

**Zum Effekt von Laccasen  
beim  
Altpapier-Deinking**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Universität Hamburg  
Fachbereich Biologie

vorgelegt von  
**Armin Hager**  
aus Sommerhausen

Hamburg 2003

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. R. PATT  
Weitere Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. O. SCHMIDT

Tag der Disputation: 11. Juli 2003

Hamburg, den 27. Juni 2003



Professor Dr. A. Frühwald  
Dekan

*Für meine Eltern*



Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 1999 – 2003 am Institut für Holzchemie und chemischer Technologie des Holzes der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft Hamburg im Rahmen des Verbundprojektes „Enzymatischer Abbau mineralölbasierender Druckfarbenbindemittel“ (DBU-Projekt 13015).

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rudolf Patt für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit sowie Herrn Dr. Jürgen Puls für die Themenstellung und die wissenschaftliche Anleitung.

Herrn Prof. Dr. Oskar Faix, Herrn Dr. Othar Kordsachia, Herrn Dr. Ralph Lehnen und Herrn Dr. Bodo Saake danke ich für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Sabine Lüthje und Herrn Dr. Olaf Döring vom Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg gilt mein Dank für die Ermöglichung und Betreuung der polarographischen Bestimmung von gelöstem Sauerstoff.

Für ihre fachliche Begleitung, ihre wertvollen Diskussionsbeiträge und tatkräftige Unterstützung bedanke ich mich ganz besonders bei Herrn Bernhard Nellessen von der Firma Nopco Paper Technology und Herrn Dr. Volker Gehr von der Firma Voith Paper Fiber Systems.

Für die freundliche Übernahme der Schmutzpunktanalysen danke ich herzlichst Frau Monique Krück und Frau Birgit Bläsing von der Firma Nopco Paper Technology.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanke ich mich für die Einweisung und Durchführung zahlreicher Arbeiten, allen voran bei Frau Martina Reisen, Frau Inge Stichweh, Frau Silke Radtke und Frau Silke Weidemann.

Für die materielle Unterstützung bedanke ich mich bei der Degussa AG für die Bereitstellung von Flotationszellen, beim Spiegel-Verlag und bei der Firma Nopco Paper Technology für die Bereitstellung von Remittenten, bei UPM-Kymmene Augsburg, Norske Skog Walsum, Stora Enso Maxau, der Zellstoff- u. Papierfabrik Rosenthal, Steinbeis Temming Papier, Gruner+Jahr Itzehoe und M. Dumont Schauberg für die Überlassung von Faserstoffen sowie bei Novozymes Deutschland und beim Consortium für elektrochemische Industrie für die Zusendung von Laccasen.

Der Deutschen Bundesstiftung Umwelt und der TUHH Technologie danke ich für die finanzielle Unterstützung.



|                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Inhaltsverzeichnis.....</b>                                           | <b>I</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>                                        | <b>V</b>  |
| <b>1 Einleitung.....</b>                                                 | <b>1</b>  |
| <b>2 Allgemeiner Teil.....</b>                                           | <b>4</b>  |
| <b>2.1 Deinking.....</b>                                                 | <b>4</b>  |
| 2.1.1 Druckfarbenablösung.....                                           | 4         |
| 2.1.2 Druckfarbenaustrag.....                                            | 5         |
| 2.1.2.1 Flotationsverfahren.....                                         | 5         |
| 2.1.2.2 Waschverfahren.....                                              | 7         |
| 2.1.3 Labordeinking.....                                                 | 7         |
| 2.1.4 Neutraldeinking.....                                               | 8         |
| <b>2.2 Vergilbung.....</b>                                               | <b>10</b> |
| <b>2.3 Enzyme.....</b>                                                   | <b>14</b> |
| <b>2.4 Laccase und das Laccase-Mediator-System.....</b>                  | <b>17</b> |
| 2.4.1 Laccase.....                                                       | 17        |
| 2.4.2 Laccase-Mediator-System.....                                       | 25        |
| 2.4.2.1 Allgemeine Übersicht.....                                        | 25        |
| 2.4.2.2 Mediatoren.....                                                  | 27        |
| 2.4.2.3 Reaktionsmechanismen im LMS.....                                 | 34        |
| 2.4.2.4 LMS-katalysierte Substratumsetzungen.....                        | 39        |
| 2.4.3 Anwendungsgebiete für Laccase und das Laccase-Mediator-System..... | 47        |
| 2.4.3.1 Zellstoffbleiche.....                                            | 47        |
| 2.4.3.2 Enzymatische Kontrolle von Holzextraktstoffen.....               | 49        |
| 2.4.3.3 Holzwerkstoffherstellung.....                                    | 50        |
| 2.4.3.4 Abbau umweltschädlicher Chemikalien.....                         | 51        |
| 2.4.3.5 Textilindustrie.....                                             | 52        |
| 2.4.3.6 Bodensanierung.....                                              | 54        |
| 2.4.3.7 Weitere Anwendungsmöglichkeiten.....                             | 54        |
| <b>2.5 Enzymatisches Deinking.....</b>                                   | <b>55</b> |
| 2.5.1 Cellulasen und Hemicellulasen.....                                 | 55        |
| 2.5.2 Amylasen und Pektinasen.....                                       | 57        |
| 2.5.3 Lipasen.....                                                       | 58        |
| 2.5.4 Esterasen.....                                                     | 58        |
| 2.5.5 Laccasen.....                                                      | 59        |
| <b>2.6 Ziel der Arbeit.....</b>                                          | <b>59</b> |

|                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3 Experimenteller Teil – Material und Methoden.....</b>                                                 | <b>60</b> |
| <b>3.1 Materialien.....</b>                                                                                | <b>60</b> |
| 3.1.1 Enzyme.....                                                                                          | 60        |
| 3.1.2 Chemikalien.....                                                                                     | 60        |
| 3.1.2.1 Mediatoren.....                                                                                    | 60        |
| 3.1.2.2 Pufferlösungen.....                                                                                | 60        |
| 3.1.2.3 Chemikalien für Deinking und Bleiche.....                                                          | 60        |
| 3.1.3 Faserstoffe.....                                                                                     | 61        |
| 3.1.3.1 Primärfaserstoffe.....                                                                             | 61        |
| 3.1.3.2 Sekundärfaserstoffe.....                                                                           | 61        |
| <b>3.2 Deinking-Geräte.....</b>                                                                            | <b>62</b> |
| <b>3.3 Methoden.....</b>                                                                                   | <b>62</b> |
| 3.3.1 Methoden zur Charakterisierung von Enzympräparaten.....                                              | 62        |
| 3.3.1.1 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Laccase..                                               | 62        |
| 3.3.1.2 Bestimmung der Sauerstoffumsetzungsrate von Lac-<br>case.....                                      | 63        |
| 3.3.2 Methoden zur enzymunterstützten Druckfarbenablösung und<br>-entfernung von Sekundärfaserstoffen..... | 64        |
| 3.3.2.1 Alterung der Modellmischung für Haushaltssammel-<br>ware.....                                      | 64        |
| 3.3.2.2 Enzymatische Behandlung von Sekundärfaserstoffen....                                               | 64        |
| 3.3.2.3 Flotationsdeinking von Sekundärfaserstoffen.....                                                   | 66        |
| 3.3.2.4 Hyperwäsche von Sekundärfaserstoffen.....                                                          | 67        |
| 3.3.2.5 Peroxid-, FAS-Bleiche und alkalische Extraktion von<br>Sekundärfaserstoffen.....                   | 67        |
| 3.3.3 Methoden zur enzymunterstützten Bleiche von Primärfaser-<br>stoffen.....                             | 68        |
| 3.3.3.1 Enzymatische Behandlung von Primärfaserstoffen.....                                                | 68        |
| 3.3.3.2 Alkalische Extraktion und Peroxidbleiche von Primär-<br>faserstoffen.....                          | 68        |
| 3.3.4 Optische Eigenschaften.....                                                                          | 69        |
| 3.3.4.1 Weißgrad.....                                                                                      | 69        |
| 3.3.4.2 Farbort.....                                                                                       | 69        |
| 3.3.4.3 Gelbwert.....                                                                                      | 70        |
| 3.3.5 Schmutzpunktanalyse.....                                                                             | 70        |
| 3.3.6 Bestimmung des Ligningehaltes.....                                                                   | 71        |
| 3.3.6.1 Kappa-Zahl.....                                                                                    | 71        |
| 3.3.6.2 Ligningehalte ligninreicher Faserstoffe.....                                                       | 71        |

|                                                                                                               |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.3.7 Bestimmung des Aschegehaltes.....                                                                       | 72         |
| <b>4 Spezieller Teil - Ergebnisse und Diskussion eigener Untersuchungen.....</b>                              | <b>73</b>  |
| <b>4.1 Charakterisierung der Laccasen.....</b>                                                                | <b>73</b>  |
| 4.1.1 Aktivitätsbestimmung der Laccasen.....                                                                  | 73         |
| 4.1.2 Umsetzung von Mediatoren unter Deinkingbedingungen.....                                                 | 76         |
| <b>4.2 Versuche zum Laccase- und Laccase-Mediator-unterstützten Deinking von Sekundärfaserstoffen.....</b>    | <b>78</b>  |
| 4.2.1 Versuche zum Deinking von Altpapier.....                                                                | 79         |
| 4.2.1.1 Deinking nach Inkubation mit Laccase und Mediator im neutralen pH-Bereich.....                        | 79         |
| 4.2.1.1.1 Einfluss variabler Laccase-Dosierungen.....                                                         | 79         |
| 4.2.1.1.2 Einfluss variabler Mediator-Dosierung.....                                                          | 83         |
| 4.2.1.2 Deinking nach Inkubation mit Laccase und Mediator im sauren pH-Bereich.....                           | 86         |
| 4.2.1.3 Weitere Versuche zur Dosierung von Laccase und HBT im neutralen pH-Bereich.....                       | 89         |
| 4.2.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Versuchen zum Deinking von AP.....                              | 95         |
| 4.2.2 Versuche zum Deinking von DIP.....                                                                      | 96         |
| 4.2.2.1 DIP-Stoffbehandlung mit <i>Trametes villosa</i> - Laccase und Mediator HBT.....                       | 98         |
| 4.2.2.2 Einfluss steigender HBT-Gaben.....                                                                    | 105        |
| 4.2.2.3 DIP-Stoffbehandlung mit <i>Trametes villosa</i> - Laccase ohne Mediator HBT.....                      | 108        |
| 4.2.3 Versuche mit unbedrucktem Zeitungsdruckpapier.....                                                      | 118        |
| 4.2.4 Versuche zur Bleichbarkeit von mit Laccase- und Mediator behandeltem und deinktem DIP.....              | 120        |
| 4.2.4.1 Ergebnisse nach Flotation und Hyperwäsche.....                                                        | 121        |
| 4.2.4.2 Ergebnisse von Bleiche und alkalischer Extraktion.....                                                | 123        |
| 4.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Versuchen zum Deinking.....                                       | 126        |
| <b>4.3 Versuche zur LMS- und Laccase-unterstützten Bleiche von Primärfaserstoffen.....</b>                    | <b>127</b> |
| 4.3.1 Behandlung von Zellstoff mit Laccase und Mediator.....                                                  | 130        |
| 4.3.1.1 Einfluss des Laccase-Präparates auf die Funktionstüchtigkeit des LMS unter optimalen Bedingungen..... | 130        |

|                                                                                                                        |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.1.2 Einfluss suboptimaler Reaktionsbedingungen auf die Funktionstüchtigkeit des LMS.....                           | 135        |
| 4.3.1.2.1 Einfluss neutral-alkalischer pH-Werte während der Inkubationsphase auf die Funktionstüchtigkeit des LMS..... | 135        |
| 4.3.1.2.2 Einfluss der Sauerstoffversorgung während der Inkubationsphase auf die Funktionstüchtigkeit des LMS.....     | 141        |
| 4.3.1.3 Behandlung von Zellstoff mit Laccase ohne Mediator.....                                                        | 147        |
| 4.3.1.4 Unterschiede beim Einsatz von Laccase mit und ohne Mediator.....                                               | 152        |
| 4.3.2 Untersuchungen zur LMS- und Laccase-unterstützten Bleiche von Holzschliff und TMP.....                           | 157        |
| 4.3.2.1 Behandlung von Holzschliff mit Laccase und Mediator...                                                         | 157        |
| 4.3.2.2 Behandlung von TMP mit Laccase und Mediator.....                                                               | 162        |
| 4.3.2.3 Behandlung von Holzschliff mit Laccase ohne Mediator.                                                          | 166        |
| 4.3.2.4 Behandlung von TMP mit Laccase ohne Mediator.....                                                              | 169        |
| 4.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen mit Primärfaserstoffen.....                                     | 171        |
| <b>4.4 Abschließende Diskussion der Ergebnisse.....</b>                                                                | <b>172</b> |
| <b>5 Zusammenfassung.....</b>                                                                                          | <b>180</b> |
| <b>6 Literatur.....</b>                                                                                                | <b>182</b> |
| <b>7 Anhang.....</b>                                                                                                   | <b>200</b> |

**Abkürzungsverzeichnis**

|           |                                                                                    |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|
| ABTS      | 2,2'-Azino-bis-(3-ethylthiazolin-6-sulfonsäure)                                    |
| AP        | Altpapier                                                                          |
| DIP       | deinked pulp                                                                       |
| E         | alkalische Extraktionsstufe                                                        |
| HBT       | 1-Hydroxybenzotriazol                                                              |
| L         | Inkubationsstufe mit Laccase                                                       |
| L-E       | Inkubationsstufe mit Laccase und nachfolgender alkalischer Extraktion              |
| L-P       | Inkubationsstufe mit Laccase und nachfolgender Peroxidbleichstufe                  |
| LM        | Inkubationsstufe mit Laccase und Mediator                                          |
| LM-E      | Inkubationsstufe mit Laccase und Mediator und nachfolgender alkalischer Extraktion |
| LM-P      | Inkubationsstufe mit Laccase und Mediator und nachfolgender Peroxidbleichstufe     |
| LMS       | Laccase-Mediator-System                                                            |
| <i>M.</i> | <i>Myceliophthora</i>                                                              |
| MPa       | Mega-Pascal; (1 MPa = $10^6$ Pa = 10 Bar)                                          |
| P         | Peroxidbleichstufe                                                                 |
| PAH       | polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe                                       |
| <i>T.</i> | <i>Trametes</i>                                                                    |
| U         | Units                                                                              |
| VA        | Violursäure                                                                        |



## 1 Einleitung

Altpapier ist der wichtigste Rohstoff der europäischen Papierindustrie und wird in Zukunft voraussichtlich noch an Bedeutung gewinnen. In Folge der Selbstverpflichtung des Verbandes der Europäischen Papierindustrie (CEPI) und des Europäischen Verbandes des Altpapierhandels (ERPA), im Jahr 2005 56% des verbrauchten Papiers wieder zu erfassen und zu verwerten (N.N., 2000), wird im Vergleich zum Jahr 2001 europaweit eine Steigerung des Altpapierverbrauchs um 7,9 Millionen Tonnen auf 87 Millionen Tonnen erwartet. Für Deutschland wird ein Anstieg des Altpapierverbrauchs in der Papierindustrie von 11,5 Millionen Tonnen im Jahr 2001 auf 13,8 Millionen Tonnen im Jahr 2005 und 16,8 Millionen Tonnen im Jahr 2010 prognostiziert (KIBAT, 2002).

Für die Kapazitäten in Deutschland zur Erzeugung von Papier, Karton und Pappe ergibt sich ausgehend von 17,9 Millionen Tonnen im Jahr 2001 voraussichtlich ein Anstieg auf 20,8 Millionen Tonnen im Jahr 2005 und 24,2 Millionen Tonnen im Jahr 2010. Dies entspricht einer erwarteten Produktionssteigerung von 35% (KIBAT, 2002). Gleichzeitig wird auf der Konsumentenseite die deutsche Inlandsnachfrage nach Papier- und Papierprodukten deutlich langsamer zunehmen. Im Jahr 2001 wurden 18,5 Millionen Tonnen verbraucht. Im Jahr 2005 werden dies voraussichtlich 20,2 und im Jahr 2010 21,8 Millionen Tonnen sein. Damit wird Deutschland ab dem Jahr 2005 zum dauerhaften Nettoexporteur von Papier (KIBAT, 2002). Auf Grund der geringeren Zunahme der Inlandsnachfrage nach Papier und Papierprodukten und der erwarteten Produktionssteigerung zeichnet sich auch ab, dass die steigenden Mengen von Altpapier für die Erzeugung von Papier und Papierprodukten zukünftig immer weniger durch die Altpapiererfassung in Deutschland gedeckt werden können. Die erfassten Mengen werden im Vergleich zu 13,8 Millionen Tonnen im Jahr 2001 15 Millionen Tonnen im Jahr 2005 und 16,6 Millionen Tonnen im Jahr 2010 betragen. Im Jahr 2005 wird die Altpapierexportquote bereits um 50 Prozent gesunken sein. Bis 2010 wird das Altpapieraufkommen geringer ausfallen als der Altpapierverbrauch. Damit wird Deutschland zum Altpapiereinfuhrland (KIBAT, 2002).

Wenn auch in einigen europäischen Ländern noch eine deutliche Steigerung der Altpapiererfassungsquote möglich ist (KIBAT, 2002), wird doch die vorhersehbare Verknappung des Altpapiers zu steigenden Rohstoffpreisen führen. Generell ist auch zu befürchten, dass die gesteigerte Erfassung von Altpapier mit einer Qualitätsverschlechterung einhergehen wird (KRAUTHAUFF und WIESE, 1998; GÖTTSCHING, 2001), denn schon heute erfüllt das angelieferte Altpapier häufig nicht mehr die festgelegten Kriterien der Altpapiersortenliste und somit nicht die Ansprüche der Papierindustrie (BÜLOW et al., 2002). Gleichzeitig sind aber hochwertige Altpapierqualitäts-

ten nötig, um bei der Erzeugung von Papier die wachsenden Qualitätsansprüche an das Fertigprodukt erfüllen zu können (KIBAT, 2000; BÜLOW et al., 2002).

