minimale Verfärbung (1-10%)
2	schwache Verfärbung (11-20%)
3	mittlere Verfärbung (21-50%)
4	starke Verfärbung (51-80%)
5	komplette Verfärbung (81-100%)

6.3 Ergebnisse

Wie man in Tabelle 5 erkennt, waren alle Varianten ohne Laccasebehandlung (**4, 7, 10, 13** und **16**) weniger verblaut als die Kontrolle (**1**). Dies lässt auf eine pilzwidrige Wirkung der verwendeten Substanzen schließen. Durch eine Behandlung mit Laccase nahm der Verblauungsgrad der Isoeugenol- und Thymol-Behandlung zu (**5** und **8**). Dies war auch der Fall, wenn keine pilzwidrige Substanz appliziert wurde (**2**). Laccase scheint mit Thymol und Isoeugenol so zu reagieren, dass deren pilzhemmende Wirkung verloren geht. Dies steht im Einklang mit den Resultaten von Voda et al. (2003a). Die Verfärbungen der mit Laccase behandelten Proben ohne Wirkstoff waren stärker als bei der Kontrolle (**1**). Der Mediator schien bei Isoeugenol, Thymol und ohne pilzwidrige Substanz ebenfalls eine Verblauung zu fördern (**3, 6** und **9**).

Substanz X (1 mM) war die einzige Substanz, bei welcher eine Behandlung mit Laccase den Verblauungsgrad merklich reduzierte (**11**). Eine Zugabe des Mediators förderte wiederum die Verfärbung (**12**). Durch Erhöhung der Konzentration der Substanz X auf 50 mM konnte eine Verblauung fast gänzlich verhindert werden, unabhängig davon, ob Laccase und Mediator angewandt wurde (**13, 14** und **15**). Auffällig ist, dass bei **11** ein ähnlicher Verblauungsgrad erreicht wurde wie bei **13, 14** und **15**. Es scheint also, als ließe sich die für eine effektive Schutzwirkung gegenüber den verwendeten Bläuepilzen nötige Substanz X -Konzentration mit Hilfe von Laccase stark reduzieren.

Die VP7/260a-Varianten besaßen die geringsten Verblauungsgrade (**16, 17** und **18**). Laccase hat hier die Verblauung leicht gefördert, in Verbindung mit Mediator konnte sie jedoch gänzlich unterbunden werden.

Der Einfluss des Mediators scheint nicht immer gleich gewesen zu sein. Bei Isoeugenol (**6**), Thymol (**9**), Substanz X 1 mM (**12**) und ohne pilzwidrige Substanz (**3**) nahm die Verblauung jeweils leicht zu, wohingegen sie bei Substanz X 50 mM (**15**) und VP7/260a (**18**) leicht abnahm. Die Zunahme könn-

te dadurch erklärt werden, dass der Mediator mit Lignin auf eine Art und Weise reagierte, welche den Bläuepilzen eine Besiedlung der Holzoberfläche erleichterte. Dies kann jedoch nicht belegt werden und würde im Widerspruch zur Abnahme des Verblauungsgrades bei **15** und **18** stehen. Welchen Einfluss der Mediator ausübte kann also nicht eindeutig beantwortet werden.

Tabelle 5: Holz-Behandlungsvarianten

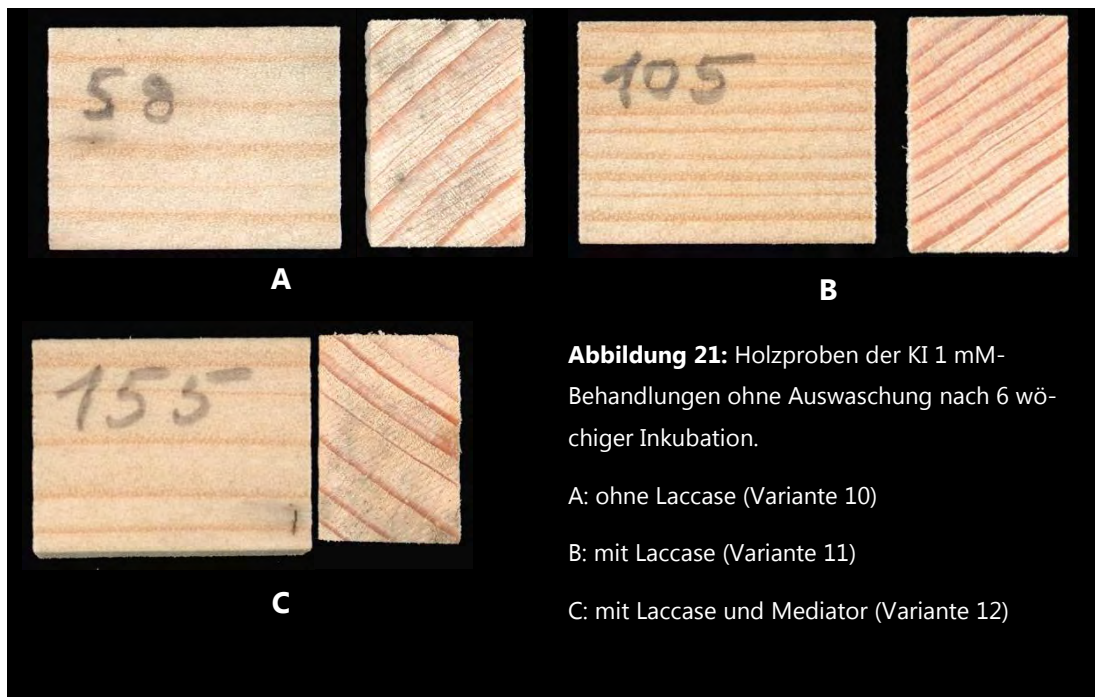
(Nr.) Variante	Ohne Auswaschung	Mit Auswaschung
(1) Kontrolle	3.2 ±0.41	3.6 ±0.49
(2) Laccase	3.3 ±0.52	3.5 ±0.45
(3) Laccase + Mediator	4.2 ±0.41	4.8 ±0.27
(4) Isoeugenol	2.3 ±0.52	3.4 ±0.49
(5) Isoeugenol + Laccase	4.6 ±0.52	4.3 ±0.26
(6) Isoeugenol + Laccase + Med	4.7 ±0.52	4.8 ±0.42
(7) Thymol	2.5 ±0.55	3.5 ±0.32
(8) Thymol + Laccase	3.8 ±0.75	4.3 ±0.41
(9) Thymol + Laccase + Med	4.3 ±0.52	4.6 ±0.38
(10) Substanz X 1 mM	2.2 ±0.41	3.7 ±0.41
(11) Substanz X 1 mM + Laccase	0.7 ±0.52	0.9 ±0.20
(12) S X mM + Laccase + Med	1.1 ±0.49	1.5 ±0.45
(13) Substanz X 50 mM	0.8 ±0.41	3.3 ±0.27
(14) Substanz X 50 mM + Laccase	0.8 ±0.41	0.9 ±0.38
(15) S X 50 mM + Laccase + Med	0.5 ±0.55	0.7 ±0.26
(16) VP7 / 260a	0.2 ±0.41	0.5 ±0.20
(17) VP 7/ 260a + Laccase	0.5 ±0.55	0.3 ±0.27
(18) VP7 / 260a + Laccase + Med	0 ±0.00	0.7 ±0.26