Verschärft wird dieses Problem in Deutschland dadurch, dass sich das wesentliche Potenzial für die Steigerung des Altpapiereinsatzes neben der Ausweitung von Produktionskapazitäten bei der Papiersortengruppe der graphischen Papiere befindet, da sich deren Altpapiereinsatzquote noch auf niedrigem Niveau bewegt (KIBAT, 2002; RENNER et al., 2002; GÖTTSCHING, 2001). Sie betrug im Jahr 2001 44% (KIBAT, 2002) und ist damit deutlich niedriger als die Einsatzquote für Hygiene- oder Verpackungspapiere (77% bzw. 95%). Gerade im Bereich der graphischen Papiere kann jedoch nur dann die Altpapiereinsatzquote gesteigert werden, wenn ausreichende Mengen hochwertigen Altpapiers verfügbar sind, die die Herstellung des qualitativ anspruchsvollen Produktes erlauben. Dagegen sind in Hinblick auf den verstärkten Einsatz von Altpapier im großen Umfang nur die unteren Altpapiersorten verfügbar (PUTZ, 1996), die vorwiegend aus der haushaltsnahen Erfassung stammen (RENNER et al., 2002). Sie stellen mit 75 % das größte Altpapierreservoir dar, beinhalten alle bekannten Arten holzfreier und holzhaltiger Fasern und können hinsichtlich ihrer Faserzusammensetzung stark schwanken. Die durchschnittliche Zusammensetzung von Altpapier in einer Deinkinganlage bestand 1995 aus 41 % Zeitungen, 39% Zeitschriften, 9 % holzfreien Papieren, 6 % unerwünschten Pappen und Papieren, 4 % sonstigen hellen Papieren sowie 1 % papierfremden Bestandteilen (RENNER et al., 1996). Der Anteil an holzhaltigen Papieren war damit vergleichsweise hoch.

Diese Rahmenbedingungen motivieren zur Entwicklung neuer Deinkingmethoden, die die Verarbeitung geringerer Altpapierqualitäten in einen hochwertigen Sekundärfaserstoff erlauben. Dabei wird von Seiten der Biotechnologie die Einführung von Enzymen in die Sekundärfaserstoffaufbereitung verfolgt. Neben Druckfarbenablösung und -austrag (OW und EOM, 1990) stehen dabei je nach Enzymtyp die Möglichkeiten zur Erhöhung der Entwässerungsfähigkeit des Faserstoffes (STORK, 1994), zur Verbesserung der Aussortierung von Stickies (FITZHENRY et al., 2000), zur Reduzierung der Abwasserbelastung oder des zum Deinking notwendigen Chemikalieneinsatzes (ACKERMANN et al., 1999 b) im Vordergrund.

Intensive Untersuchungen wurden bisher nur mit Enzymen aus der Klasse der Hydrolasen durchgeführt. Sehr wenige Erfahrungen werden in der Literatur über den Einsatz oxidativer Enzyme beim Deinking ausgetauscht. Eine dieser Oxidasen ist das Enzym Laccase. Diese besitzt auf Grund ihres radikalischen Reaktionscharakters und der möglichen Kombination mit sogenannten Mediatoren (Katalysatoren) ein weites Substratspektrum. Dieses schließt veretherte (oxidierte) Strukturen, Fette und

Harze mit ein (WARIISHI et al., 1987; BOURBONNAIS und PAICE, 1990; KARLSSON et al., 2001). Damit könnte dieses Enzym ein Potenzial zur Entfernung von Druckfarben besitzen.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Auswirkungen der Oxidase Laccase - alleine oder in Verbindung mit dem Mediator 1-Hydroxybenzotriazol - auf die Entfernung von Druckfarben sowie auf die Entwicklung von Weißgrad und Farbeigenschaften des Sekundärfaserstoffes bei der Flotation von Haushaltssammelware im neutralen pH-Bereich.

## **2 Allgemeiner Teil**

### **2.1 Deinking**

Der Prozess der Druckfarbenentfernung, das sog. „Deinking“, umfasst zwei wesentliche verfahrenstechnische Prozesse. Im ersten Schritt, der Druckfarbenablösung, werden Druckfarbenpartikel und Papierfasern voneinander getrennt. Im zweiten Schritt, dem Druckfarbenaustrag, werden die abgelösten Farbpartikel aus der Stoffsuspension entfernt.

#### **2.1.1 Druckfarbenablösung**

Die Druckfarbenablösung im alkalischen Verfahren ist im Wesentlichen ein mechanischer Prozess. Scher- und Reibungskräfte, die während Stoffauflösung, Schwerschmutz- und Leichtschmutzabtrennung, Entstippung sowie Sortierung auftreten, bewirken die Abtrennung der Druckfarbenpartikel von den Fasern.

Die Zugabe von Natronlauge im alkalischen Verfahren bewirkt die Quellung der Fasern und unterstützt dadurch die Abtrennung der Druckfarben, indem sich Spannungskräfte zwischen den Fasern und den nicht quellbaren Druckfarbenpartikeln entwickeln. Dadurch werden die Druckfarbenpartikel quasi „abgesprengt“. Zumindest sinkt die mechanische Energie, die für die Abscherung der Druckfabenpartikel benötigt wird (BOS et al., 1999). Mit der Anhebung des pH-Wertes nimmt die Konzentration an Hydroxylionen zu, die die negative Ladung an der Oberfläche der Druckfarben und Fasern verstärken. Dies führt zu einer steigenden gegenseitigen elektrostatischen Abstoßung von Fasern und Druckfarbenpartikeln und begünstigt den Ablöseprozess (HANECKER, 1996). Beim Einsatz von Fettsäuren als Sammler erhöht Natronlauge deren Löslichkeit in Wasser, so dass sie als Tenside (ausgerüstet an einem Ende mit einer hydrophoben Kohlenwasserstoffkette und am anderen Ende mit einer hydrophilen Carboxylgruppe) grenzflächenaktiv werden und die Oberflächenspannung des Wassers unter die Oberflächenspannung der Feststoffteilchen herabsetzen (HANECKER, 1996). Dies ist Voraussetzung für die vollständige Benetzung von Druckfarbenpartikeln und Fasern, um die Druckfarbenablösung mit Hilfe der elektrostatischen Abstoßungskräfte zu optimieren. Außerdem hydrophilisieren die Tensidmoleküle zusätzlich die Druckfarbenpartikel, indem sie sich mit ihrem hydrophoben Ende an den Druckfarbenpartikeln anlagern, mit ihrem hydrophilen Ende ins wässrige Medium zeigen und dadurch die Abstoßung zwischen Druckfarbenteilchen und Fasern

verstärken. Sind die Druckfarbenpartikel abgelöst, werden sie durch die Tenside stabilisiert, indem sie auf Grund des hydrophilen Gesamtcharakters in Lösung gehalten werden (vergl. Abb. 2.1).

Um der bei höheren pH-Werten auftretenden alkalibedingten Vergilbung der holzhaltigen Faserbestandteile des Altpapiers entgegenzuwirken, wird Wasserstoffperoxid als Bleichmittel eingesetzt. Das wirksame Bleichagens ist das Perhydroxyl-Anion, das bei der heterolytischen Dissoziation entsteht. Durch Einwirkung von Temperatur, Alkali und Schwermetallen kommt es jedoch zu einem homolytischen Zerfall des Peroxids über Hydroxylradikale zu Wasser und Sauerstoff. Zur Verhinderung des homolytischen Zerfalls des Peroxids wird Wasserglas eingesetzt, das in der Lage ist, mehrwertige Metallionen zu binden. Gleichzeitig dispergiert es freigewordene Druckfarbenpartikel und verhindert deren Wiederaufziehen auf die Fasern. Desweiteren stabilisiert es den pH-Wert der Altpapiersuspension und reduziert den Austrag von Füll- und Feinstoffen (GÖTTSCHING und PAKARINEN, 2000).

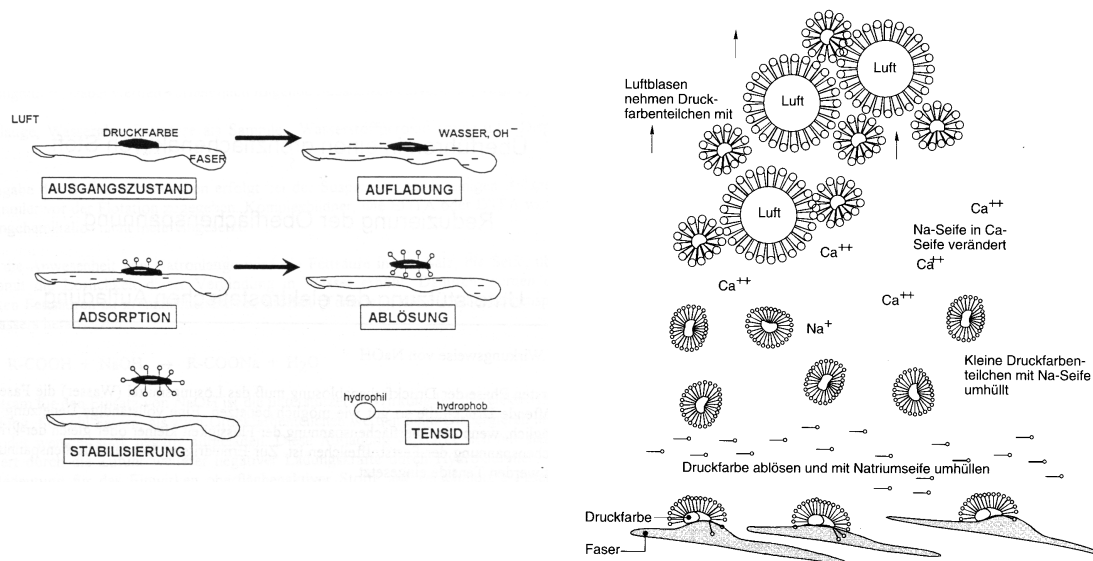
### **2.1.2 Druckfarbenaustrag**

Für den Druckfarbenaustrag stehen zwei verschiedene Verfahren zur Verfügung, das Flotations- und das Waschdeinkingverfahren. Ersteres wurde in den Anfängen auf dem europäischen Festland und Japan entwickelt, letzteres in den USA, England und Schweden. Das Waschverfahren kommt heute als Folge gestiegener Umweltschutzauflagen und hoher Verluste an Füll- und Feinstoffen als reines Deinkingverfahren nicht mehr vor. Sollen jedoch vor allem Füllstoffe ausgetragen werden, wie im Fall der Altpapieraufbereitung für die Tissue-Produktion, werden heute beide Verfahren miteinander kombiniert (BOS et al., 1999).

#### **2.1.2.1 Flotationsverfahren**

Das Prinzip des Flotationsverfahrens beruht darauf, dass sich Druckfarbenpartikel an Luftblasen, die in die Faserstoffsuspension eingebracht werden, anheften und mit diesen als Schaum ausgetragen werden. Druckfarbenteilchen und Luftblasen besitzen zwar bereits hydrophobe Oberflächen, ohne spezielle Maßnahme ist jedoch die Bindung zwischen Luft und Druckfarbenpartikel zu schwach, um stabile Schaumlagen zu bilden. Mit der Einbringung von Natriumseife wurde die Oberfläche der Druckfarbenpartikel bei der Dispergierung zur Druckfarbenablösung zudem hydrophilisiert (vergl. Kap. 2.1.1 und Abb. 2.1). Calciumionen, die aus dem

Betriebswasser und dem Füllstoff- und Strichanteil des Altpapiers stammen, verdrängen aber im weiteren Verlauf das Natrium aus dem Fettsäuresalz, so dass aus der ursprünglich wasserlöslichen, hydrophilisierenden Natriumseife wasserunlösliche, hydrophobisierende Calciumseife wird und die Druckfarbenpartikel von einer wasserabstoßenden Calciumseifenschicht umhüllt werden. Die Druckfarben-Calciumseifen-Agglomerate sind nun in der Lage, sich an Luftblasen anzuheften und eine stabile Schaumlage auf der Oberfläche der Stoffsuspension zu bilden (Abb. 2.1), die als sog. Reject abgesaugt, abgeschabt oder mit Hilfe eines Überlaufs abgeführt werden kann (BOS et al., 1999).



**Abb. 2.1:** Links: Schematische Darstellung des Ablöseprozesses (HANECKER, 1996). Rechts: Prinzip des Druckfarbenaustrags mittels Flotationsdeinking (BOS et al., 1999)

Die Güte des Austrags abgelöster Druckfarbenpartikel während der Flotation hängt neben den Oberflächeneigenschaften der Druckfarbenpartikel und den eingesetzten Chemikalien von der Druckfarbenpartikelgröße in Zusammenspiel mit dem in der Flotationszelle vorhandenen Luftblasengrößenspektrum (Durchmesser und Anzahl), den vorherrschenden Strömungsbedingungen und der Stoffdichte ab. Kleine Druckfarbenpartikel erfordern eine hohe Relativgeschwindigkeit, um aus dem Stoffstrom auszubrechen und in Kontakt mit der Luftblase zu kommen. Hohe Turbulenzen begünstigen die Entstehung und den Erhalt kleiner Luftblasen, die diese Bedingung erfüllen. Große Druckfarbenpartikel benötigen dagegen große Luftblasendurchmesser, um sich für den Austrag ausreichend an die Luftblasen schmiegen zu können. Treten bei hohen Turbulenzen zu große Schwerkkräfte auf, werden sie wieder abgetrennt. Bei zu hoher Stoffdichte (>1,2%) wird das freie Aufsteigen der Luftblasen-Druckfarben-Agglomerate durch die Fasern behindert.

Durch Zusammenstoß der Luftblasen entstehen dann Blasendurchmesser, die für eine gute Flotation und die Ausbildung eines stabilen Schaums zu groß sind.

Auf Grund dieser Bedingungen kann im Flotationsdeinking nur ein bestimmtes Teilchengrößenspektrum ausgetragen werden. Der untere Durchmesserbereich für flotierbare Partikel wird mit 2 bis 8  $\mu\text{m}$ , der obere Durchmesserbereich mit 100 bis 250  $\mu\text{m}$  angegeben (BOS et al., 1999; GÖTTSCHING und PAKARINEN, 2000; McCOOL, 1993; BROEREN, 1989). Die Sichtbarkeitsgrenze für Druckfarbenteilchen liegt bei einem Durchmesser von 50  $\mu\text{m}$ . Druckfarbenpartikel unterhalb dieses Durchmessers tragen jedoch zur Senkung des Weißgrades bei (GÖTTSCHING et al., 2000).

### **2.1.2.2 Waschverfahren**

Das Prinzip des Waschdeinkings beruht auf der Trennung von Druckfarben und Fasern durch die wiederholte Verdünnung und Eindickung der Altpapierstoffsuspension (BOS et al., 1999). Die abgelösten Druckfarbenpartikel werden bei der Entwässerung mit dem Waschwasser ausgetragen. Da für die Austragung der Druckfarben im Waschprozess deutlich kleinere Partikeldurchmesser ( $< 30 \mu\text{m}$ ) angestrebt werden als beim Flotationsverfahren (GÖTTSCHING und PAKARINEN, 2000), erfolgt die Druckfarbenablösung unter mechanisch härteren Bedingungen. Dispergiermittel verhindern das Wiederaufziehen der Druckfarben auf die Faser.

Aus Sicht von Laboruntersuchungen zum Deinking ist interessant, dass auch Druckfarbenteilchen entfernt werden können, deren Partikeldurchmesser unterhalb der Flotationsgrenze liegen (vergl. Kap. 2.1.3).

### **2.1.3 Labordeinking**

In dieser Arbeit wurde in Anschluss an das Flotationsdeinking in Anlehnung an PEGELOW und NELLESSEN (1998) ein Waschdeinking (sog. „Hyperwäsche“) angeschlossen. Die Kombination beider Deinkverfahren ermöglicht eine vollständige Entfernung aller abgelöster Druckfarbenpartikel. Dabei erhält man nach der Flotationsstufe eine Information über den Austrag flotierbarer Druckfarbenpartikel. Das Deinkergebnis nach Hyperwäsche zeigt, ob weitere Druckfarbenpartikel vorliegen, die unter die Flotationsgrenze zerkleinert wurden. Beim enzymunterstützten Deinking informiert diese Versuchsanordnung darüber, ob Druckfarbenpartikel enzymatisch so stark angegriffen werden, dass sie fein dispergiert in nicht flotierbarem Zustand vorliegen. Mit dem Austrag der hellen

Füllstoffe des Altpapiers ist ein Abfall des Weißgrades verbunden. Da die Entaschung nach Hyperwäsche deutlich höher ist als nach Flotation, sind beide Ergebnisse bezüglich des Weißgrades nicht mehr vergleichbar. Um die Vergleichbarkeit herzustellen, wurde der Aschegehalt der Prüfblätter bestimmt und mit Hilfe einer Eichkurve, die den Zusammenhang zwischen Entaschung und Weißgradverlust darstellt, der Weißgrad für die Prüfblätter bei einem Ausgangsaschegehalt von 20 Prozent berechnet (PEGELOW und NELLESSEN, 1998).

#### **2.1.4 Neutraldeinking**

Der Hintergrund für die Entwicklung eines Deinkingverfahrens für holzhaltige Haushaltssammelware bei neutralem pH-Wert (SCHWINGER und SCHMID, 1994; SCHMID und SCHWINGER, 1994; SCHMID, 1995; SCHWINGER, 1995) liegt in einer Reihe von Nachteilen, die bei der Anwendung des etablierten alkalischen Deinkingverfahrens mit Wasserglas und Wasserstoffperoxid in Kombination mit Fettsäuren bzw. deren Natriumsalz als Sammler in Kauf genommen werden müssen.

Infolge des Alkalieinsatzes kommt es zu einer Reihe unerwünschter Nebeneffekte (HANECKER und WELT, 1995; RØRING und HAYNES, 1998; ACKERMANN et al., 1999 a und b; GÖTTSCHING und PAKARINEN, 2000): Durch den hohen pH-Wert werden Extraktstoffe und Ligninbestandteile herausgelöst, was zu einer Erhöhung der CSB- und BSB-Fracht im Abwasser führt und die Ausbeute an deinktem Gutstoff mindert. Klebende Verunreinigungen gehen im alkalischen Milieu ebenfalls vermehrt in Lösung und können so stark zerkleinert werden, dass sie nur unzureichend aussortiert werden können. Die holzhaltigen Faserbestandteile des Altpapiers neigen bei hohem pH-Wert zur alkalibedingten Vergilbung, was den Einsatz von Wasserstoffperoxid als bleichendes Agens und den Einsatz von Wasserglas als Stabilisator für das Bleichmittel notwendig macht. Wasserglas kann jedoch zu Ablagerungen auf der Papiermaschine führen (ACKERMANN et al., 1999 b). Der Einsatz der drei Chemikalien (Natronlauge, Wasserstoffperoxid und Wasserglas) führt zu relativ hohen Chemikalienkosten im Vergleich zu einem neutral geführten Deinkprozess, bei dem keine Vergilbung stattfindet (SCHMID und SCHWINGER, 1994; SÜSS et al., 1995). Schließlich wird durch die mechanischen Kräfte der Stoffaufbereitungsaggregate die Faseroberfläche eines im alkalischen Milieu gequollenen Faserstoffes relativ stark fibrilliert und der Feinstoffanteil erhöht. Dies führt zu einer Verringerung der Entwässerungseigenschaften und damit zu geringeren Papiermaschinengeschwindigkeiten (SCHMID und SCHWINGER, 1994).

Gleichzeitig geht mit der Erhöhung des Feinstoffanteils ein Absinken der Festigkeitseigenschaften einher (STORK und PULS, 1994).

Das Neutraldeinkingverfahren hat zum Ziel, diese Nachteile zu vermeiden. Durch das Arbeiten im neutralen pH-Bereich wird die alkaliinduzierte Vergilbung vermieden, so dass während der Zerkleinerung des Altpapiers nicht nur auf Natronlauge, sondern auch auf Wasserstoffperoxid und Wasserglas verzichtet werden kann. Dies bedeutet wiederum niedrigere Chemikalienkosten. Da im neutralen Bereich weniger organische Substanz in Lösung geht, fällt auch die CSB- bzw. BSB-Belastung des Abwassers niedriger aus (ACKERMANN et al., 1999 b).

Weiterführende Arbeiten zum Neutraldeinking zeigen jedoch, dass dieses System auch Schwächen besitzt. Im Neutralverfahren ist eine dem alkalischen Verfahren vergleichbare Auflösung des Altpapiers nur mit einem höheren Energieeintrag im Pulper erzielbar. Neben dem wesentlich höheren Energiebedarf bei neutralen Bedingungen besteht in der Praxis infolge verlängerter Aufschlagezeiten die Gefahr des Erreichens der Kapazitätsgrenzen des Pulpers (ACKERMANN et al., 1999 b; SÜSS et al., 1995). Bei ungenügender Auflösung droht das Verstopfen der Sortierelemente (GÖTTSCHEG und PAKARINEN, 2000; SCHMID und SCHWINGER, 1994). Nach Flotation erhält man niedrigere Ausbeuten an Gutstoff. Die Aschegehalte fallen ebenfalls niedriger aus (ACKERMANN et al., 1999 b; RØRING und HAYNES, 1998). Der Hauptnachteil des Verfahrens liegt jedoch in den nach Flotation häufig beobachteten niedrigeren Weißgraden, die zum Teil auch nach einer abschließenden Bleiche hinter den Werten einer herkömmlichen alkalischen Fahrweise zurückliegen (ROSATZIN et al., 2000; ACKERMANN et al., 1999 b; BEN et al., 1999; RØRING und HAYNES, 1998; HANECKER und WELT, 1995; SÜSS et al., 1995). Für dieses Ergebnis werden die schlechtere Druckfarbenablösung und -austragung verantwortlich gemacht.

Eine Untersuchung erscheint daher sinnvoll, ob mit Hilfe von Enzymen die Ablösung und Entfernung von Druckfarben im Neutralverfahren verbessert werden kann.

Interessant ist mit Hinblick auf den Einsatz des verwendeten Sammlers die Arbeit von ACKERMANN et al. (1997), in der von einer umfangreichen Studie berichtet wird, in der verschiedene ionische und nichtionische tensidische Sammler und Dispergatoren hinsichtlich ihrer Eignung für das Flotationsdeinking getestet wurden. Seifen, die in Mitteleuropa den mengenmäßig wichtigsten Tensidtyp repräsentieren, führen dabei unabhängig von den pH-Verhältnissen während der Zerkleinerung zu den besten Flotationsergebnissen (ACKERMANN et al., 1999 b), wenn auch mit der Verwendung von Seifen eine Erhöhung der Schmutzpunktfläche im Deinkingstoff

einhergeht. Aus der betrieblichen Praxis ist bekannt, dass Versuche zum Austausch von Seifen gegen ein Alternativtensid im Langzeitversuch zu unbefriedigenden Ergebnissen führen.

## 2.2 Vergilbung

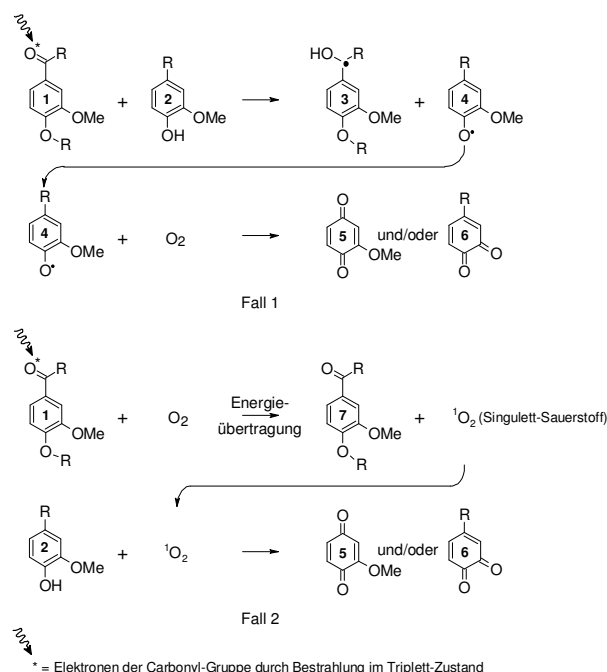
Im Verlauf der vorliegenden Untersuchung werden Verfärbungen beobachtet, die an Vergilbungsreaktionen erinnern. Daher wird an dieser Stelle auf dieses Thema eingegangen. Die irreversible Vergilbung von Faserstoffen ist ein bekanntes Phänomen, wenn sie Tageslicht, höheren Temperaturen oder dem Einfluss von Alkali ausgesetzt werden. Die Anwesenheit von Übergangsmetallionen unterstützt dabei die Verfärbungsreaktionen (ALLISON und GRAHAM, 1990; JANSON, 1993; GRATZL, 1985).

Im Falle der lichtinduzierten Vergilbung holzhaltiger Faserstoffe werden phenolische Strukturen in Gegenwart von Sauerstoff zu farbigen Chinonen oxidiert (LEARY, 1994; HEITNER und SCHMIDT, 1991). In anschließenden Reaktionen können diese komplexe Chromophore bilden und dabei ihren Chinoncharakter verlieren (ARGYROPOULOS et al., 1995). Neben Chinonen können auch Stilbenstrukturen an der Chromophorenbildung beteiligt sein (BEYER et al., 1995; ZHANG und GELLERSTEDT, 1994; SJÖHOLM et al., 1992).

Von zentraler Bedeutung für die Verfärbungsreaktionen sind Phenoxyradikale (HEITNER und SCHMIDT, 1991), die auf unterschiedlichen Wegen entstehen und zu farbigen Chinonen weiterreagieren können.

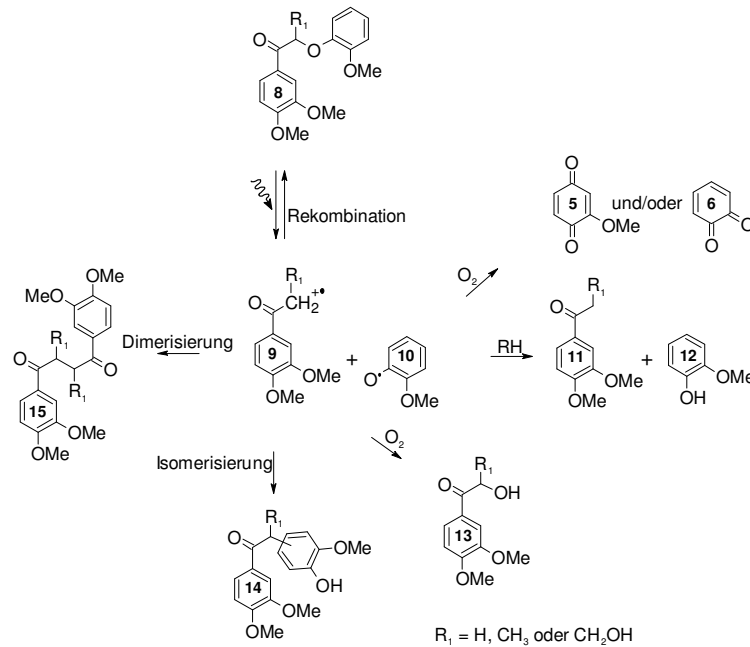
Konjugierte phenolische Gruppen absorbieren direkt Licht aus dem nahen UV-Bereich und gehen in den Radikalzustand über (HEITNER und SCHMIDT, 1991).

Aromatische  $\alpha$ -Carbonylgruppen beschleunigen auf Grund ihrer photosensibilisierenden Wirkung die Bildung von Phenoxyradikalen und damit den Eintritt von Vergilbungsreaktionen (HEITNER und SCHMIDT, 1991). Befindet sich die  $\alpha$ -Carbonylgruppe nach Absorption von UV-Licht im angeregten Zustand (Triplettzustand), so kann sie (Fall 1, Abb. 2.2) durch H-Abstraktion von phenolischen Substraten Phenoxyradikale bilden oder aber (Fall 2) die Energie auf molekularen Sauerstoff übertragen, der dann als energiereicher Singulett-Sauerstoff vorliegt und die H-Abstraktion bewirkt.



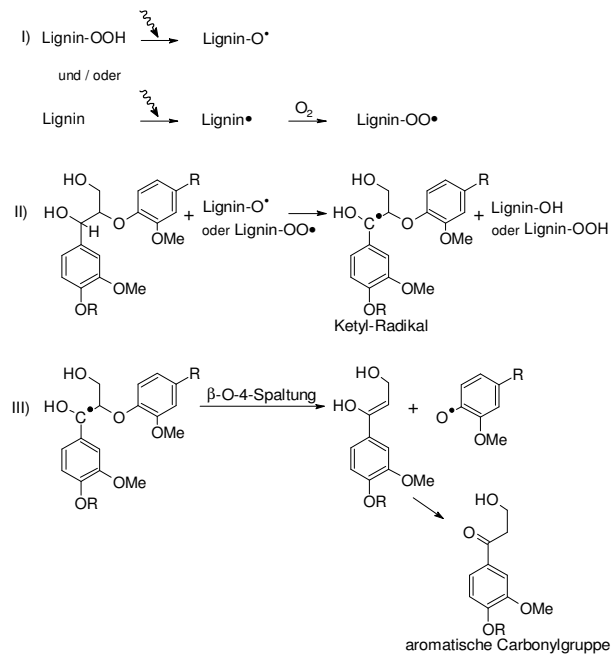
**Abb. 2.2:**  $\alpha$ -Carbonylgruppen als Sensibilatoren der Phenoxyradikal-Bildung (nach HEITNER und SCHMIDT, 1991)

Eine weitere Quelle für Phenoxyradikale stellen nichtphenolische Phenacyl-Aryl-Ether dar. GIERER und LIN (1972) beobachten an Modellverbindungen die lichtinduzierte  $\beta$ -O-4-Spaltung des mit einer Ketogruppe am C $\alpha$ -Atom versehenen nichtphenolischen Substrates. Dabei können die entstehenden Radikale auf unterschiedliche Weise weiterreagieren (Abb. 2.3). Das Radikalpaar (**9**, **10**) kann rekombinieren, unter H-Abstraktion phenolischer Bestandteile aus der Ligninmatrix zu Guaiacol (**11**) und Ketonen (**12**) abreagieren oder isomerisieren (**14**). Die Entstehung farbiger Chinone (**5,6**) wird auf die Reaktion von Phenoxyradikalen (**10**) mit Luftsauerstoff zurückgeführt. Das Phenacylradikal (**9**) kann Ketole (**13**) bilden oder dimerisieren (**15**).



**Abb. 2.3:** Phenacyl-Aryl-Ether als Quelle der Phenoxyradikal-Bildung nach GIERER und LIN (1972) aus HEITNER und SCHMIDT (1991)

Als Hauptweg der Phenoxyradikalbildung wird der sog. Ketylweg angesehen (Abb. 2.4), der die  $\beta$ -O-4-Spaltung nichtphenolischer Arylglycerol  $\beta$ -Arylether-Strukturen beschreibt (SCHMIDT und HEITNER, 1993). Der Abbau erfolgt über das entsprechende Ketylradikal. Nach Spaltung der Ligninstruktur entstehen direkt Phenoxyradikale, die zu Chinonen weiterreagieren. Der Ketylweg erklärt gleichzeitig die mit der Vergilbung zu beobachtende Zunahme aromatischer Carbonyle. Das gleichzeitig gebildete Enol tautomerisiert zum entsprechenden Acetophenon. Dadurch kann die mit der Vergilbung beobachtbare Zunahme aromatischer Carbonyle erklärt werden.



**Abb. 2.4:** Photochemischer Abbau nichtphenolischer Arylglycerol  $\beta$ -Arylether-Strukturen (Ketylweg) nach SCHMIDT und HEITNER, 1993

Bei der wärmeinduzierten Vergilbung weitgehend ligninfreier Faserstoffe laufen oxidative und nichtoxidative Reaktionen am Kohlenhydratgerüst des Zellstoffs ab. Dabei spielen vermutlich Dehydratisierungs- und Kondensationsprozesse eine Rolle, bei denen Aldehyd-, Carbonyl- und Carboxylgruppen gebildet werden, die zur Bildung gefärbter Spaltprodukte beitragen. Oxidative Prozesse schaffen Ausgangspunkte für neue Kondensationsreaktionen. Bei zu hohem Sauerstoffgehalt wirken sie jedoch inhibierend, indem sie die gebildeten Chromophore wieder zerstören (BEYER et al., 1995). Bei ligninhaltigen Faserstoffen überwiegt dagegen der vergilbende Effekt des Ligninanteils. Hier werden ähnliche Mechanismen wie bei der lichtinduzierten Vergilbung vermutet (PAULSSON und RAGAUSKAS, 1998).

Bei der alkaliinduzierten Vergilbung holzhaltiger Faserstoffe spielt wie bei der lichtinduzierten Vergilbung die Bildung von Phenoxylradikalen ebenfalls eine wichtige Rolle (ALLISON und GRAHAM, 1990). Phenole ionisieren bei hohen pH-Werten zu Phenolaten. Reagieren diese anschließend mit Metallionen wie Mangan oder Kupfer, entstehen Phenoxylradikale, die wie im Falle der lichtinduzierten Vergilbung farbige Chinone bilden können. Hohe pH-Werte unterstützen zudem die Kondensation von Chinonen zu höhermolekularen, farbintensiveren Strukturen. Diese Reaktionen werden wiederum durch Metallionen unterstützt.

Von ROBERT und DANEULT (1995) werden die Auswirkungen einer licht-induzierten Vergilbung anhand der ISO-Weißgrade, der Helligkeitswerte  $L^*$  sowie der Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  verschiedener Prüfpapiere dargestellt. Dazu wurden aus Proben von ungebleichtem, natriumborhydrid- und peroxidgebleichtem TMP Prüfpapiere gebildet und die entsprechenden Werte vor und nach einer 65-stündigen Bestrahlung gemessen (Tab. 2.1). Die Vergilbung hat einen deutlichen Abfall des Weißgrades zur Folge, der mit einem Abfall der Helligkeit  $L^*$  und einem Anstieg der Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  einherging. Für den Peroxid-gebleichten TMP z.B. stieg der Farbwert  $a^*$  von -1,01 auf 2,28, während der Farbwert  $b^*$  von 10,91 auf 32,66 anstieg.

**Tab. 2.1:** Weißgrad sowie  $L^*$ ,  $a^*$ - und  $b^*$ -Werte für Prüfpapiere aus TMP (ROBERT und DANEULT, 1995). U-TMP = ungebleichter TMP; B-TMP = natriumborhydridgebleichter TMP; P-TMP = peroxidgebleichter TMP

|                  | Weißgrad [% ISO] | $L^*$ [-] | $a^*$ [-] | $b^*$ [-] |
|------------------|------------------|-----------|-----------|-----------|
| vor Bestrahlung  |                  |           |           |           |
| U-TMP            | 57,67            | 87,27     | 0,50      | 12,21     |
| B-TMP            | 64,06            | 89,14     | 0,02      | 9,40      |
| P-TMP            | 71,37            | 93,61     | -1,01     | 10,91     |
| nach Bestrahlung |                  |           |           |           |
| U-TMP            | 30,83            | 80,90     | 3,24      | 32,62     |
| B-TMP            | 32,94            | 81,09     | 2,00      | 29,91     |
| P-TMP            | 33,46            | 83,10     | 2,28      | 32,66     |

## 2.3 Enzyme

Struktur, Wirkungsweise und Eigenschaften von Enzymen werden in zahlreichen Lehrbüchern und Nachschlagwerken zur Biologie, Biochemie, Pharmazie oder Medizin beschrieben (z.B. DIXON und WEBB, 1965; N.N., 1979; RÖMPP, 1995; KARLSON et al., 1994; STELLMACH, 1988), so dass an dieser Stelle auf Enzyme nur knapp eingegangen werden soll.

Enzyme sind funktionelle Proteine, die von lebenden Zellen produziert werden. Als Proteine sind sie aus Aminosäuren aufgebaut. Ihre Molekulargewichte liegen im Bereich von 10000 bis über eine Million (N.N., 1979). Enzyme setzen als Katalysatoren die Aktivierungsenergie für intra- und extrazelluläre biochemische Reaktionen herab, werden aber durch die Reaktion selbst nicht umgesetzt oder verändert (RÖMPP, 1995). Ihre katalytischen Eigenschaften verdanken sie dem Vorhandensein sog. aktiver Zentren. Dabei handelt es sich um benachbarte Aminosäuresequenzen, die sich durch eine besondere Anordnung von funktionellen

Gruppen auszeichnen (N.N., 1979). Daneben besitzen Enzyme spezifische Bindungsbereiche, an denen das Substrat chelatartig gebunden wird. Enzyme können nur mit Substraten reagieren, wenn deren Moleküle mit der Konformation des Enzyms zusammenpassen (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Dann kann das Enzym mit dem Substrat über eine Zwischenverbindung, dem Enzym-Substrat-Komplex reagieren und das Reaktionsprodukt des Substrates bilden. Proteinenzyme bestehen aus reinem Protein. Proteidenzyme setzen sich aus einem Proteinanteil (Apoenzym) und Cofaktoren zum funktionsfähigen Holoenzym zusammen. Bei Cofaktoren kann es sich um kovalent gebundene (prothetische) Gruppen und/oder durch Nebervalenzen gebundene Coenzyme, Metall-Ionen oder Effektoren handeln (RÖMPP, 1995).