VP 7/ 260a = Propiconazol ((±)-1-((2-(2,4-dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-yl-methy)-1H-1,2,4-triazole und IPBCI (3-Iod-2-propynyl butylcarbamate).

In den Abbildungen 19 bis 22 sind zur Illustration Holzproben verschiedener Behandlungsvarianten dargestellt.

Die Auswaschung der Proben hatte zur Folge, dass der Bläuepilzbefall bei allen Varianten zunimmt mit der Ausnahme bei Substanz X mit Laccase (1mM und 50mM). Während die Substanz X nach der Auswaschung nicht bzw. nur eine eingeschränkte Wirkung gegen eine Verblauung aufwies, konnte eine vorherige Laccase-Behandlung den Auswaschungseffekt signifikant reduzieren.





6.4 Schlussfolgerungen

Eine Behandlung mit Laccase in Verbindung mit pilzwidrigen Substanzen kann die Schutzwirkung dieser Substanzen gegenüber holzverfärbenden Pilze erhöhen. Wie die Ergebnisse zeigen, hängt dies jedoch vom aktiven Wirkstoff ab. VP7/260a scheint sehr effektiv zu sein, selbst eine Auswaschung bewirkte keinen erhöhten Pilzbewuchs. Allerdings ist das Produkt auf Grund seiner Inhaltsstoffe (Propiconazole und IPBC) als hochgradig umweltgefährlich eingestuft. Der Einsatz von Laccase und Mediator erscheint, zumindest mit der angewandten Konzentration von VP7/260a, keinen Einfluss auf die Wirkung des Produktes zu haben.

Wie die Substanz X-Varianten deutlich zeigten, können positive Effekte durch eine Laccasebehandlung erreicht werden, die vergleichbar mit der Wirkung des chemischen Produktes VP7/260a waren. Eine Verminderung der Auswaschung der pilzwidrigen Substanzen scheint ebenfalls durch eine Laccase-Behandlung möglich zu sein. Der Vorteil einer Verwendung der Substanz X liegt hier eindeutig auf der deutlichen höheren Umweltverträglichkeit gegenüber VP7/260a.

Neben Isoeugenol und Thymol existieren noch eine Unmenge weiterer ätherischer Öle mit pilzwidrigen Eigenschaften. Somit bestehen noch viele Kombinationsmöglichkeiten, von denen einige eventuell pilzwidrige Wirkung nach einer Laccasebehandlung haben. Es wäre also unangebracht zu behaupten, ätherische Öle ließen sich im Allgemeinen nicht in Verbindung mit Laccase zu einem erhöhten Schutz gegenüber Bläuepilzen einsetzen. Zudem sollte der Einfluss der Inkubationszeit näher untersucht werden. Denkbar wäre nämlich, dass diese für Thymol und Isoeugenol zu lang war und beide Stoffe so durch Laccase / Mediator inaktiviert wurden.

7 Wirkung verschiedener Laccasebehandlungen auf holzzersetzende Pilze

7.1 Hintergrund

Um ein weites Organismenspektrum zu untersuchen wurden neben Bakterien und Hefepilze auch filamentöse Pilze aus der Klasse der Acomyceten (Bläuepilze) und holzzersetzende Pilze aus der Klasse der Basidiomyceten in die Studien mit aufgenommen. Im Folgenden werden die Methodik und die Ergebnisse der Laccasebehandlungen zur Erhöhung der Dauerhaftigkeit gegen holzzersetzende Pilze vorgestellt.

7.2 Material und Methoden

Es wurde untersucht, ob sich eine Behandlung der Holzproben mit Laccase positiv auf die Dauerhaftigkeit gegenüber holzzerstörenden Pilzen auswirkt. Der Versuch erfolgte in Anlehnung an EN113 (European Standard EN 113, 1997).

Hierzu wurden Fichtensplinthholzproben in den gleichen Varianten behandelt (Tabelle 5). Diesmal waren es jedoch 24 Holzproben und 400 ml Lösung pro Variante. Ausgewaschen wurden jeweils 12 Holzproben. Zur Auswaschung wurden 400 ml anstatt von 200 ml sterilem, destilliertem Wasser benutzt. Volumenaktivität der Laccase, Konzentrationen von Mediator und der verschiedenen Substanzen blieben gleich. Die nicht ausgewaschenen Holzproben wurden nach Varianten getrennt in Plastikpetrischalen unter der Sterilbank aufbewahrt.