Enzyme arbeiten in der Regel wirkungs- (beschränkt auf einen Reaktionstyp) und substratspezifisch (beschränkt auf ein bestimmtes Substrat). Voraussetzung dafür ist eine intakte räumliche Struktur der Enzymmoleküle. Physikalische (Temperatur, ionisierende Strahlung, Druck, Licht) und chemische Faktoren (Säuren, Basen, org. Lösungsmittel, Oxidationsmittel, Tenside) können diese jedoch verändern (denaturieren) und reversibel oder irreversibel zum Verlust der katalytischen Funktion führen. Effektoren beeinflussen als Aktivatoren oder Inhibitoren (Hemmstoffe) die Enzymaktivität. Im Fall der kompetitiven Hemmung wird das aktive Zentrum des Enzyms durch ein dem Substrat ähnliches Molekül an Stelle des vorhandenen Substrates ganz oder zeitweise blockiert. Beim allosterischen Effekt reagieren Moleküle (Effektoren) nicht im Bereich des aktiven Zentrums, sondern an anderer Stelle mit dem Enzym und beeinflussen über dessen Konformation als allosterische Aktivatoren oder Inhibitoren die enzymatische Aktivität. Im Fall der Inaktivierung spricht man von allosterischer (nichtkompetitiver) Hemmung. Bei der unkompetitiven Hemmung lagert sich der Inhibitor an den Enzym-Substrat-Komplex an. Bei der Endprodukthemmung mindert das Reaktionsprodukt den Substratumsatz. Bei der Substrathemmung wirken hohe Substratkonzentrationen hemmend, indem sich die Substratmoleküle gegenseitig beim Erreichen des aktiven Zentrums behindern (RÖMPP, 1995).

Zur Beschreibung der enzymatischen Tätigkeit wird gemäß der IUPAC/IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry / International Union of Biochemistry) die sog. Enzymaktivität in Units (U oder IU) angegeben. Sie beschreibt die Enzymmenge, die pro Minute ein mmol Substrat umsetzt. Alternativ beschreibt die Einheit Katal (kat) die Enzymmenge, die ein mol Substrat pro Sekunde umsetzt ( $1 \text{ kat} = 6 \cdot 10^7 \text{ U}$ ;  $1 \text{ U} = 16,67 \text{ nkat}$ ). Die spezifische Aktivität bezieht die Aktivität auf die beteiligte Enzymproteinmenge am gesamten Protein eines Enzympräparates (RÖMPP, 1995).

Die Bezeichnung von Enzymen erfolgt nach den Regeln der von der Commission of Enzymes der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) und der International Union of Biochemistry (IUB) aufgestellten Klassifizierung, der sog. „Enzyme Nomenclature“ (NC-IUBMB, 1992). Sie ordnet jedem Enzym einen Trivialnamen (Pepsin, Laccase) und einen systematischen Namen zu. Vereinfachend zusammengefasst beinhaltet der systematische Name den Substratnamen (wobei Wasser nicht genannt wird), die jeweils katalysierte Reaktion (die der Enzymklasse bzw. einer Unterklasse entspricht) und endet auf –ase. Zum Beispiel lautet der systematische Name der Oxidoreduktase Laccase: Benzendiol:oxygen oxidoreductase (RÖMPP, 1995).

Die von der IUPAC / IUB aufgestellte Klassifizierung teilt alle Enzyme in 6 Hauptklassen auf (Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen, Ligasen; Laccase gehört in die Hauptklasse 1: Oxidoreduktasen). Jedes Enzym erhält eine Schlüsselzahl (EC-Nr.), die mit „EC“ beginnt und sich aus vier, durch Punkte voneinander getrennte Zahlen zusammensetzt. Die Zahlen bezeichnen die Hauptklasse, 1. u. 2. Unterklasse und eine laufende Nummer. Z.B. lautet die EC-Nummer für Laccase EC 1.10.3.2. Unterschiedliche Proteine eines Organismus, die dieselbe Reaktion katalysieren und dieselbe EC-Nummer haben, werden multiple Enzymformen genannt. Werden sie von verschiedenen Genen erzeugt, spricht man von Isoenzymen oder Isozymen (RÖMPP, 1995).

## 2.4 Laccase und das Laccase-Mediator-System

### 2.4.1 Laccase

Das Enzym Laccase [EC 1.10.3.2; p-diphenol:dioxygen oxidoreductase] zählt zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen. Es wird mit den Enzymen L-Ascorbatoxidase [E.C. 1.10.3.3] und Cäruloplasmin [EC 1.16.3.1] zur Gruppe der sog. blauen Kupferproteine ("blue copper oxidases" oder "multicopper oxidases") zusammengefasst (MESSERSCHMIDT und HUBER, 1990; REINHAMMAR und MALMSTRÖM, 1981). Neuere Studien ordnen auch die Enzyme Phenoxazinon-Synthase, Bilirubin-Oxidase [EC 1.3.3.5], Dihydrogeodin-Oxidase, Sulochrin-Oxidase [EC 2.10.3.8] und FET3 in diese Gruppe ein (SOLOMON et al, 1996).

Laccasen kommen in einer Vielzahl von Organismen vor, wie Bakterien (ARIAS et al., 2003; FAURÉ et al., 1994; SALAS et al., 1996), Pilze (SBAGHI et al., 1996), Pflanzen (O'MALLEY et al., 1993) oder Insekten (ANDERSEN, 1985), wo sie unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Die bakterielle Laccase von *Cryptococcus neoformans* unterstützt beispielsweise die Oxidation von Dihydroxyphenylalanin zu melaninähnlichen Pigmenten (SALAS et al., 1996). Laccasen von Insekten sind an der Chitinbiosynthese (ANDERSEN, 1985), pflanzliche Laccasen an der Ligninbiosynthese (O'MALLEY et al., 1993) beteiligt. Pilzliche Laccasen finden sich in Asco- (LITVINTSEVA und HENSON, 2002; KURTZ und CHAMPE, 1982), Deutero- (ZOUARI et al., 1987) und vor allem Basidiomyceten. Sie dienen zur Pigmentbildung durch Polymerisierung von Melaninvorstufen zu hochmolekularem Melanin (LITVINTSEVA und HENSON, 2002; KURTZ und CHAMPE, 1982), zur Aushärtung des Zellverbandes von Fruchtkörpern (LEATHAM und STAHMANN, 1981), zur Bildung von Abwehrstoffen gegen Bakterien (EGGERT, 1997), zum Abbau von Huminsäuren (CHEFETZ et al., 1998; SCHEEL et al., 1999) oder zum Ligninabbau (ANDER und ERIKSSON, 1976; KIRK und FARRELL, 1987).

Laccasen katalysieren Redoxreaktionen, bei denen mit der Substratumsetzung Sauerstoff in einer 4-Elektronen-Reduktion zu Wasser reduziert wird. Die Umsetzung des Substrates erfolgt als Ein-Elektron-Oxidation. Es sind also vier Ein-Elektronen-Oxidationen an Substratmolekülen notwendig, um ein Sauerstoffmolekül zu zwei Molekülen Wasser zu reduzieren (REINHAMMAR und MALMSTRÖM, 1981; SOLOMON und LOWERY, 1993; YOUN et al., 1995 a).

Dazu besitzen Laccasen ein komplex aufgebautes aktives Zentrum, das aus drei verschiedenen Proteinstrukturen besteht, die Kupferatome enthalten. Diese Kupfer-Proteine werden in der Fachliteratur unterschiedlich bezeichnet (Tab. 2.2).

**Tab. 2.2:** Bezeichnungen der Kupfer-Proteine von Laccase

| Bezeichnungen |        |          |                     | Anzahl Cu-Atome |
|---------------|--------|----------|---------------------|-----------------|
| T1            | type 1 | copper 1 | blue copper site    | 1               |
| T2            | type 2 | copper 2 | normal copper site  | 1               |
| T3            | type 3 | copper 3 | coppled copper site | 2               |

Die Kupferzentren T2 und T3 werden auch als T2/T3- bzw. type2/type3-trinuclear cluster zusammengefasst. XU (2001) fasst die vermuteten Funktionen zusammen: Das T1-Kupferzentrum lagert sich an das zu oxidierende Substrat an und übernimmt ein Elektron des Substrates. Das Elektron wird intern an den T2/T3-trinuclear cluster übertragen. Dort erfolgt die Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser. Einen detaillierten Überblick über Aufbau und Funktion des aktiven Zentrums der Laccase liefern SOLOMON und LOWERY (1993), SOLOMON et al. (1996) oder POTTHAST (1998).

Als Substrate für Laccase kommen verschiedene organische Substanzen in Frage. Dazu zählen o- und p-Diphenole, Aminophenole, Polyphenole, methoxy-substituierte Phenole, Polyamine, Aryldiamine, phenolische Lignineinheiten und einige anorganische Ionen (THURSTON, 1994; YAROPOLOV et al., 1994). Bei der Ein-Elektronen-Oxidation phenolischer Substrate entstehen unter H-Abstraktion Phenoxyradikale, die niedermolekulare Abbauprodukte bilden oder zu höher-molekularen Polymeren reagieren können (GEIGER et al., 1986 b; KAWAI et al., 1987; HIGUCHI 1990). Nichtphenolische (veretherte) Lignineinheiten können von Laccase alleine nicht angegriffen werden.

Das große Substratspektrum der Laccasen ist für Enzyme untypisch. Dies liegt am vermuteten Fehlen einer Bindungstasche für das Substrat (SOLOMON et al., 1996) bzw. an ihrer flachen Ausführung (XU, 1996 b), so dass die Geschwindigkeit der Substratumsetzung im Wesentlichen von der Redoxpotentialdifferenz zwischen Laccase und Substrat abhängt.

Unter den Substraten gibt es solche, die nur eine Ein-Elektronen-Oxidation erfahren (z.B. ABTS oder Phenothiazine, vergl. Kap. 2.4.2.2) und andere, die unter H-Abstraktion und Ein-Elektronen-Oxidation reagieren (Phenole). Dies hat Bedeutung für die pH-abhängige Geschwindigkeit der durch Laccase katalysierten Reaktionen (XU, 1997). Bei Substraten mit reiner Ein-Elektronen-Oxidation ist der optimale pH-Wert von der Laccase abhängig. Deren Oxidationspotential am T1 bleibt zwar im pH-

Bereich von pH 2,7 bis 11 in etwa unverändert, doch wird das Enzym mit Zunahme des pH-Wertes in steigendem Maße durch Hydroxylionen am T2/T3 inhibiert. Substrate mit H-Abstraktion und Ein-Elektron-Übertragung, z.B. Phenole, können dagegen mit steigendem pH-Wert leichter oxidiert werden, da ihr Redoxpotential sinkt. In diesem Fall resultiert der optimale pH-Wert für die Reaktionsgeschwindigkeit aus dem Ausmaß der pH-Wert-abhängigen Inhibierung der Laccase und der pH-Wert-abhängigen Oxidierbarkeit des Phenols.

Laccasen unterscheiden sich je nach Herkunft in ihren Eigenschaften. Pflanzenlaccasen besitzen Molekulargewichte im Bereich von 90-130 kDa (SOLOMON et al., 1996). Die meisten pilzlichen Laccasen besitzen geringere Molgewichte, die bei 55 bis 65 kDa bzw. 55 bis 90 kDa liegen (HATAKKA, 1994; PETER und WOLLENBERGER, 1997), doch können auch höhere Molgewichte erreicht werden (SOLOMON et al., 1996). Strukturelle Unterschiede zwischen Laccasen verschiedener Herkünfte können mit Hilfe des isoelektrischen Punktes aufgezeigt werden, da dessen für Proteine (Enzyme) charakteristische Lage von der Anzahl der sauren und basischen Gruppen und deren Lage im Molekül beeinflusst wird (RÖMPP, 1995). DRIOUICH et al. (1992) geben für den isoelektrischen Punkt zweier Laccasen aus Bergahorn (*Acer pseudoplatanus*) den Bereich von pH 3,8 bis 5,3 an, BAO et al. (1993) für eine Laccase von *Pinus taeda* einen pH-Wert von 9. Isoelektrische Punkte pilzlicher Laccasen liegen im Bereich von pH 2,6 bis 5,2, die meisten bei pH 2,9 bis 3,5 (GIGI et al., 1981; GEIGER et al., 1986 a; SANNIA et al., 1986; ZOUARI, et al., 1987; HATAKKA, 1994; EGGERT et al., 1996; SCHNEIDER et al., 1999; DE LA RUBIA, et al., 2002; SAPARRAT et al., 2002). Die Höhe des Redoxpotentials begrenzt die Breite des Substratspektrums der Laccasen. Entscheidend ist dabei die Redoxpotentialdifferenz zwischen dem T1-Kupferzentrum der Laccase und dem Substrat (XU, 1996 b). Pflanzenlaccasen besitzen mit ihrem im Allgemeinen niedrigeren elektrochemischen Potential ein kleineres Substratspektrum als Pilzlaccasen. Doch können auch zwischen pilzlichen Laccasen große Eigenschaftsunterschiede beobachtet werden. Zwar besitzen viele Laccasen von Pilzen ein Redoxpotential im Bereich von 0,7 bis 0,8 Volt und damit ein um 0,3 Volt höheres als Laccasen von Pflanzen, doch sind auch pilzliche Laccasen bekannt, deren Redoxpotential lediglich im Bereich von 0,5 Volt liegt (XU et al., 1996). Auch innerhalb eines Organismus können verschiedene Laccasen vorkommen. So finden ZOUARI et al. (1987) beim Deuteromyceten *Botrytis cinerea* verschiedene Isoenzyme, die sich bezüglich des isoelektrischen Punktes, des Zuckergehaltes und der Temperaturstabilität unterscheiden. Bei *Trametes versicolor* sind drei verschiedene Laccasen bekannt (MOROHOSHI et al.; 1987). *Trametes villosa* (YAYER und GOLIGHTLY, 1996; YAYER et al., 1996) und *Pleurotus ostreatus* (YOUN et al., 1995 a) besitzen ebenfalls multiple Laccaseformen.

Intensiv untersucht wurden Laccasen pflanzlichen und pilzlichen Ursprungs. Bei Pflanzen spielen Laccasen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Erzeugung von Ligninvorstufen während der Lignifizierung der Zellwand, indem sie Monolignole zu Dimeren und Polymeren höherer Ordnung oxidativ verknüpfen (O'MALLEY et al., 1993). Doch ist es bisher noch nicht gelungen, den pflanzenphysiologischen Reaktionsmechanismus darzustellen.

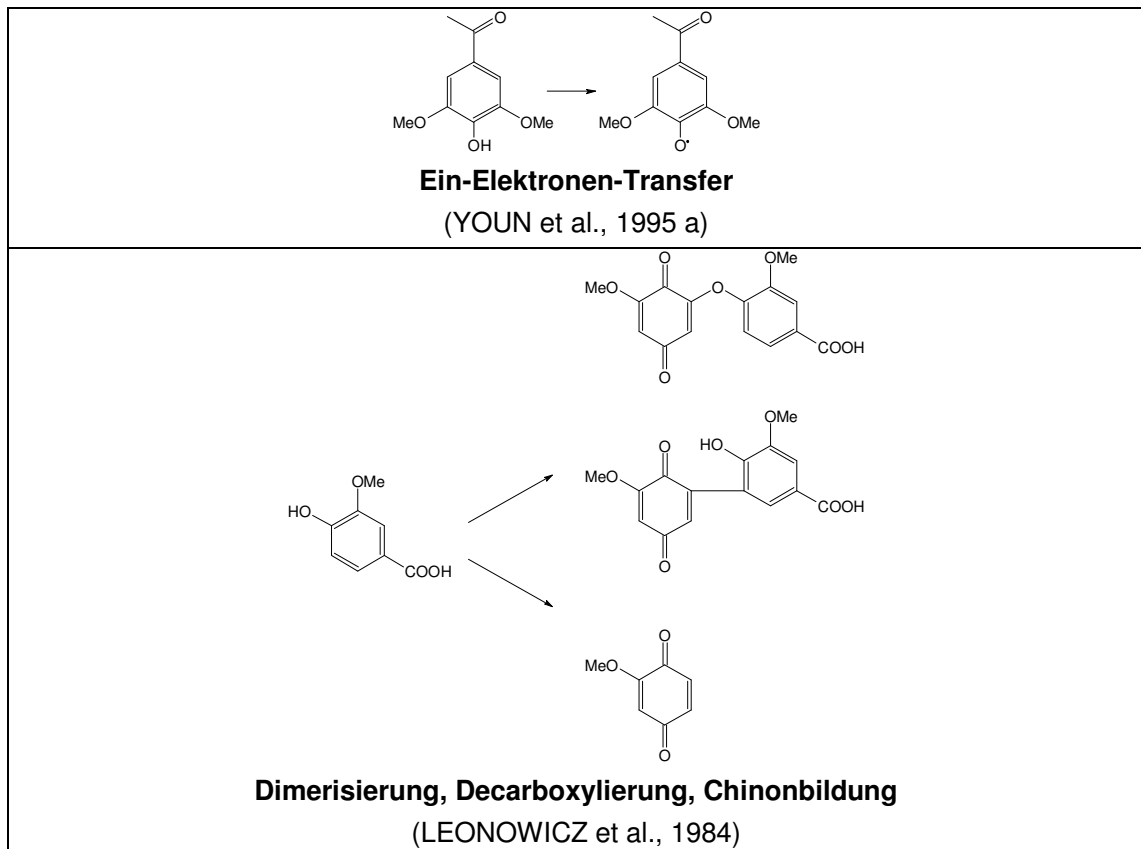
Weit verbreitet sind Laccasen bei holzabbauenden Weißfäulepilzen (HATAKKA, 1994; SRINIVASAN et al., 1995). In Kombination mit anderen Enzymen beteiligen sie sich am Ligninabbau von Holz (ANDER und ERIKSSON, 1976; KIRK und FARRELL, 1987; LEONOWICZ et al., 1999). Wie bei Pflanzen ist die genaue Rolle von Laccase bei der pilzlichen Delignifizierung noch nicht aufgeklärt (HATAKKA, 1994). Untersuchungen mit aus Weißfäulepilzen isolierten Laccasen zeigen, dass das Enzym phenolische Substrate in verschiedener Richtung verändert. Polymerisation und Depolymerisation werden beobachtet, wobei die Polymerisationsreaktion überwiegt (GEIGER et al., 1986 b; HÜTTERMANN et al., 1980; ISHIHARA und MIYAZAKI, 1972; KAWAI et al., 1987; LEONOWICZ et al., 1985; THURSTON, 1994). LEONOWICZ et al. (1985) beobachten dabei an fraktionierten Lignosulfonaten, dass hochmolekulare Substratmoleküle bevorzugt abgebaut werden, wogegen die niedermolekularen vorwiegend polymerisieren. NUTSUBIZDE et al. (1998) vermuten, dass für die depolymerisierende Wirkung nicht das Enzym Laccase, sondern ein weiteres Enzym, eine sog. „Depolymerase“, verantwortlich ist. Sie beobachten bei ihren *in vivo*-Versuchen mit dem Laccase aber nicht MnP oder LiP produzierenden Pilz *Trametes cingulata* die hintereinander abfolgende Polymerisation und Depolymerisation von Lignin, wobei sie die polymerisierende Wirkung einer Laccase und die depolymerisierende Wirkung einer zweiten Oxidase („Depolymerase“) zuordnen, die vom Pilz erst in einer späteren Wachstumsphase produziert wird. Dieses Enzym zeigt laccaseähnliche Eigenschaften, kann aber nicht näher charakterisiert werden, da es außerhalb der lebenden Pilzzelle nicht stabil ist.

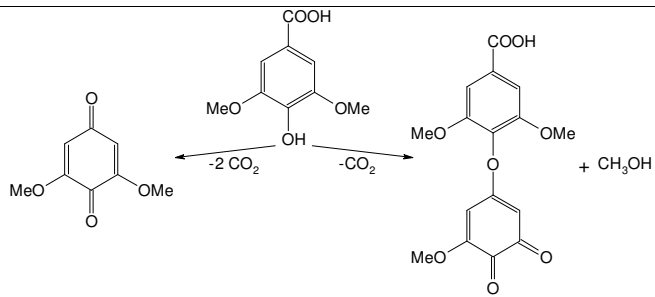
Mit der Entdeckung des Laccase-Mediator-Systems durch BOURBONNAIS und PAICE (1990) kommt als weiterer Erklärungsansatz das Vorhandensein natürlicher Mediatoren im lebenden Pilz hinzu (zum Begriff Mediator vergl. Kap. 2.4.2). Die polymerisierende Wirkung isolierter Laccase *in vitro* kann in diesem Fall mit dem Fehlen des Mediators im Laccasepräparat oder mit dem Nichtfunktionieren des Mediators unter Laborbedingungen erklärt werden. POTTHAST (1998) konnte mit Laccase in Verbindung mit dem synthetischen Mediator ABTS und monomerer Phenole als Substrat die zeitliche Abfolge von Polymerisation und Depolymerisation beobachten. Dabei handelt es sich bei der Polymerisationsreaktion der Monophenole um eine rasch ablaufende Reaktion, die mit Hilfe der MALDI-TOF MS-

Technik (matrix assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectroscopy) zu Beginn der Reaktion gut zu beobachten ist. Die Depolymerisierungsreaktion der Polyphenole läuft deutlich langsamer ab und tritt dann in den Vordergrund, wenn die Aufbaureaktion durch Verbrauch der Monomere an Geschwindigkeit verloren hat. Damit ist die Konzentration zweier Substrate (Monomere und Oligomere) ausschlaggebend für die Reaktion (Polymerisation und Depolymerisation) und die zu erhaltenden Reaktionsprodukte.

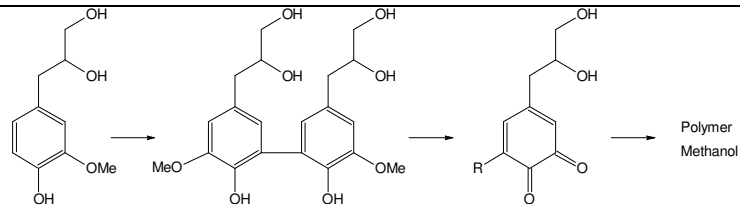
Wie bereits erwähnt, zeigen Untersuchungen an Lignin-Modellsubstanzen, dass das Enzym Laccase alleine nicht in der Lage ist, nichtphenolische Substrate abzubauen. Das Substratspektrum beschränkt sich auf phenolische Ligninbausteine. Durch den enzymatischen Angriff entstehen Phenoxyradikale, die in nichtenzymatischen Folgereaktionen polymerisieren oder - z.T. unter Beteiligung von molekularem Sauerstoff - Abbauprodukte bilden können (HIGUCHI, 1990; KAWAI et al., 1988 a). Als Abbaureaktionen sind Alkyl-Aryl-Spaltungen,  $C_\alpha$ -Oxidationen und  $C_\alpha$ - $C_\beta$ -Spaltungen sowie Decarboxylierung, Demethylierung, benzyliche Oxidationen, Oxidationen von Doppelbindungen, Hydroxylierung und Ringöffnungsreaktionen bekannt (vergl. Tab. 2.4).

**Tab. 2.4:** Beispiele für Reaktionen von Laccase mit Modellverbindungen

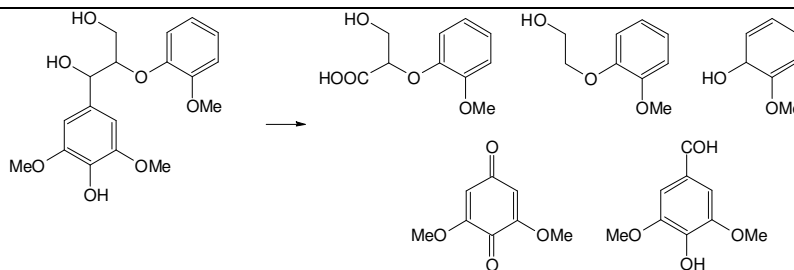




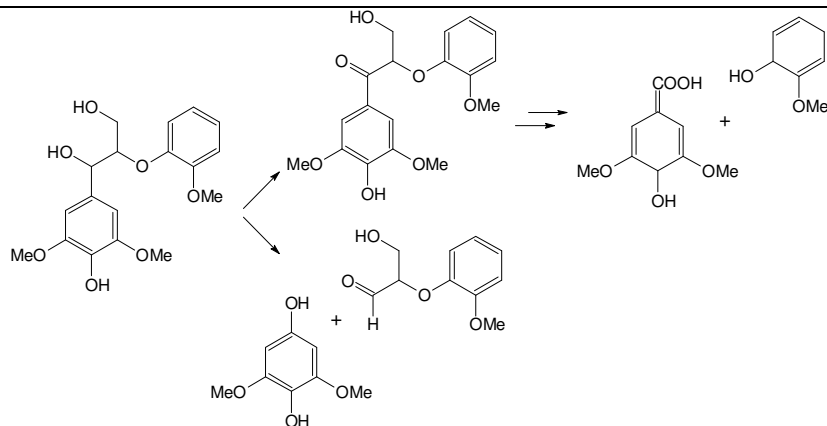
**Polymerisierung, Oxidative Decarboxylierung, Demethylierung, Chinonbildung**  
(ISHIHARA und ISHIHARA, 1976)



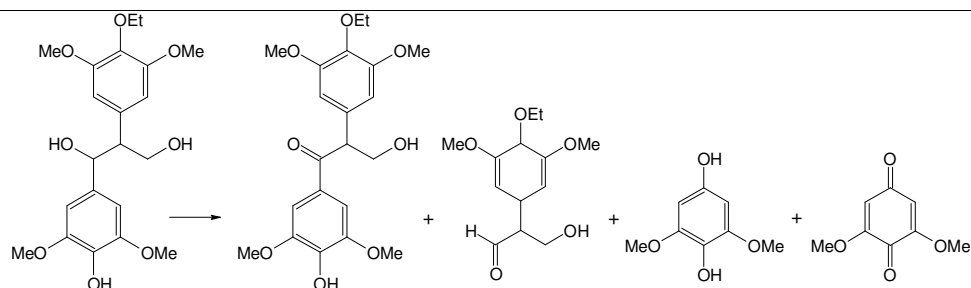
**Polymerisation, Demethylierung**  
(LUNDQUIST und KRISTERSSON, 1985)



**Depolymerisation, Aryl-Alkyl-Spaltung, C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ -Spaltung,  $\beta$ -O-4-Spaltung, Chinonbildung** (WARIISHI et al., 1987)

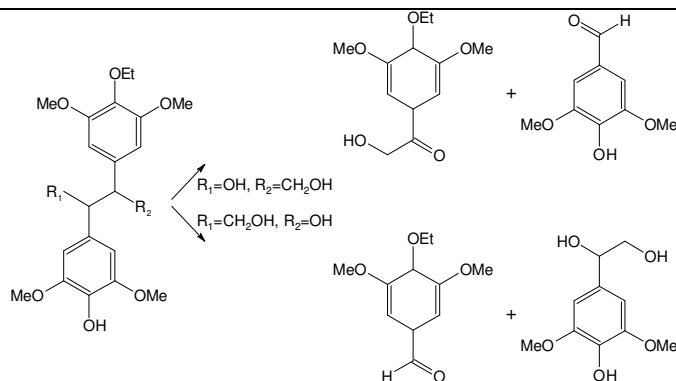


**Depolymerisation, C $_{\alpha}$ -Oxidation, Aryl-Alkyl-Spaltung, C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ -Spaltung**  
(HIGUCHI, 1990)



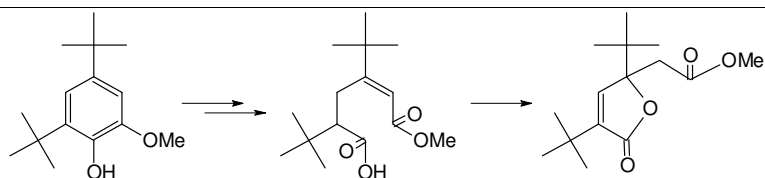
### Depolymerisation, C<sub>α</sub>-Oxidation, Aryl-Alkyl-Spaltung, Chinonbildung

(HIGUCHI, 1990; KAWAI et al., 1988 b; KAWAI et al., 1987)



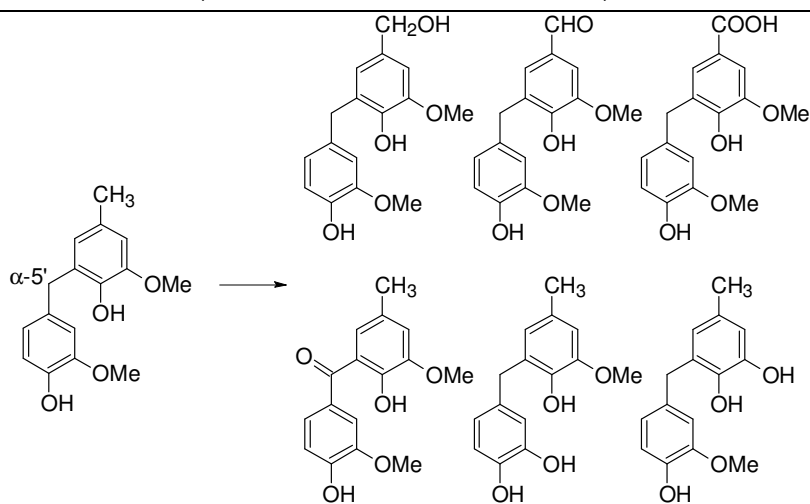
### Depolymerisation, C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub>-Spaltung

(HIGUCHI, 1990; KAWAI et al., 1988 b; KAWAI et al., 1987)



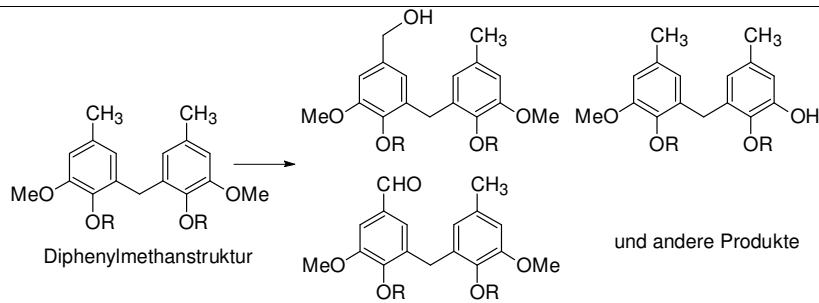
### Oxidation, Öffnung des aromatischen Rings

(HIGUCHI, 1990; KAWAI, 1988 a)



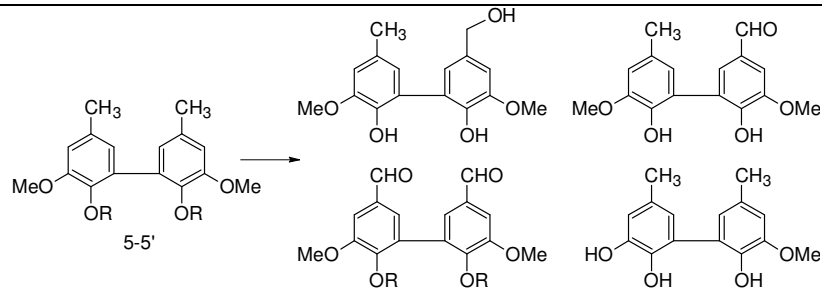
### Benzyliche Oxidation, Demethylierung

(CRESTINI und ARGYROPOULOS, 1997)



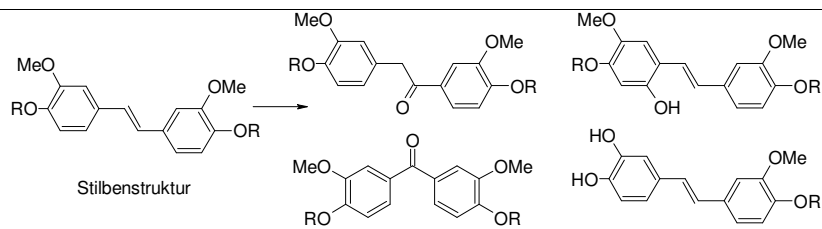
### Benzyliche Oxidation, Demethylierung

(CRESTINI und ARGYROPOULOS, 1997)



### Benzyliche Oxidation, Demethylierung

(CRESTINI und ARGYROPOULOS, 1997)



### Hydroxylierung\*, Oxidierung der Doppelbindung\*

(CRESTINI und ARGYROPOULOS, 1997)

\*mit R=H: ABTS, HBT verstärkt Wirkung

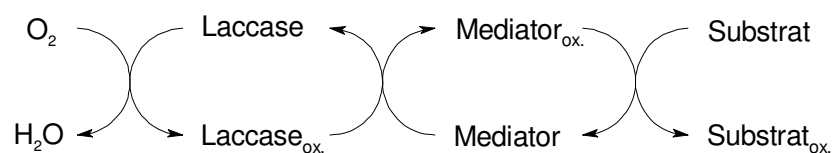
\*mit R=CH<sub>3</sub>: ABTS, HBT ohne nenneswerte Wirkung

## 2.4.2 Laccase-Mediator-System

### 2.4.2.1 Allgemeine Übersicht

Der kombinierte Einsatz von Laccase mit sog. Mediatoren (speziellen Katalysatoren) ermöglicht eine Erweiterung des Substratspektrums von phenolischen auf nichtphenolische, veretherte Einheiten. So können BOURBONNAIS und PAICE (1990) mit Hilfe von Laccase und ABTS die Oxidation nichtphenolischer Ligninmodellbausteine nachweisen. Weiterführende Arbeiten (BOURBONNAIS und PAICE, 1992 und BOURBONNAIS et al., 1995; CALL und MÜCKE, 1994) zeigen, dass mit Hilfe der Kombination von Laccase, Sauerstoff und Mediator im sog. „Laccase-Mediator-System“ Sulfatzellstoff effektiv delignifiziert werden kann. Dies war bis dahin mit isolierter Laccase alleine nicht möglich. Die Erweiterung des Substratspektrums wird damit erklärt, dass durch Verwendung des Mediators Substanzen angegriffen werden können, die dem aktiven Zentrum der Laccase nicht zugänglich sind. Dies erfolgt einerseits dadurch, dass das relativ kleine Mediatormolekül Reaktionsorte erreichen kann, die dem voluminösen Laccasemolekül nicht zugänglich sind und andererseits dadurch, dass durch die chemischen Eigenschaften der Mediatoren neue Reaktionsmechanismen bei der enzymatischen Substratumsetzung genutzt werden können.

Der in der Literatur für das Laccase-Mediator-System allgemein akzeptierte Reaktionsmechanismus kann wie in Abb. 2.5 in vereinfachter und idealisierter Form als Redoxkaskade dargestellt werden (PAICE et al., 1999). Sauerstoff wird im aktiven Zentrum der Laccase in einer Vier-Elektronen-Reduktion zu Wasser reduziert. Die dazu notwendigen Elektronen stammen von Mediatormolekülen, die gleichzeitig vom Enzym (durch Ein-Elektronen-Abstraktion) oxidiert werden. Bei der Anwendung zur Zellstoffbleiche muss der oxidierte Mediator solange stabil bleiben, dass er in die Zellwand eindringen und dort das Lignin oxidieren, d.h. depolymerisieren kann. Der stark oxidierende Mediator ist also das eigentliche Agens, das im Gegensatz zum voluminösen Laccasemolekül durch die Faserporen diffundiert.



**Abb. 2.5:** Vereinfachte Redoxkaskade der Delignifizierung mit dem LMS-System nach PAICE et al., 1999

In diesem idealisierten Modell sind Sauerstoff und Substrat die einzigen Komponenten, die irreversibel verbraucht werden. Laccase und Mediator scheinen unverändert aus dem Redoxzyklus wieder hervorzugehen. Zudem scheint nur ein bestimmter Reaktionsmechanismus zwischen Laccase, Mediator und Substrat abzulaufen.

Tatsächlich werden in den Untersuchungen zur Reaktionskinetik des LMS verschiedene Reaktionsmechanismen vorgeschlagen, die mehr oder minder weit vom oben dargestellten Modell abweichen und vom gewählten Mediator sowie vom verwendeten Substrat abhängig sind. Häufig wird dabei ein Aktivitätsverlust der Laccase und ein Verbrauch des Mediators beobachtet. Durch die Tatsache, dass sich Laccasepräparate in der Fähigkeit unterscheiden, diverse Reaktionen zu katalysieren (PAICE et al., 1997; KRUUS und VIIKARI, 2001), wird zudem ein direkter Vergleich der Ergebnisse verschiedener Arbeiten zu den Reaktionsmechanismen des komplexen LMS erschwert.