Nach der Auswaschung erfolgte unter sterilen Bedingungen der Einbau aller Holzproben: pro Variante wurden je 6 ausgewaschene zusammen mit 6 nicht ausgewaschenen in mit *Poria placenta* (EMPA Nr. 45) bzw. *Trametes versicolor* (EMPA Nr. 159) vorbeimpfte Plastikpetrischalen (134 mm x 20 mm) eingebaut (Abb. 24) und im Klimaraum bei $22 \pm 1^\circ\text{C}$ und $70 \pm 5\%$ relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Pilze waren auf 2% MEA in den Plastikpetrischalen vorkultiviert worden.

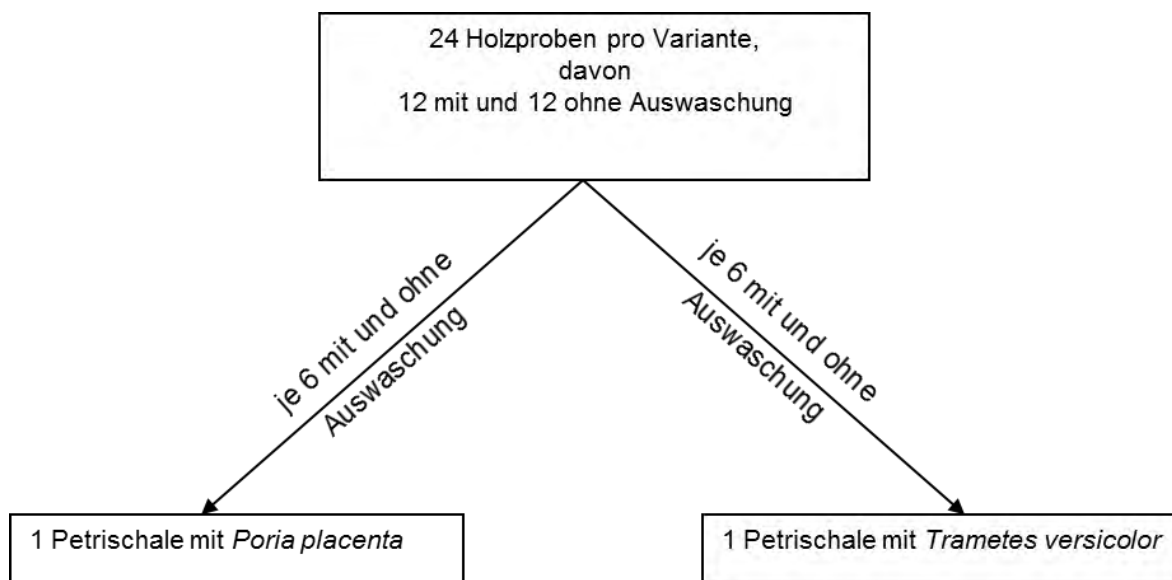


Abbildung 23: Schema der Versuchsdurchführung

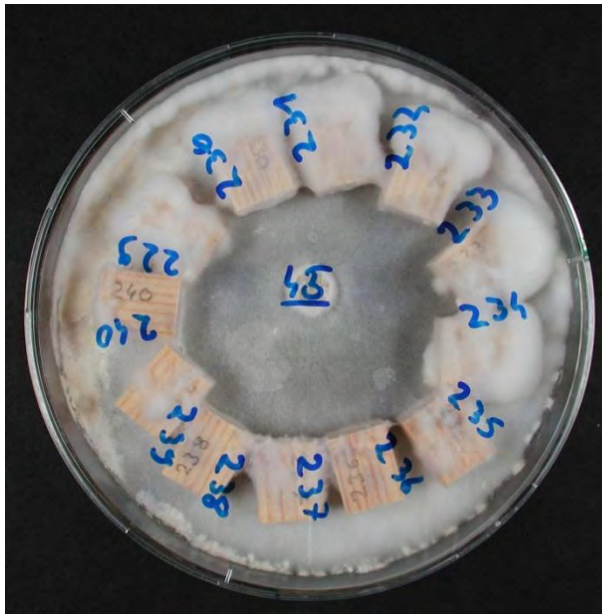


Abbildung 24: Holzproben der Variante 4 (Isoeugenol) auf *Poria placenta* nach mehrwöchiger Inkubation

Nach einer Inkubationszeit von 6 und 12 Wochen wurden von jeder Variante und Pilz die ausgewaschenen und unausgewaschenen Holzproben unter sterilen Bedingungen ausgebaut. Der oberflächliche Pilzbewuchs der ausgebauten Holzproben wurde visuell nach Tabelle 6 bewertet. Durch Berechnung des arithmetischen Mittels aus den Bewuchskategorien wurde dann der durchschnittliche Pilzbewuchs für jede Behandlungsvariante bestimmt.

Tabelle 6: Einstufung des oberflächlichen Pilzbewuchses

Bewuchskategorie	Beschreibung
0	kein Bewuchs (0%)
1	minimaler Bewuchs (1-10%)
2	schwacher Bewuchs (11-20%)
3	mittlerer Bewuchs (21-50%)
4	starker Bewuchs (51-80%)
5	kompletter Bewuchs (81-100%)

Anschließend wurden die Proben mit einem Pinsel von anhaftendem Myzel befreit, während 48 Stunden bei 104°C gedarrt und der Masseverlust mit folgender Formel nach EN113 prozentual bestimmt:

$$\text{Masseverlust} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100$$

wobei m_0 = Darrgewicht der unbehandelten Holzprobe

m_1 = Darrgewicht der behandelten Holzprobe nach 6 Wochen Inkubation

Aus den Masseverlusten der 3 Holzproben gleicher Behandlung wurde dann der durchschnittliche Masseverlust der jeweiligen Behandlungsvariante berechnet (arithmetisches Mittel). Die höchstwahrscheinlich durch die Tränkung bedingten Massezunahmen mancher Holzproben wurden als 0% Masseverlust dargestellt.