Das Laccase-Mediator-System wird im sauren Milieu (pH 3,5 bis 6,5) bei Temperaturen von 40 bis 65°C und 0,1 bis 1 MPa Sauerstoffdruck angewendet (PAICE et al., 1995 a; CALL und MÜCKE, 1996). Damit liegt der pH-Wert nicht im Bereich typischer Ligninreaktionen bei Holzaufschluss oder Zellstoffbleiche, bei denen im stark sauren oder stark alkalischen Medium gearbeitet wird. Temperatur und Sauerstoffdruck stellen ebenfalls milde Bedingungen dar, unter denen in Abwesenheit von Katalysatoren keine wesentliche Änderung am Ligningerüst eintreten sollte (POTTHAST, 1998). Im Verlauf der Reaktion entstehen alkalilösliche Ligninfragmente. Zur maximalen Absenkung des Ligningehaltes ist daher in Anschluss an die Laccase-Mediator-Behandlung eine alkalische Extraktionsstufe notwendig. Der Begriff „Laccase-Mediator-System“ (LMS) umfasst im Allgemeinen die komplette Abfolge einer Inkubationsphase mit Laccase und Mediator (LM) und einer anschließenden alkalischen Extraktion (E), die auch als aktivierte Extraktionsstufe (E\*) (CHAKAR und RAGAUSKAS, 2000), d.h. als Peroxidbleichstufe (P) oder sauerstoffunterstützte Peroxidbleichstufe (OP) durchgeführt werden kann.

### 2.4.2.2 Mediatoren

Im Zusammenhang mit dem LMS versteht man unter Mediatoren niedermolekulare Substanzen mit elektronenübertragenden Eigenschaften, die als Katalysator wirken. Sie ermöglichen also unter gegebenen Bedingungen Reaktionen, die ansonsten nicht ablaufen würden.

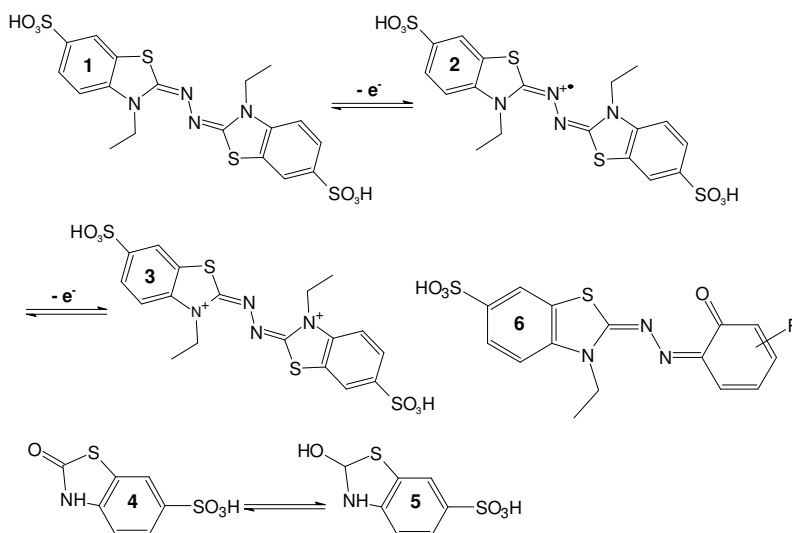
AMANN (1997) formuliert ein Eigenschaftsprofil, das Mediatoren aus anwendungsbezogenen Gesichtspunkten erfüllen müssen. Dies sind Wasserlöslichkeit, niedriges Molgewicht, Befähigung zur Elektronenübertragung, Besitz eines ausreichend hohen Redoxpotenzials für den Substratabbau, Eignung als Substrat für Laccase, keine inhibierende Wirkung auf Laccase, gute biologische Abbaubarkeit und Umweltverträglichkeit, niedriger Preis und Marktverfügbarkeit. Die Forderung nach der Ausbildung eines Radikals als oxidierte Mediatorspezies ist überholt, da z.B. beim Mediator TEMPO das Ion das aktive Agens darstellt. POTTHAST (1998) ergänzt diese Liste mit den Forderungen nach reversiblen Redoxverhalten, dem Ausbleiben toxischer Folgeprodukte und unerwünschter Verfärbungsreaktionen. Bisher ist kein Mediator bekannt, der allen diesen Anforderungen gerecht wird.

#### **ABTS [2,2'-Azino-bis-(3-ethylthiazolin-6-sulfonsäure)]**

ABTS wurde als erster wirkungsvoller Mediator für das LMS von BOURBONNAIS und PAICE (1990) entdeckt (Abb. 2.6). Es wird im LMS schrittweise oxidiert. Zuerst entsteht das Kationradikal  $\text{ABTS}^{+\bullet}$ , nach Entfernung eines weiteren Elektrons das Dikation  $\text{ABTS}^{2+}$  (HÜNIG et al., 1964; SCOTT et al., 1993).

ABTS ist eine weiße Substanz, die in Wasser sehr gut löslich ist. Das Kationradikal ist stark mesomeriestabilisiert und kann als persistent betrachtet werden. Es besitzt eine sehr intensive dunkelblau-grüne Färbung. Das Dikation ist an seiner tief purpurroten Farbe zu erkennen (BOURBONNAIS et al., 1998). ABTS weist ein reversibles Redoxverhalten auf, was eine Anwendung als Mediator in unterstöchiometrischen Mengen ermöglichen sollte (JAKOB et al., 1999). Für die Bleiche von Zellstoff hat ABTS neben dem sehr hohen Preis einen schwerwiegenden Nachteil. Die intensive, blaugrüne Farbe des Kationradikals führt zu verfärbten Zellstoffen (PAICE et al., 1995 a; BOURBONNAIS und PAICE, 1996, NELSON et al., 1998, POTTHAST, 1998). Die dunkle Farbe intensiviert sich mit steigendem Ligningehalt des Zellstoffs, was eine Kopplung von ABTS bzw. ABTS-Bruchstücken an das Lignin vermuten lässt.

POTTHAST (1998) hat das Verfärbungsverhalten von ABTS untersucht. Als Modellschubstanz für Lignin wählte sie dazu 2,6-Dimethylphenol, das im Beisein von Laccase und ABTS zu einer tiefroten Verbindung reagiert. Sowohl durch das ABTS-Kationradikal als auch durch Laccase direkt entstehen aus dem Phenol Phenoxyradikale. In der Folge werden sowohl Spaltprodukte aus dem ABTS-Kationradikal gebildet als auch Kopplungsprodukte aus ABTS-Fragmenten und Phenol. Diese stark gefärbten Kopplungsprodukte von chinoider Struktur sind aufgrund der Sulfonsäuregruppen gut wasserlöslich, können auf die Fasern aufziehen und erklären somit die starken Verfärbungen.



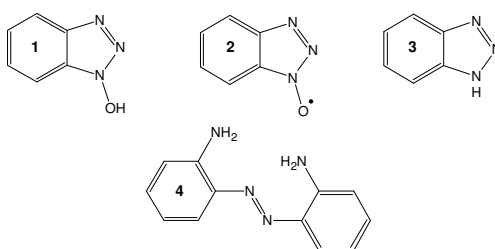
**Abb. 2.6:** ABTS (1), ABTS-Kationradikal ABTS<sup>•+</sup> (2), ABTS-Dikation ABTS<sup>++</sup> (3) ABTS-Abbauprodukte (4,5) sowie Kopplungsprodukt aus ABTS und Phenol (6) (POTTHAST, 1998)

### HBT (HOBT; 1-Hydroxybenzotriazol)

HBT gehört mit ABTS zu den am intensivsten untersuchten und in der technischen Anwendung effektivsten Mediatoren.

HBT ist ein weißes Pulver, das in Wasser schwer löslich ist, aber beispielsweise mit Aceton als Lösungsvermittler in Lösung gebracht werden kann. HBT lässt sich in organischen inerten Lösungsmitteln bei Ausschluss von Luftsauerstoff mit Bleioxid oder *m*-Chlorperbenzoesäure zum Benzotriazolyloxid (BT<sup>•</sup>) oxidieren (AURICH und WEISS, 1973). Dieses Radikal ist im Gegensatz zu ABTS<sup>•+</sup> ungeladen, besitzt eine hohe Reaktivität gegenüber leicht deprotonierbaren Substanzen und ist in protischen Lösungsmitteln sehr instabil, da es sofort unter H-Abstraktion abreagiert (AURICH et al., 1977 a und b).

Unter den Bedingungen des LMS wird im Beisein von Laccase und Sauerstoff ebenfalls das Benzotriazolyloxidradikal gebildet (BOURBONNAIS et al., 1998; POTTHAST, 1998). Dieses ist im LMS mit Laccase und HBT das aktive Agens. Wie bei AURICH ist das Radikal instabil und wird letztendlich irreversibel abgebaut. Es besitzt eine Halbwertszeit von 9 Minuten (POTTHAST, 1998). Das Hauptreaktionsprodukt der Umsetzung von HBT ist 1H-Benzotriazol (BT) (SEALEY und RAGAUSKAS, 1997; POTTHAST und KOCH, 1997; POTTHAST, 1998). Dieses ist als Mediator nicht mehr wirksam. In einer Nebenreaktion wird neben BT ein wasserlöslicher, roter Farbstoff gebildet. Für diesen schlägt POTTHAST (1998) die Struktur 2,2'-Diaminoazobenzen vor (vergl. Abb. 2.7).



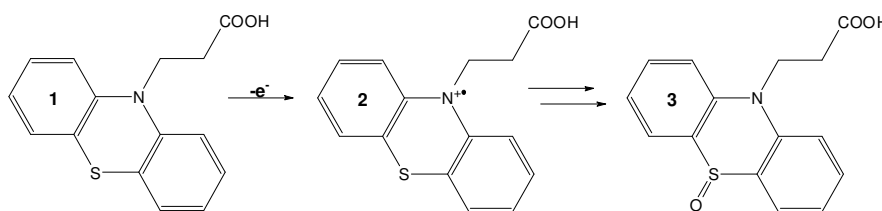
**Abb. 2.7:** HBT (1), Benzotriazolyloxidradikal BT<sup>•</sup> (2), Abbauprodukt 1H-Benzotriazol BT (3) sowie Nebenabbauprodukt 2,2'-Diaminoazobenzen (4) (POTTHAST, 1998)

Beim kombinierten Einsatz von HBT und Laccase kann eine starke Inhibierung des Enzyms beobachtet werden, was vermutlich auf die Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen der aktiven Mediator Komponente und aromatischen Aminosäuren des Laccaseproteins zurückzuführen ist (AMANN, 1997). Dabei wird die N-OH-Bindung des HBT irreversibel gespalten. Zum Teil werden Aminosäuren aus dem Protein entfernt. Laccasepräparate verschiedener Herkünfte erweisen sich gegenüber dem denaturierenden Effekt des HBT unterschiedlich empfindlich. So zeigen KRUUS und VIIKARI (2001), dass unter den gewählten Bedingungen Laccase von *M. thermophila* durch HBT (wie auch durch den Mediator Violursäure) eine starke Inaktivierung erfährt, dass dagegen aber Laccase von *T. villosa* und *T. hirsuta* im Rahmen der Versuchsparameter von HBT unbeeinflusst bleibt. Ein weiterer Nachteil von HBT ist die begrenzte biologische Abbaubarkeit (FREUDENREICH et al., 1998; VIIKARI et al., 1999 a).

## Phenothiazine

SCHNEIDER und PEDERSEN (1995) führten Phenothiazinderivate als Mediatoren für Laccase ein. Dieses System wurde in der Textilbleiche im sog. DeniLight™-Prozess zur Bleiche von Denim (Indigo) verwendet (NOVO NORDISK, 1996), doch wurde dieser Mediator mittlererweile durch Methylsyringat ersetzt (MÜLLER, E., 2002: mdl. Mitt.). Bei anwendungsorientierten Versuchen an Zellstoff (BOURBONNAIS et al., 1997; PAICE et al., 1997), Farbstoff (SOARES et al., 2001 a) oder Anthrazen (JOHANNES et al., 1996) wird von keinem oder nur mäßigem Erfolg berichtet. Die Verbindung ist nur gering wasserlöslich. Die Wasserlöslichkeit der Phenothiazine lässt sich durch Synthese mit Sulfonsäuregruppen zu z.B. 10-Methyl-10H-3,7-phenothiazin-3,6-disulfonsäure (MPTDS) oder Methylazaphenothiazinpropionsäure (MAPTS) verbessern (JAKOB et al., 1999). Es sind jedoch keine Untersuchungen bekannt, bei denen diese Mediatoren im LMS angewendet werden.

Phenothiazinpropionsäure (PTPS) stellt die Mediatorkomponente der Phenothiazine dar, aus der sich in Folge von Lichteinwirkung oder Ein-Elektronen-Oxidation das Phenothiazinylradikal  $PTPS^{+\bullet}$  (Abb. 2.8) bildet. Durch Folgereaktionen wird das Molekül am Schwefelatom zum Sulfoxid oxidiert. Damit steht es dem LMS nicht mehr als Mediatorchemikalie zur Verfügung. PTPS besitzt damit kein reversibles Redoxverhalten. Es muss in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden (POTTHAST, 1998).



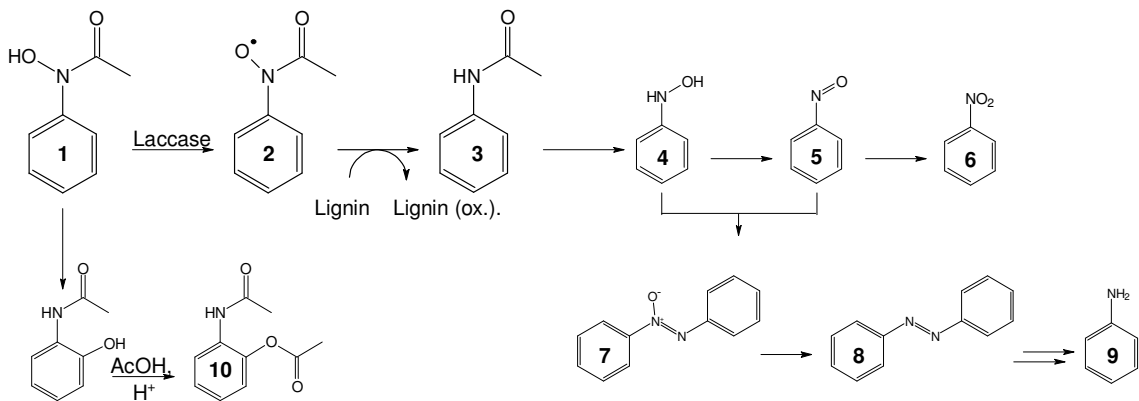
**Abb. 2.8:** Phenothiazinpropionsäure PTPS (**1**), Phenothiazinylradikal  $PTPS^{+\bullet}$  (**2**) und Abbauprodukt Sulfoxid (**3**) (JAKOB et al., 1999)

## NHAA (N-Hydroxyacetanilid)

Wie HBT gehört NHAA (**1**) zur Gruppe N-OH-haltiger Mediatoren (Abb. 2.9). Im Tierversuch besitzen Derivate der N-Hydroxyacetanilide teilweise eine carcinogene Wirkung (FISCHBACH et al., 1984).

Amann (1997) stellte NHAA (N-Hydroxyacetanilid) als Mediator vor, der anders als HBT Laccase nicht inhibiert. Angewandt im LMS handelt es sich um ein effektives und verglichen mit anderen Mediatoren rasch wirkendes Delignifizierungsmittel (FREUDENREICH et al., 1998).

Im LMS erfolgt als Hauptreaktion in Gegenwart von Laccase und Sauerstoff die Bildung des Nitroxylradikals (NHAA<sup>•</sup>) (2), das mit phenolischen Ligninfragmenten weiterreagiert und diese oxidiert (Abb. 2.9). Das Nitroxylradikal wird dabei irreversibel zum N-Phenylacetamid (3) reduziert (FREUDENREICH et al., 1998; POTTHAST, 1998) und steht dem LMS nicht mehr als Mediator zur Verfügung. In einer Reihe von Laccase-unabhängigen Nebenreaktionen entstehen weitere Abbauprodukte. Aus N-Phenylacetanilid (3) entstehen N-Phenylhydroxylamin (4), Nitrosobenzene (5) und Nitrobenzene (6). N-Phenylhydroxylamin (4) und Nitrosobenzene (5) können Azoxybenzene (7), Azobenzene (8) und Anilin (9) bilden. Bisacetylierte Produkte (10) entstehen durch Umacetylierung von NHAA oder durch Acetylierung bei Ausführung des LMS in Acetatpuffer. In ökologischer und toxikologischer Hinsicht bedenklich ist die Entstehung von Nitrosobenzene (5), Nitrobenzene (6), Azoxybenzenen- (7) und Azobenzenderivaten (8) sowie von Anilin (9) (POTTHAST, 1998).

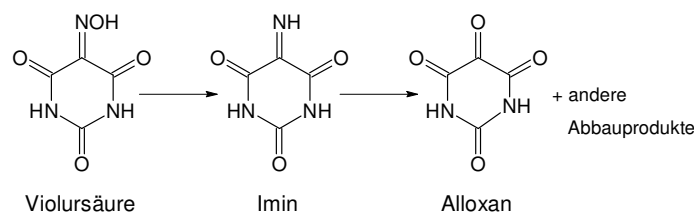


**Abb. 2.9:** Mögliche Abbaupfade von NHAA (POTTHAST, 1998)

Den Vorteilen von NHAA, rasche Reaktion und fehlende Enzyminhibition, stehen damit zwei gravierende Nachteile gegenüber: Der Verlust des teuren NHAA in stöchiometrischen Mengen und die Bildung toxischer, z.T. cancerogener Abbauprodukte.

### VA (Violursäure; 5-(Hydroxyimino)-2,4,6-(1H,3H,5H)-pyrimidintrion)

VA ist ein gelbliches, in Alkohol lösliches Pulver. In Wasser löst es sich nur schwer unter Ausbildung einer intensiven violetten Farbe. In Anwesenheit von Metall-Kationen (z.B. Cu, Co, Alkali- u. Erdalkalimetalle) entstehen farbbintensive Chelate (RÖMPP, 1995). VA wurde von AMANN (1997) als Mediator vorgestellt und kommt wie NHAA in der Literatur relativ häufig, jedoch deutlich seltener als ABTS und HBT als Mediator für das LMS vor. In Bleichversuchen werden mit VA wie bei den bisher vorgestellten Mediatoren sehr gute Bleichergebnisse erzielt (KANDIOLLER und CHRISTOV, 2001 a). Auch mit Hilfe dieser Chemikalie kann das Substratspektrum auf nichtphenolische Ligninstrukturen erweitert werden (FABBRINI et al., 2002). Bei der Oxidation durch Laccase wird VA (FREUDENREICH et al., 1998) über die Iminform zu Alloxan und anderen Produkten abgebaut (Abb. 2.10). Neben der Neigung zu Verfärbungen ist bei VA das im Vergleich zu HBT stärkere Ausmaß bezüglich der Inhibierungseffekte auf Laccase nachteilig (LI et al., 1999; KRUUS und VIIKARI, 2001).