7.3 Ergebnisse

Bei *P. placenta* konnten für die Varianten mit Isoeugenol und Thymol (**4-9**) kein verringerter Pilzbewuchs im Vergleich zur Kontrolle (**1**) beobachtet werden. Mit *T. versicolor* waren für die gleichen Varianten ebenfalls nur sehr geringe Differenzen feststellbar.

Für die Substanz X-Varianten hingegen konnte mit Laccase und Mediator eine Verringerung des Pilzbewuchses selbst nach einer Auswaschung bei beiden Pilzen erreicht werden (**10** mit **11** und **12** sowie **13** mit **14** und **15**).

Bei den mit VP7 / 260a behandelten Holzproben (**16-18**) waren quasi keine Unterschiede im Pilzbewuchs erkennbar.

Es wurden bei *T. versicolor* insgesamt schwächere Pilzbewüchse festgestellt als bei *P. placenta*. *T. versicolor* verursacht eine Weissfäule und kommt weniger häufig an Nadelhölzern vor, während *P. placenta* als Braunfäuleerreger vorwiegend Nadelbäume befällt. Da es sich bei den Holzproben um Fichtensplintholz handelte, könnte dies den schwächeren Bewuchs durch *T. versicolor* erklären.

Der Einsatz von Laccase scheint somit nur bei Substanz X einen nennenswerten Effekt auf die Pilzbesiedelung gehabt zu haben. Aussagekräftigere Ergebnisse sollte ein Vergleich der Masseverluste liefern, welche in den Abbildungen 25-28 dargestellt sind.

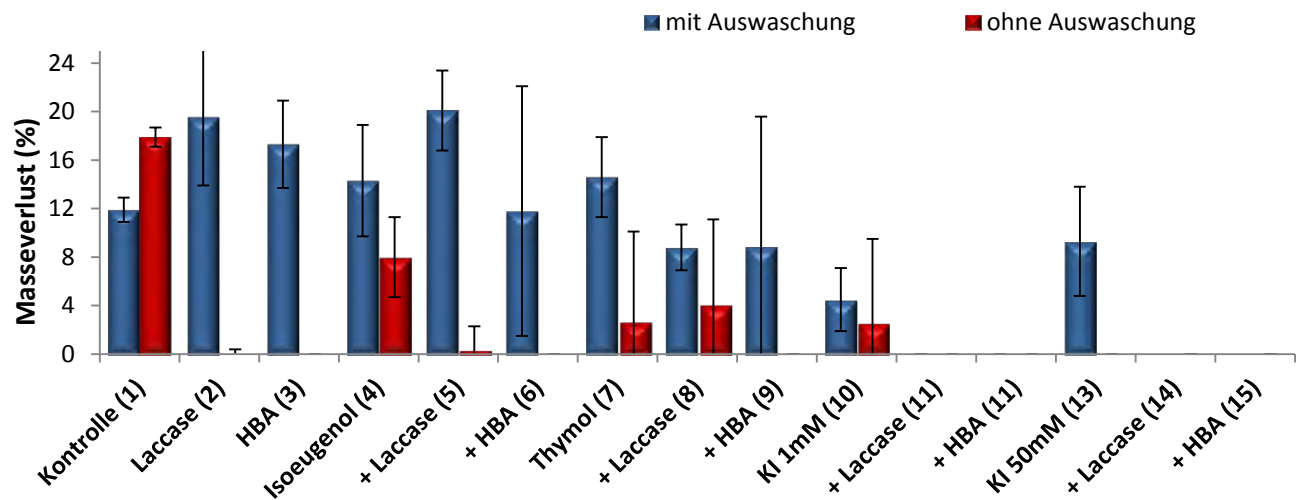


Abbildung 25: Mittlerer Masseverlust der Holzproben nach 6-wöchiger Inkubation mit *Poria placenta*.

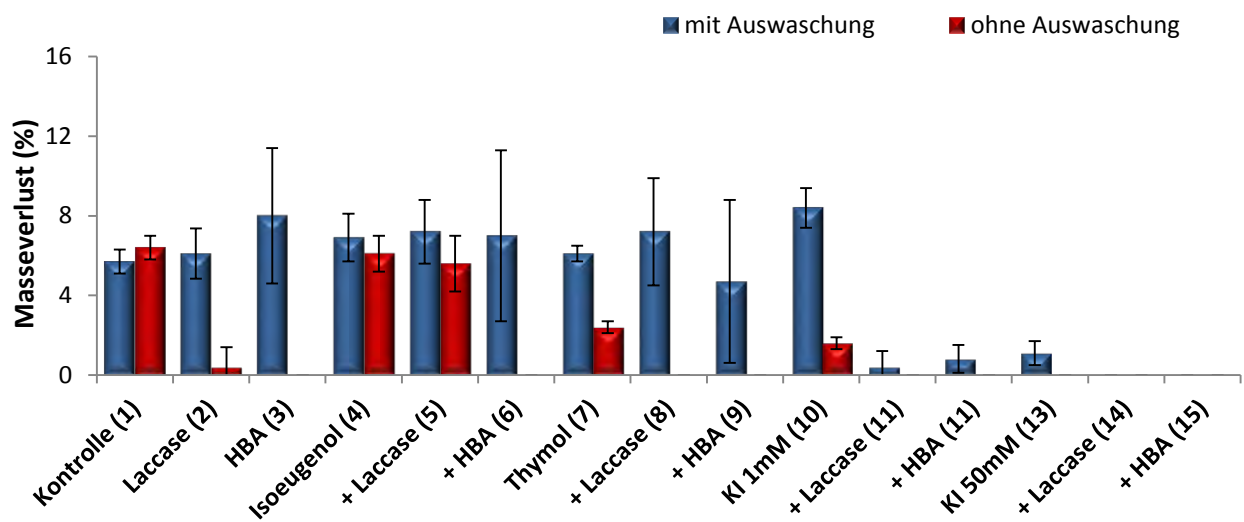


Abbildung 26: Mittlerer Masseverlust der Holzproben nach 6-wöchiger Inkubation mit *Trametes versicolor*.

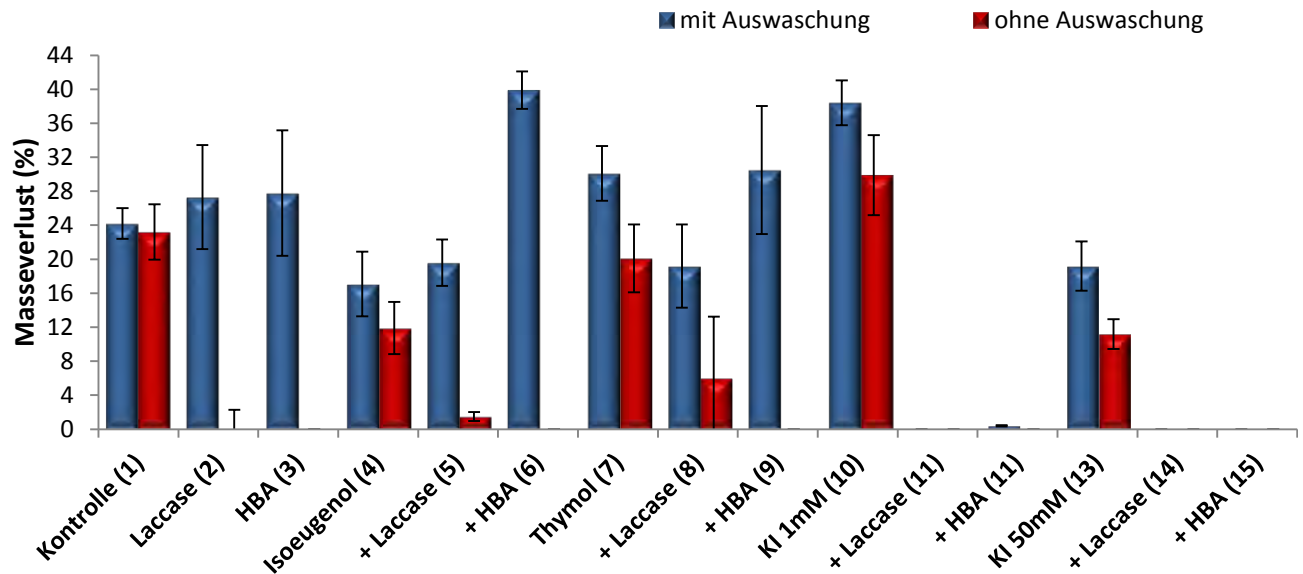


Abbildung 27: Mittlerer Masseverlust der Holzproben nach 12-wöchiger Inkubation mit *Poria placenta*.

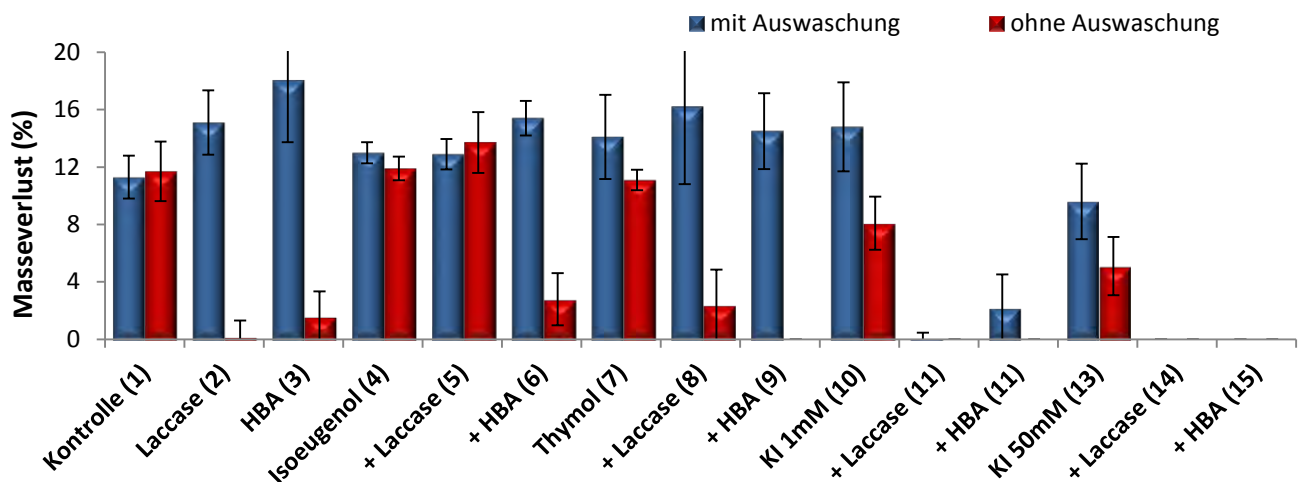


Abbildung 28: Mittlerer Masseverlust der Holzproben nach 12-wöchiger Inkubation mit *Trametes versicolor*.

Der Masseverlust der Varianten **2** und **3** wurde durch eine Auswaschung im Vergleich zur Kontrolle (**1**) erhöht. Überraschender Weise war ohne Auswaschung kaum ein bis kein Masseverlust messbar. Dies könnte folgendermaßen erklärt werden: durch Laccase könnten Holzbestandteile so verändert worden sein, dass sie einen pilzlichen Abbau abwehrten. Der Mediator scheint diesen Effekt verstärkt zu haben. Diese veränderten Holzbestandteile waren jedoch leichter auswaschbar, was wieder zu einem erhöhten Masseverlust bei den ausgewaschenen Holzproben führte.