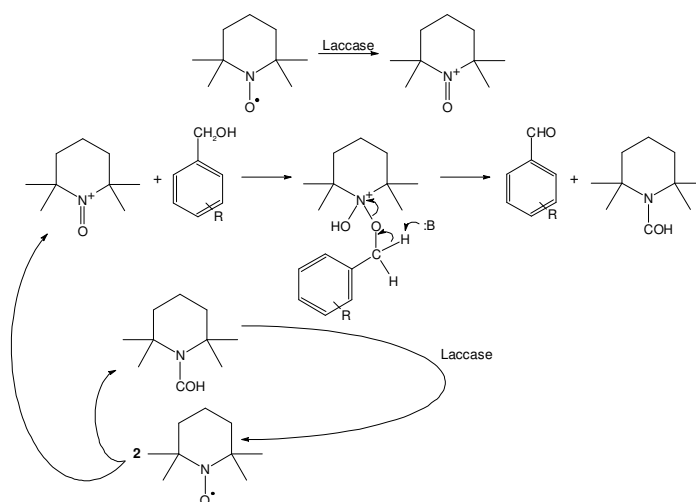
**Abb. 2.10:** Violursäure und Abbauprodukte nach FREUDENREICH et al. (1998)

### TEMPO (2,2',6,6'-Tetramethyl-1-Piperidinyloxy Radikal)

TEMPO wurde zwar bereits von FREUDENREICH et al. (1998) als Mediator für die Zellstoffdelignifizierung vorgestellt, doch wird diesem Mediator erst in der jüngsten Literatur als delignifizierendes Agens für das LMS Beachtung geschenkt (FABBRINI et al., 2001). Im LMS erweist sich TEMPO als effektiver Mediator für die Umsetzung nichtphenolischer Substrate. Primäre und sekundäre Benzyl-, Allyl- sowie Alkylalkohole, Benzylether sowie primäre und tertiäre Benzylamine werden in die entsprechenden Aldehyde umgebaut (FABBRINI et al., 2002). KRUUS und VIIKARI (2001) berichten von der Umsetzung von Veratrylalkohol zu Veratrylaldehyd.

FABBRINI et al. (2001) schlagen einen Reaktionsmechanismus für die TEMPO-unterstützte Umsetzung nichtphenolischer Substrate vor (Abb. 2.11). Dabei ist die aktive Mediatorspezies das Oxoammoniumion (FREUDENREICH et al., 1998).

Laccase oxidiert zu Reaktionsbeginn das stabile Oxyradikal zum Oxoammoniumion, das bei der Substratoxidation zum Hydroxylamin abreagiert. Aus dem Hydroxylamin entsteht entweder im sauren Milieu durch Disproportionierung oder unter Laccaseeinfluss wieder die Radikalform, die mit Hilfe des Enzyms wieder zum Oxoammoniumion oxidiert wird.



**Abb. 2.11:** Möglicher Reaktionsmechanismus zur Laccase-unterstützten Substratoxidation durch TEMPO (FABBRINI et al., 2001)

Nicht zur Modifizierung nichtphenolischer Substrate, sondern zur selektiven Oxidation primärerer Alkoholgruppen von Polysacchariden zu Carbonyl- und Carboxylgruppen nutzen VIIKARI et al. (1999 b) und JETTEN et al. (2000) TEMPO. An Stelle chemischer Oxidantien zur Oxidation des Radikals zum aktiven Oxoammoniumion verwenden sie Laccasen und andere Oxidasen. FAGERSTRÖM et al. (2001) berichten vom Abbau von Hexenuronsäuren mit Hilfe von Laccase und TEMPO.

### Weitere Mediatoren

Die Patentliteratur bietet eine Fülle weiterer Substanzen, die als Mediatoren in Frage kommen könnten (SCHNEIDER und PEDERSEN, 1995; CALL, 1996; AMANN, 1999). Dazu gehören beispielsweise Remazol Brilliantblau, 1-Nitroso-2-naphtol-3,6-disulfonsäure, 2-Nitroso-1-naphtol-4-sulfonsäure, 3-Nitrosochinolin-2,4-diol oder Phenoxazine. Allerdings erfüllen diese Stoffe die an Mediatoren gestellten Kriterien nur in geringem Maße. Vor allem starke Verfärbungen, eine geringe Wasserlöslichkeit und zu hohe Preise verhindern einen sinnvollen Einsatz (POTTHAST, 1998).

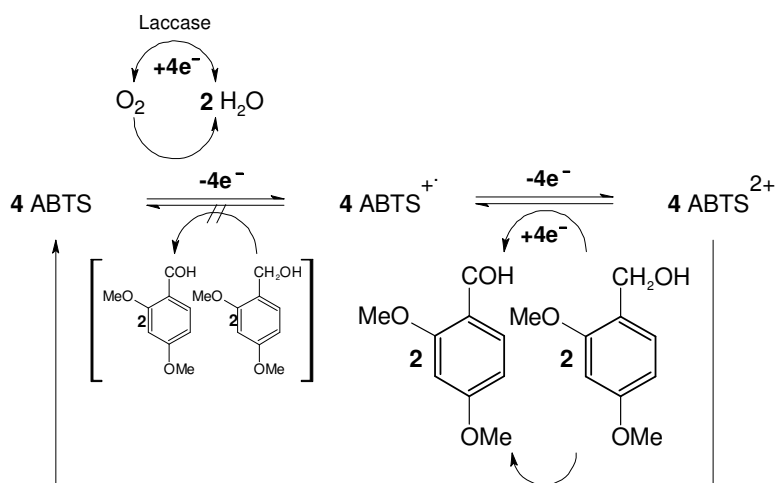
### 2.4.2.3 Reaktionsmechanismen im LMS

Die im LMS bei der Umsetzung diverser Substrate ablaufenden Reaktionsmechanismen sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Die Darstellung des LMS als idealisierte Redoxkaskade (Abb. 2.5) stellt nur ein stark vereinfachtes Modell dar. Die Reaktionsabläufe sind bedeutend komplexer und hängen vom eingesetzten Laccasepräparat, Mediatortyp, Substrat und Reaktionsmedium ab. Die Reaktionsprodukte können vielfältiger Natur sein. Neben den Reaktionsprodukten des Substrates finden sich Abbauprodukte des Mediators und Kopplungsprodukte, an denen Laccase-, Mediator- und Substratbestandteile beteiligt sein können. Mediatortyp, Substrat, Reaktionsmedium, Reaktions-, Abbau- und Kopplungsprodukte selbst können ausschlaggebend für das zu erzielende Endergebnis sein.

Die Bedeutung des Laccasepräparates für die Umsetzung bestimmter Substrate im LMS demonstriert POTTHAST (1998) bei der Umsetzung aromatischer Methylgruppen unterschiedlich substituierter Toluene. Von drei verschiedenen Laccasepräparaten war nur das Präparat des japanischen Herstellers Mercian Corporation in der Lage, die Reaktion zum entsprechenden Aldehyd zu katalysieren. Dieses Präparat besitzt vier verschiedene Laccase-Isozyme. Die Laccasepräparate von *Trametes villosa* (SP 504) und *Myceliophthora thermophila* (SP 850) des dänischen Herstellers Novozymes beinhalten dagegen nur jeweils ein Isozym und sind zur Katalyse dieser Reaktion nicht fähig. Der Grund für die Abwesenheit weiterer Isozyme ist bei den letzten beiden Präparaten darin zu suchen, dass sie mit Hilfe eines gentechnisch veränderten Organismus (*Aspergillus spec.*) erzeugt wurden. Hier gelang vermutlich nur die Übertragung eines Gens, das für die Expressierung eines bestimmten Laccase-Isozyms verantwortlich ist. Auch KRUUS und VIIKARI (2001), BOURBONNAIS et al. (1997) und LI et al. (1999) berichten von Unterschieden bezüglich der Effizienz verschiedener Laccase-Präparate.

Der Einfluss der Mediatorwahl für den Einsatz im LMS deutet sich bereits bei der Besprechung der verschiedenen Mediatoren an. Die reaktive Mediatorspezies kann ein Radikal (HBT<sup>•</sup>), ein Kation (TEMPO<sup>+</sup>), ein Kationradikal (ABTS<sup>•+</sup>) oder Dikation (ABTS<sup>++</sup>) sein (BOURBONNAIS et al., 1998; FABBRINI et al., 2002). Entsprechend werden bei Einsatz verschiedener Mediatoren bei Umsetzung des gleichen Substrates unterschiedliche Reaktionsmechanismen vorgeschlagen. POTTHAST (1998) und POTTHAST et al. (2001) haben beispielsweise die Reaktionskinetik des LMS beim Einsatz der Mediatoren ABTS und HBT für die Umsetzung des nichtphenolischen Substrates 2,4 Dimethoxybenzylalkohol verglichen.

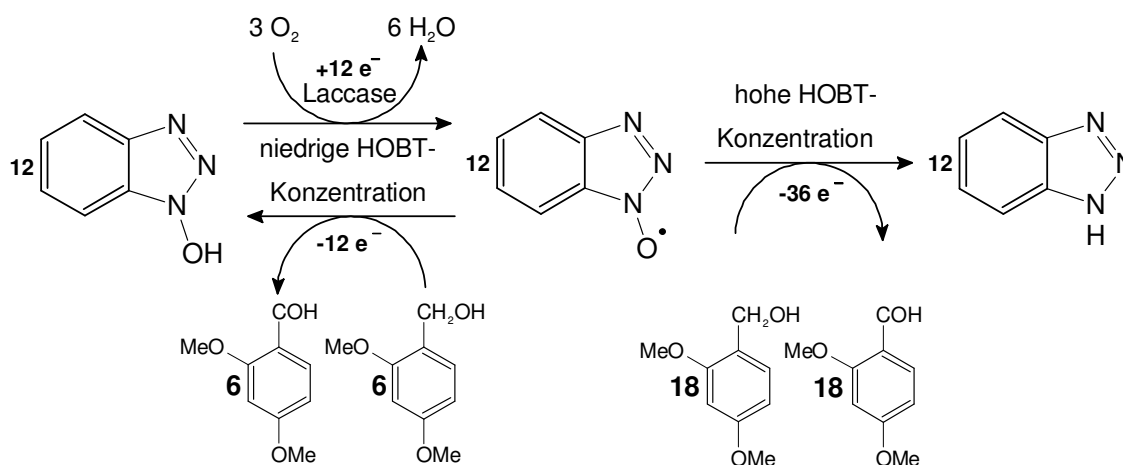
Bei Einsatz von ABTS kann die Reaktion hinsichtlich des Sauerstoffverbrauches in zwei Phasen aufgeteilt werden (Abb. 2.12). Die erste Phase ist eine rein enzymatisch gesteuerte Reaktion, in der fast ausschließlich ABTS mit Hilfe von Laccase zum Kationradikal  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  oxidiert wird. Die Reaktion erfolgt rasch, der Sauerstoffverbrauch ist entsprechend hoch. Die zweite Phase stellt keinen rein enzymatischen Reaktionsmechanismus dar und besteht aus mehreren voneinander abhängigen Teilreaktionen. Dabei wird deutlich weniger Sauerstoff verbraucht. Zunächst wird das Kationradikal  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  zum Dikation  $\text{ABTS}^{2+}$  oxidiert, was vermutlich durch Disproportionierung des  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  bei gleichzeitiger Rückbildung von ABTS geschieht. Das Dikation  $\text{ABTS}^{2+}$  oxidiert den Alkohol zum Aldehyd und reagiert selbst zum Kationradikal  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  oder zu ABTS zurück. ABTS wird von Laccase erneut zum Dikation oxidiert.



**Abb. 2.12:** Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus zur LMS-katalysierten Umsetzung von 2,4-Dimethoxybenzylalkohol mit ABTS als Mediator (POTTHAST, 1998)

Verwendet man unter gleichen Reaktionsbedingungen anstelle von ABTS HBT als Mediator, zeichnet sich ein anderer Reaktionsmechanismus ab (POTTHAST, 1998 und POTTHAST et al., 2001). HBT wird nur zum Radikal  $\text{HBT}^{\bullet}$  oxidiert (Abb. 2.13). Diese Reaktion erfolgt deutlich langsamer als bei ABTS und stellt bei der Umsetzung des Alkohols zum Aldehyd den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Dabei wird Sauerstoff über die gesamte Reaktionszeit kontinuierlich verbraucht. Die Gesamtreaktion ist im Gegensatz zur Reaktion mit ABTS die ganze Zeit enzymatisch bestimmt. Bei hoher HBT-Konzentration erfolgt eine irreversible Inhibierung des Enzyms. Steigt daher die eingesetzte HBT-Menge, nimmt zwar die Aldehydbildung zu, gleichzeitig wird jedoch die Laccase verstärkt inhibiert, so dass die Reaktionsgeschwindigkeitszunahme abflacht. Bei Verwendung von HBT kommt es außerdem bei steigender HBT-Konzentration zu einem allmählichen Wechsel des

Reaktionsverhaltens, bei dem zwei Grenzfälle zu beobachten sind. Bei sehr geringen HBT-Konzentrationen ( $\text{HBT}/\text{ArOH} < 1$ ) ist die Bildung des  $\text{HBT}^\bullet$  reversibel. Sauerstoffverbrauch und Aldehydbildung erfolgen im stöchiometrischen Verhältnis 1:2. Bei hohen HBT-Konzentrationen ( $\text{HBT}/\text{ArOH} > 5$ ) folgt nach Bildung des  $\text{HBT}^\bullet$  mit der Umsetzung des Substrates die irreversible Zersetzung des Mediators zu Benzotriazol (BT). Sauerstoffverbrauch und Aldehydbildung erfolgen im stöchiometrischen Verhältnis 2:3. Bei HBT-Konzentrationen zwischen diesen Extremwerten sind beide Reaktionsmechanismen an der Reaktion beteiligt.



**Abb. 2.13:** Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus zur LMS-katalysierten Umsetzung von 2,4-Dimethoxybenzylalkohol mit HBT als Mediator (POTTHAST, 1998)

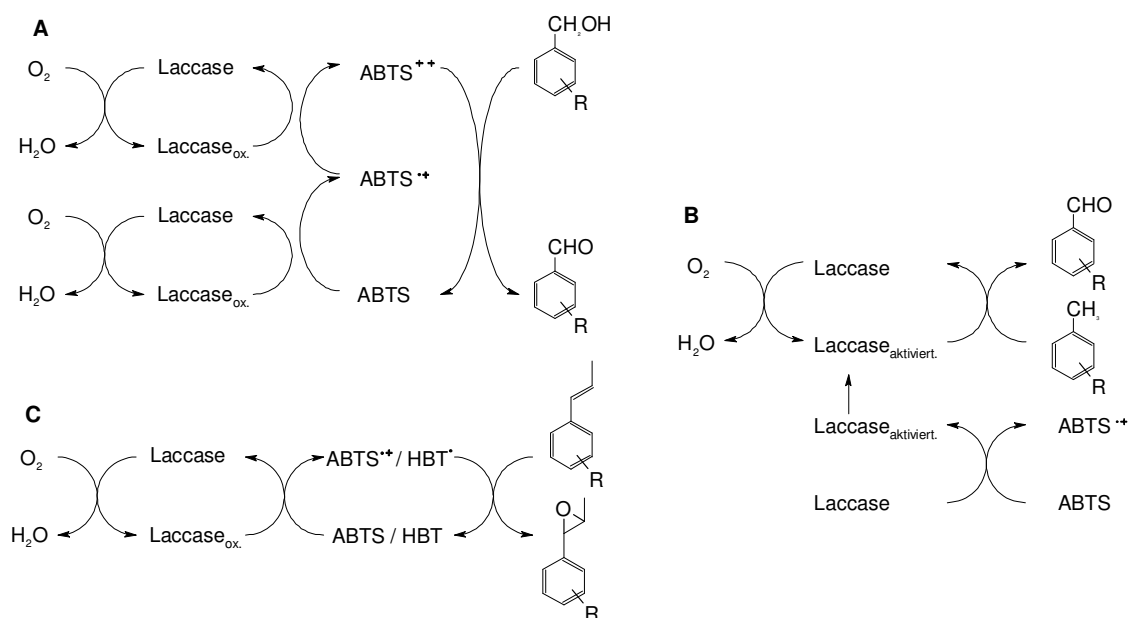
POTTHAST (1998) demonstriert auch die Bedeutung des vorliegenden Substrates für die Art und Weise des stattfindenden Reaktionsmechanismus. Zu diesem Zweck oxidiert sie mit Hilfe von *T. versicolor* – Laccase (Fa. Mercian) und Mediator ABTS unterschiedlich substituierte Benzylalkohole, Methylaromate und Propenylbenzene zum jeweils entsprechenden Aldehyd.

Zur Oxidation von Benzylalkoholen (vergl. Abb. 2.12 und Fall **A** in Abb. 2.14) werden große Mediatormengen im stöchiometrischen oder überstöchiometrischen Verhältnis zum Substrat benötigt, da vermutlich das Dikation  $\text{ABTS}^{++}$  in einem 2-Elektronen-Prozess die Oxidation bewirkt (vergl. Abb. 2.12). Entsprechend des chemischen Gleichgewichtes ist es im System nur in geringen Mengen vorhanden, so dass für messbare Reaktionsgeschwindigkeiten hohe Mediatorkonzentrationen notwendig sind. Für diesen Reaktionstyp ist die Einlagerung des Mediators in das aktive Zentrum der Laccase für die Erzeugung des Dikations  $\text{ABTS}^{++}$  entscheidend. Die Einlagerung des Benzylalkohols in das aktive Zentrum der Laccase ist dazu nicht notwendig.