In Abbildungen 27–29 sind auf *P. placenta* inkubierte ausgewaschene Holzproben der Varianten **1** bis **3** dargestellt. Der Anteil zersetzter Strinflächen korreliert gut mit den gemessenen Masseverlusten.



Abbildung 27: ausgewaschene Probe von Variante 1 mit *Poria placenta* inkubiert (6Wo)



Abbildung 28: ausgewaschene Probe von Variante 2 mit *Poria placenta* inkubiert (6Wo)

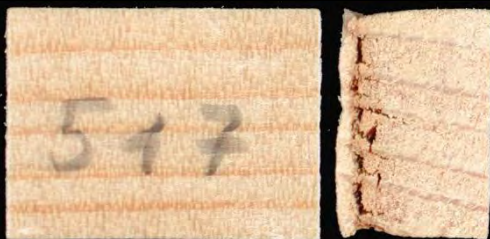


Abbildung 29: ausgewaschene Probe von Variante 3 mit *Poria placenta* inkubiert (6Wo)

Isoeugenol und Thymol alleine schienen nicht Auswaschungsresistent gewesen zu sein, wie **4** und **5** zeigen. Die Masseverluste nach den Inkubationszeiten von 6 und 12 Wochen sind sogar höher als bei den Kontrollen. Eine Behandlung mit Laccase (**5** und **8**) und Mediator (**6** und **9**) hatte leicht unterschiedliche Effekte, kann aber als nicht effektiv zusammengefasst werden. Ohne Auswaschung lagen die Masseverluste jedoch, v.a. mit Mediator, unter denen der Kontrollen. Es scheint also, als ob der Mediator in Verbindung mit Isoeugenol und Thymol reagierte, die dabei gebildeten Produkte stark fungizid wirkten aber leicht auswaschbar waren. Diese Vermutungen werden durch die Ergebnisse des Bläueversuches bestätigt: hier wurden die Holzproben zwar nicht ausgewaschen, jedoch vor dem Einbau in die Kolleschalen in eine Sporensuspension getaucht. Dieses kurze Eintau-

chen scheint bereits für einen völligen Verlust der pilzwidrigen Reaktionsprodukte gereicht zu haben, da die betroffenen Holzproben einen fast maximalen Verblauungsgrad aufzeigten.

Abbildungen 30–30 zeigen Holzproben der drei Isoeugenol-Varianten. Wieder erkennt man den erhöhten Zersetzungsgrad im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 27).



Wie bei dem Bläueversuch kann auch hier für Substanz X eine verbesserte pilzwidrige Wirkung durch Zugabe von Laccase bzw. Laccase und Mediator festgestellt werden. Ohne Laccase (**10** und **13**) waren die Masseverluste zwar bereits unter denen der Kontrolle (**1**), wurden durch Zugabe des Enzyms und des Mediators jedoch drastisch reduziert bis ganz verhindert (**11** und **12** sowie **14** und **15**). Selbst eine Auswaschung hatte hierauf kaum Einfluss. Der Einfluss von Laccase bei Substanz X wird in folgenden Abbildungen gezeigt: die Holzprobe in Abbildung 33 wurde mit Substanz X 1 mM, die in Abbildung 34 zusätzlich mit Laccase behandelt. Wie man gut erkennt, konnte dank der Laccase eine Holzzersetzung verhindert werden.



Mit VP7/260a konnten keine Masseverluste gemessen werden (**16**, **17** und **18**), was auf dessen starke fungizide Wirkung zurückzuführen ist.

Wie schon ein Vergleich der Pilzbewuchse zeigte, lässt sich auch hier aufgrund der geringeren Masseverluste feststellen, dass *T. versicolor* die Holzproben insgesamt weniger intensiv angriff als *P. placenta*.

7.4 Schlussfolgerungen

Die für diesen Versuch angewandte Methodik hat befriedigende Ergebnisse geliefert. Dennoch lässt sie sich in mancher Weise optimieren, wie etwa durch eine Veränderung der Volumenaktivität der Laccase. Rättö et al. (2004) konnten nämlich ebenfalls die Auswaschung zweier pilzwidriger Substanzen mittels einer Laccasebehandlung erniedrigen und stellten dabei fest, dass dies von der richtigen Volumenaktivität abhängig ist.

Zudem zeigen die Ergebnisse, wie bereits in den Bläueversuchen festgestellt, dass die Laccase in Kombination mit der Substanz X die Dauerhaftigkeit des Holzes gegenüber holzzersetzenden Pilzen signifikant erhöht und eine Auswaschung des Wirkstoffes vermieden wird. Auch in diesen Studien war die Wirkung der Laccase-Substanz X- Behandlung vergleichbar mit der Wirkung des chemischen Produktes VP7/260a.

8 Fazit

Mit den aus den durchgeführten Versuchen gewonnenen Erkenntnissen können, die in der Einleitung gestellten Leitfragen wie folgt beantwortet werden:

- Welches sind die optimalen Bedingungen für die Produktion von Laccase mit dem Weissfäulepilz *Heterobasidion annosum*?

Die Bildung von extrazellulärer Laccase durch *H. annosum* wurde sehr stark durch die Kultivierungsbedingungen und das verwendete Medium beeinflusst. Als optimale Bedingungen für die Laccaseproduktion waren belüftete Schottflaschen, Glucosemedium mit Hefeextrakt und Veratrylalkohol als Induktor. Die Verwendung von Sägemehl als Wachstumssubstrat ist möglich, allerdings war hier die Laccaseproduktion geringer.

- Ist fein dispergiertes Aluminiumhydroxid geeignet, um Laccase direkt aus dem Kulturüberstand von *H. annosum* zu immobilisieren?

Es konnte gezeigt werden, dass $\text{Al}(\text{OH})_3$ Partikel geeignet sind, um Laccase aus dem Kulturüberstand zu „ernten“, aufzukonzentrieren und zu immobilisieren. Zusammen mit den optimierten Kultivierungsbedingungen besteht somit die Möglichkeit, ein einfaches Verfahren zu etablieren, um Laccase für eine enzymatische Holzbehandlung herzustellen.

- Kann mittels einer Laccase-katalysierten Aktivierung geeigneter Enzymsubstrate eine biologische Wirkung auf der Holzoberfläche erreicht werden, die einem intensiven Auswaschungsprozess widersteht?

Die prinzipielle Machbarkeit einer enzymatischen Holzbehandlung mit dem Ziel eines auswaschungsresistenten antimikrobiellen Effekts konnte nachgewiesen werden. Allerdings kommt es entscheidend darauf an, das richtige Enzymsubstrat zu wählen. Mit von anderen Autoren als wirksam beschriebenen phenolischen Substanzen (bspw. Thymol und Isoeugenol) konnte in unseren Experimenten keine Laccase-abhängige Inhibition von Mikroorganismen erzielt werden.

- Gegen welche Klassen von Organismen wirkt eine Laccase-Behandlung (Bakterien, Hefen, Bläuepilze, Holzersetzer Pilze)?

Die Anwendung der Laccase in Kombination mit einer geeigneten Substanz zeigte in unseren Studien eine Wirkung gegen die verwendeten Bakterien, Hefepilze sowie gegen filamentöse Pilze aus der Klasse der Ascomyceten und Basidiomyceten.

- Wie hoch wären die Kosten pro Liter für ein Anstrichsystem mit kommerziell erhältlicher Laccase?

Benötigtes Material und Kosten pro L					
Substanz	MW	c	c	Preis (Sigma)	Kosten
	g/mol	mM	g/L	CHF/g	CHF/L
L-Weinsäure	150.09	50	7.50	0.16	1.20
Zitronensäure	210.14	48.5	10.19	0.043	0.44
Na ₂ · HPO ₄ · 7H ₂ O	268.07	103	27.61	0.087	2.40
Substanz X		50			4.12
Substanz X		10			0.82
ABTS	548.68	0.01	0.0055	56	0.31
Acetosyringone	196.2	0.05	0.0098	17.70	0.17
Laccase (<i>T. versicolor</i>), 20 U/mg			0.05	112.5	5.63
					gesamt:
			A X +ABTS+Laccase		11.25
			B X +ABTS+Laccase		7.96
			C X+Laccase		10.94
			D X+ACS+Laccase		12.76

Die Kosten einer Lacase-Behandlung liessen sich nochmals reduzieren, wenn anstatt des teuren Mediators ABTS ein kostengünstiger Mediator wie bspw. HBA (4-hydroxybenzoesäure) oder PAS (4-amino-2-hydroxybenzoesäure) verwendet wird. Beide Mediatoren erwiesen sich in den durchgeführten Studien als geeignet. Insgesamt gehen wir davon aus, dass die Kosten der Laccase-Behandlung unter den Herstellungskosten eines chemischen Produktes wie VP7 / 260a liegt. Allerdings liegen uns zu diesem Zeitpunkt keine genauen Zahlen vor.

Alles in allem lassen die Ergebnisse der verschiedenen Versuche auf einen möglichen Einsatz von Laccase im Bereich des Holzschutzes schließen. Substanz X in Verbindung mit Laccase hatte einen ähnlichen Wirkungsgrad wie das sehr effektive aber stark umwelttoxische VP7 / 260a, welches kommerziell erhältlich ist. Substanz X und ätherische Öle, für welche ein enormes, noch unerforschtes Potenzial besteht, sind Bestandteil der natürlichen Kreisläufe und belasten die Umwelt somit nur in viel geringerem Masse als herkömmliche Holzschutzprodukte. Um diese im Idealfall gänzlich zu ersetzen, sollten weitere Untersuchungen in diesem Bereich erfolgen.

9 Literatur

- Braun H.J. (1970) *Funktionelle Histologie der sekundären Sproßachse. I. Das Holz*. Handbuch der Pflanzenanatomie, 2. Aufl. IX/1. Bornträger, Berlin.
- European Standard EN 84, (1997) Wood preservatives - Accelerated aging of treated wood prior to biological testing - Leaching procedure. European Committee for Standardization (CEN), Brussels, Belgium.
- European Standard EN 113, (1997) Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes-determination of the toxic values. European Committee for Standardization (CEN), Brussels, Belgium.
- European Standard EN 152-2, (1988) Test methods for wood preservative - laboratory method for determining the preventive effectiveness treatment against blue stain in service - Part 2: other methods. European Committee for Standardisation (CEN), Brussels, Belgium.
- Adler, E. (1977) Lignin Chemistry - Past, Present and Future. *Wood Sci Technol* **11**, 169-218.
- Ahn, M.Y., Zimmerman, A.R., Martinez, C.E., Archibald, D.D., Bollag, J.M. and Dec, J. (2007) Characteristics of *Trametes villosa* laccase adsorbed on aluminum hydroxide. *Enzyme Microb Technol* **41**, 141-148.
- Baldrian, P. (2006) Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* **30**, 215-242.
- Bourbonnais, R., Leech, D. and Paice, M.G. (1998) Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta* **1379**, 381-390.
- Bourbonnais, R. and Paice, M.G. (1990) Oxidation of nonphenolic substrates - an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* **267**, 99-102.
- Elegir, G., Kindl, A., Sadocco, P. and Orlandi, M. (2008) Development of antimicrobial cellulose packaging through laccase-mediated grafting of phenolic compounds. *Enzyme Microb Technol* **43**, 84-92.
- Faix, O. (1991) Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforschung* **45**, 21-27.
- Grönqvist, S., Rantanen, K., Alén, R., Mattinen, M.L., Buchert, J. and Viikari, L. (2006) Laccase-catalysed functionalisation of TMP with tyramine. *Holzforschung* **60**, 503-508.
- Heinfling, A., Ruiz-Duenas, F.J., Martinez, M.J., Bergbauer, M., Szewzyk, U. and Martinez, A.T. (1998) A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *Febs Letters* **428**, 141-146.
- Herpoel, I., Moukha, S., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J. and Asther, M. (2000) Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. *FEMS Microbiol Lett* **183**, 301-306.
- Hüttermann, A., Mai, C. and Kharazipour, A. (2001) Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**, 387-394.
- Ibarra, D., Chavez, M.I., Rencoret, J., del Rio, J.C., Gutierrez, A., Romero, J., Camarero, S., Martinez, M.J., Jimenez-Barbero, J. and Martinez, A.T. (2007) Structural modification of eucalypt pulp lignin in a totally chlorine-free bleaching sequence including a laccase-mediator stage. *Holzforschung* **61**, 634-646.

- Johannes, C. and Majcherczyk, A. (2000) Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* **78**, 193-199.
- Kim, S., Silva, C., Zille, A., Lopez, C., Evtuguin, D.V. and Cavaco-Paulo, A. (2009) Characterisation of enzymatically oxidised lignosulfonates and their application on lignocellulosic fabrics. *Polym Int* **58**, 863-868.
- Kudanga, T., Prasetyo, E.N., Sipila, J., Eberl, A., Nyanhongo, G.S. and Guebitz, G.M. (2009) Coupling of aromatic amines onto syringylglycerol beta-guaiacyl ether using *Bacillus* SF spore laccase: A model for functionalization of lignin-based materials. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **61**, 143-149.
- Kudanga, T., Prasetyo, E.N., Sipila, J., Nousiainen, P., Widsten, P., Kandelbauer, A., Nyanhongo, G.S. and Guebitz, G. (2008) Laccase-mediated wood surface functionalization. *Engineering in Life Sciences* **8**, 297-302.
- Kudanga, T., Prasetyo, E.N., Sipila, J., Nyanhongo, G.S. and Guebitz, G.M. (2010) Enzymatic grafting of functional molecules to the lignin model dibenzodioxocin and lignocellulose material. *Enzyme Microb Technol* **46**, 272-280.
- Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D. and Rogalski, J. (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J Basic Microbiol* **41**, 185-227.
- Lomascolo, A., Record, E., Herpoel-Gimbert, I., Delattre, M., Robert, J.L., Georis, J., Dauvrin, T., Sigoillot, J.C. and Asther, M. (2003) Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *J Appl Microbiol* **94**, 618-624.
- Meza, J.C., Auria, R., Lomascolo, A., Sigoillot, J.C. and Casalat, L. (2007) Role of ethanol on growth, laccase production and protease activity in *Pycnoporus cinnabarinus* ss3. *Enzyme Microb Technol* **41**, 162-168.
- Müller, C., Euring, M. and Kharazipour, A. (2009) Enzymatic modification of wood fibres for activating their ability of self bonding. *International Journal of Materials and Product Technology* **36**, 189-199.
- Pandey, K.K. (1999) A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy. *J Appl Polym Sci* **71**, 1969-1975.
- Pandey, K.K. and Pitman, A.J. (2003) FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *Int Biodet Biodegrad* **52**, 151-160.
- Poppius-Levlin, K., Tamminen, T., Kalliola, A. and Ohra-aho, T. (2001) Characterization of residual lignin in pulps delignified by laccase/N-hydroxyacetanilide. In *Oxidative Delignification Chemistry* ed. Argyropoulos, D. Washington, DC: American Chemical Society.
- Rättö, M., Ritschkoff, A.C. and Viikari, L. (2004) Enzymatically polymerized phenolic compounds as wood preservatives. *Holzforschung* **58**, 440-445.
- Schroeder, M., Fatarella, E., Kovac, J., Guebitz, G.M. and Kokol, V. (2008) Laccase-Induced Grafting on Plasma-Pretreated Polypropylene. *Biomacromolecules* **9**, 2735-2741.
- Schwarze, F.W.M.R. (2008) *Diagnosis and prognosis of the development of wood decay in urban trees*. Melbourne: ENSPEC.

- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S.P., Nevo, E. and Hadar, Y. (2007) Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme Microb Technol* **41**, 57-61.
- Vivekanand, V., Dwivedi, P., Sharma, A., Sabharwal, N. and Singh, R.P. (2008) Enhanced delignification of mixed wood pulp by *Aspergillus fumigatus* laccase mediator system. *World J Microbiol Biotechnol* **24**, 2799-2804.
- Voda, K., Boh, B., Vratacnik, M. and Pohleven, F. (2003a) Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. *Int Biodet Biodegrad* **51**, 51-59.
- Voda, K., Boh, B., Vrtacnik, M. and Pohleven, F. (2003b) Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. *Int Biodeter Biodegr* **51**, 51-59.
- Volkmer, T. and Landmesser, H. (2007) Entwicklung eines dauerhaften, fungizidarmen Beschichtungssystems auf Holzfassaden unter Berücksichtigung des integrierten Holzschutz. Wissenschaftlicher Schlussbericht, KTI-Projektnummer 2651.DWH.
- Widsten, P. and Kandelbauer, A. (2008) Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme Microb Technol* **42**, 293-307.
- Xu, Q.H., Qin, M.H., Shi, S.L., Jin, L.Q. and Fu, Y.J. (2006) Structural changes in lignin during the deinking of old newsprint with laccase-violuric acid system. *Enzyme Microb Technol* **39**, 969-975.