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei der Oxidation von Methylaromaten (Fall **B** in Abb. 2.14) wird dagegen bei geringen Mediatormengen erreicht. Die Oxidation dieser Substrate erfordert die Durchführung von 4-Elektronen-Prozessen. POTTHAST (1998) sieht die Aufgabe des Mediators in der Überführung des aktiven Zentrums der Laccase in eine aktivierte Form, wonach das Enzym dann befähigt ist, Redoxzyklen aus 4-Elektronen-Prozessen durchzuführen. Ist das Enzym einmal mit Hilfe von ABTS aktiviert worden, wird die aktivierte Form der Laccase nach jedem Redoxzyklus durch die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser zurückgewonnen, so dass der Mediator für die weitere Reaktion nicht mehr benötigt wird. Die Reaktion von Laccase mit dem Mediator verläuft viel schneller als die Reaktion von Laccase mit den Methylaromaten. Daher funktioniert die Umsetzung von Methylaromaten mit Hilfe aktivierter Laccase nur, wenn ABTS in so geringer Menge vorhanden ist, dass sie zwar zur Aktivierung der Laccase (durch Übertragung von einem Elektron vom Mediatormolekül auf das Enzym) ausreicht, nicht aber zur Vollendung eines Redoxzyklus (durch Übertragung von vier Elektronen auf das Enzym und weiter auf den Sauerstoff). Bei Überschuss von ABTS würde Laccase ausschließlich den Mediator in Ein-Elektronen-Schritten oxidieren. Die Reaktion mit Methylaromaten würde dann durch die Schnelligkeit der Ein-Elektronen-Schritte und durch eine Blockade des aktiven Zentrums durch den Mediatorüberschuss verhindert.

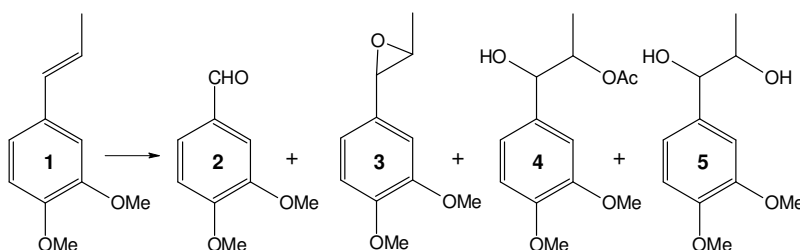
Die Oxidation von konjugierten Doppelbindungen vom Typ des 1-Propenylbenzens (Fall **C** in Abb. 2.14) wird durch isolierte Kationradikale  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  erzielt. Laccase oxidiert nur das ABTS zum Radikal, reagiert aber selbst mit der Verbindung nicht. Wird alternativ zum ABTS HBT als Mediator eingesetzt, werden im Wesentlichen die gleichen Abbauprodukte erzeugt. Als aktives Agens nimmt POTTHAST (1998) das Benzotriazolyloxid  $\text{BT}^{\bullet}$  an. Die Reaktion hat also einen radikalischen Charakter.

Die Art des aktiven Agens hängt also vom Substrattyp (und der Mediatorkonzentration) ab und ist bei Benzylalkoholen das Dikation des ABTS, bei Methylaromaten die aktivierte Laccase und bei Propenylbenzen das Kationradikal des ABTS.



**Abb. 2.14:** Einfluss der Substrate (**A** Benzylalkohole, **B** Methylaromate, **C** konjugierte Doppelbindungen) auf den Reaktionsmechanismus im LMS (POTTHAST, 1998), dargestellt als vereinfachte Redoxkaskaden analog zu Abb. 2.5

Das letzte Beispiel liefert auch ein Beispiel für die Bedeutung des Reaktionsmediums für die Entstehung der Substratabbauprodukte. Beim LMS-unterstützten Abbau konjugierter Doppelbindungen vom Typ des 1-Propenylbenzens (**1**) handelt es sich im ersten Schritt um eine Epoxidierungsreaktion. Nach der Epoxidierung öffnet im Fall der Verwendung von Acetatpuffer (pH 4,5) das anwesende Acetat das intermediär gebildete Oxiran (**3**) und es bilden sich die Ringöffnungsprodukte **4** und **5** (Abb. 2.15). Veratrylaldehyd (**2**) entsteht vermutlich in einer radikalischen Nebenreaktion. In Phosphatpuffer (pH 6,0) und Citratpuffer (pH 3,5) werden dagegen keine Ringöffnungsprodukte des Epoxids gefunden.



**Abb. 2.15:** Oxidationsprodukte von 1,2-Dimethoxy-4-(1-propenyl)-benzen (POTTHAST, 1998)

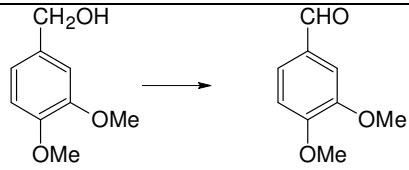
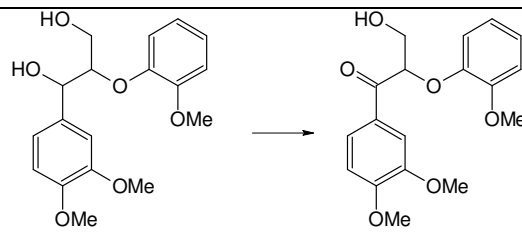
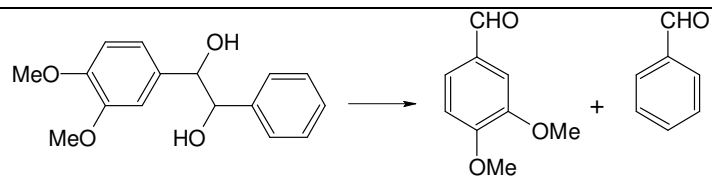
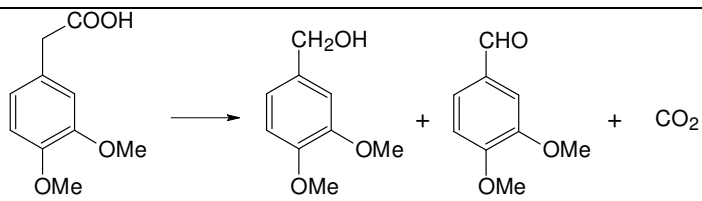
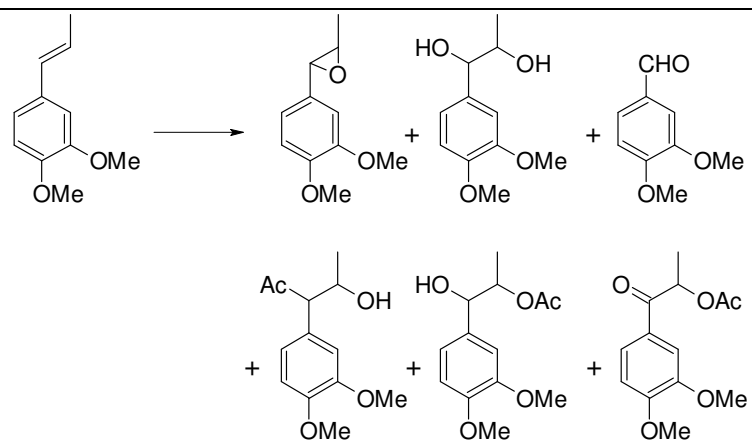
Beispiele zu Reaktions-, Abbau- und Kopplungsprodukten wurden bereits bei der Beschreibung der Mediatoren gegeben, ein Beispiel für die Konzentrationsverhältnisse in diesem Kapitel (vergl. Abb. 2.13).

#### **2.4.2.4 LMS-katalysierte Substratumsetzungen**

Die Entdeckung, dass mit Hilfe von Mediatoren das Substratspektrum für Laccasen von phenolischen auf nichtphenolische (= veretherte) Strukturen erweitert werden kann (BOURBONNAIS und PAICE, 1990), führte zu zahlreichen weiterführenden Untersuchungen. Die Reaktionen, die dabei mit ABTS als Mediator beobachtet werden, können zu 5 Reaktionstypen zusammengefasst werden (CHEN et al., 2000; POTTHAST, 1998). Dies sind (vergl. Tab. 2.5) die Oxidation benzylicher Alkohole zum entsprechenden Aldehyd (BOURBONNAIS und PAICE, 1990), die Oxidation der Hydroxylgruppe am C $\alpha$ -Atom zum entsprechenden Keton (BOURBONNAIS und PAICE, 1990), die oxidative Spaltung der C $\alpha$ -C $\beta$ -Bindung (BOURBONNAIS und PAICE, 1990), Decarboxylierung und benzyliche Oxidation von Veratrylsäure (MUHEIM et al., 1992) sowie die Öffnung und Spaltung von C $\alpha$ -C $\beta$ -Doppelbindungen, die an den benzylichen Ring konjugiert sind (CHEN et al. 2000).

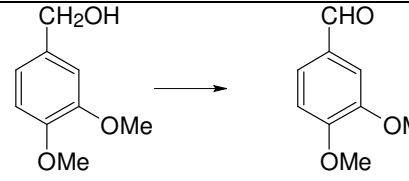
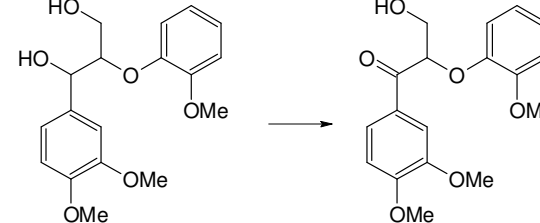
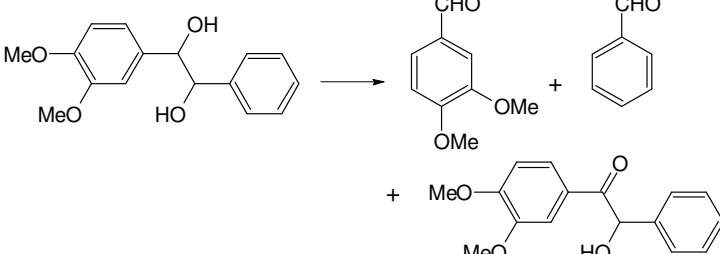
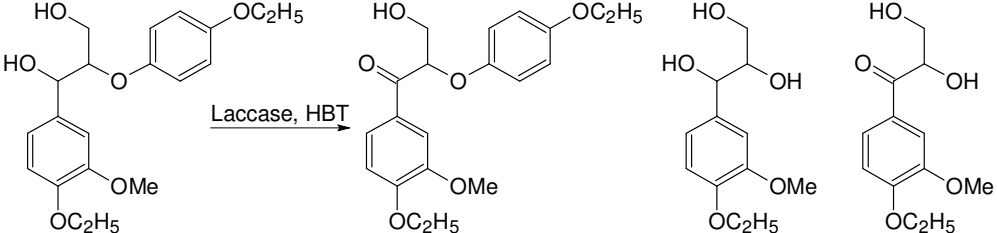
CRESTINI und ARGYROPOULOS (1997) beobachten daneben die Oxidation von Diphenolen vom Stilbentyp (vergl. Tab. 2.4). Die Laccase-unterstützte Umsetzung dieses Substrates kann allerdings nur bei Vorliegen als phenolisches Substrat mit Hilfe der Mediatoren ABTS und HBT weiter gesteigert werden. Der Mediatoreneinsatz bleibt wirkungslos, wenn die nichtphenolische Stilbenstruktur eingesetzt wird.

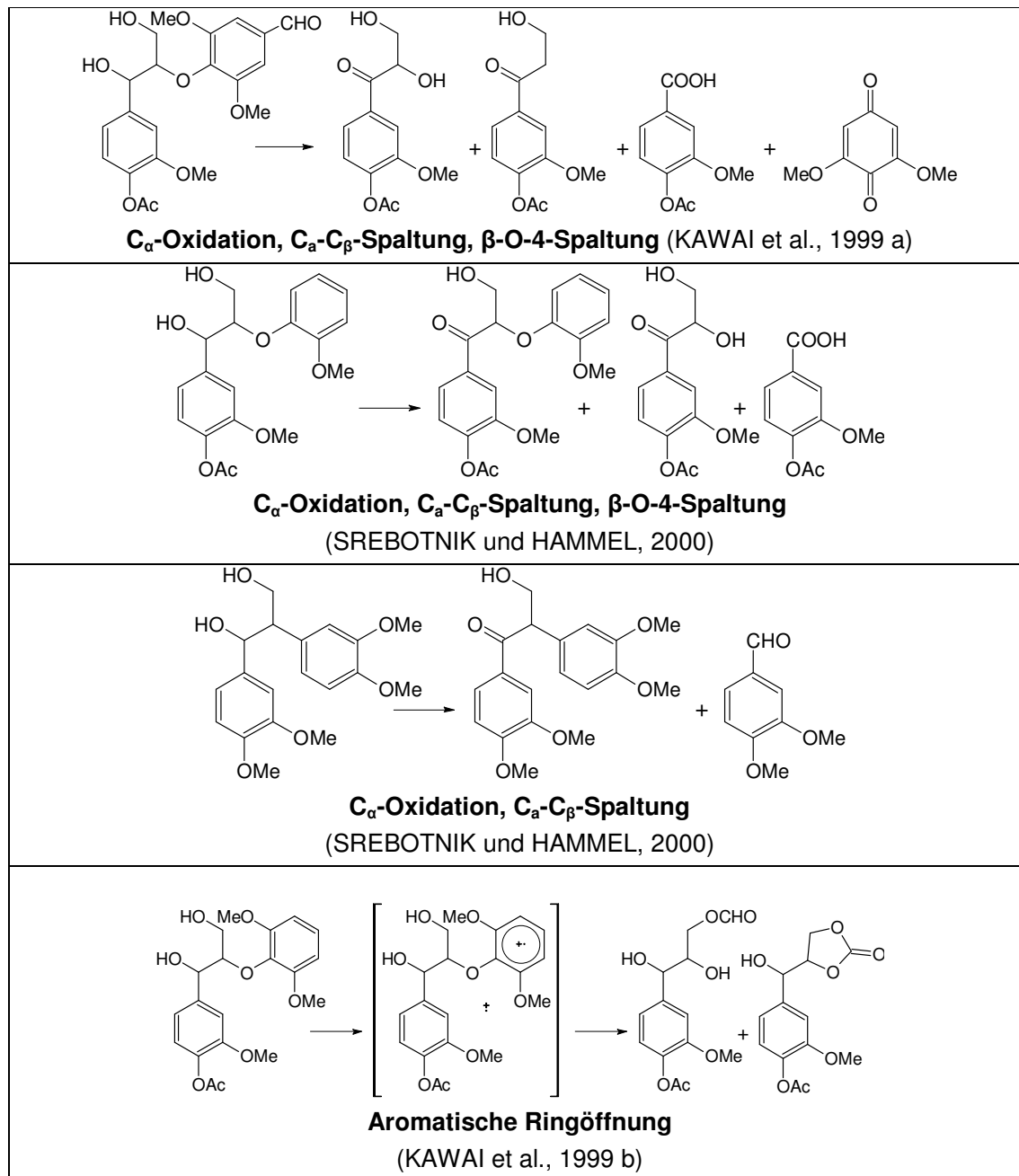
**Tab. 2.5:** Modellreaktionen mit ABTS als Mediator (aus Potthast, 1998, ergänzt)

|                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p><b>Benzyliche Oxidation des Alkohols zum Aldehyd</b><br/>(BOURBONNAIS und PAICE, 1990)</p>                          |
|  <p><b>C<sub>α</sub>-Oxidation der Hydroxyl- zur Ketogruppe</b><br/>(BOURBONNAIS und PAICE, 1990)</p>                  |
|  <p><b>C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub>-Spaltung</b><br/>(BOURBONNAIS und PAICE, 1990)</p>                                  |
|  <p><b>Decarboxylierung, benzyliche Oxidation</b><br/>(MUHEIM et al., 1992)</p>                                      |
|  <p><b>Öffnung und C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub>-Spaltung konjugierter Doppelbindungen</b><br/>(CHEN et al., 2000)</p> |

Die direkte Spaltung der Etherbindungen und Ringöffnungsreaktionen durch das LMS mit ABTS als Mediator wurden bisher noch nicht dokumentiert. Verwendet man HBT an Stelle von ABTS, können auch diese Reaktionen neben benzylicher Oxidation, C $\alpha$ -Oxidation der Hydroxyl- zur Ketogruppe und C $\alpha$ -C $\beta$ -Spaltung beobachtet werden (KAWAI et al., 1999 b). Tab. 2.6 veranschaulicht die bisher beobachteten Reaktionen mit Ligninmodells-substanzen.

**Tab. 2.6:** Modellreaktionen mit HBT als Mediator

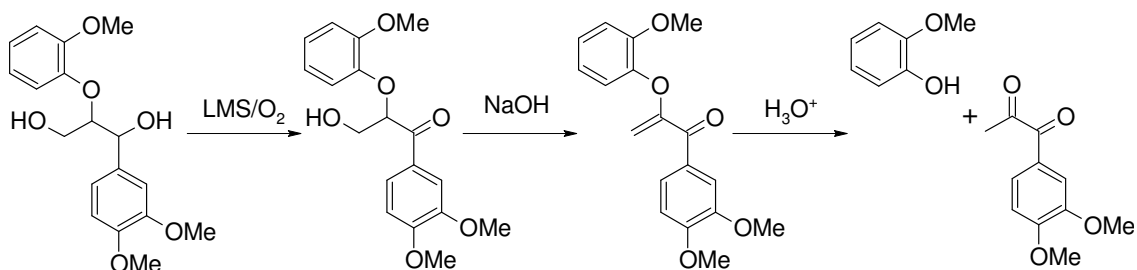
|                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p style="text-align: center;"><b>Benzyliche Oxidation des Alkohols zum Aldehyd</b><br/>(BOURBONNAIS et al., 1997)</p>                                       |
|  <p style="text-align: center;"><b>C<math>\alpha</math>-Oxidation der Hydroxyl- zur Ketogruppe</b><br/>(BOURBONNAIS et al., 1997)</p>                        |
|  <p style="text-align: center;"><b>C<math>\alpha</math>-Oxidation, C<math>\alpha</math>-C<math>\beta</math>-Spaltung</b><br/>(BOURBONNAIS et al., 1997)</p> |
|  <p style="text-align: center;"><b>C<math>\alpha</math>-Oxidation, <math>\beta</math>-O-4-Spaltung</b><br/>(SREBOTNIK et al., 1998)</p>                     |



Die Reaktionsmechanismen, die zu den Oxidationsprodukten führen, sind auch heute noch nicht vollständig verstanden. Nicht zuletzt deswegen, weil systematische Untersuchungen unter Einbeziehung verschiedener Substrate, Laccasen und Mediatoren fehlen. Untersuchungen zu LMS-Reaktionen kommen daher zu z.T. sehr unterschiedlichen Ergebnissen.

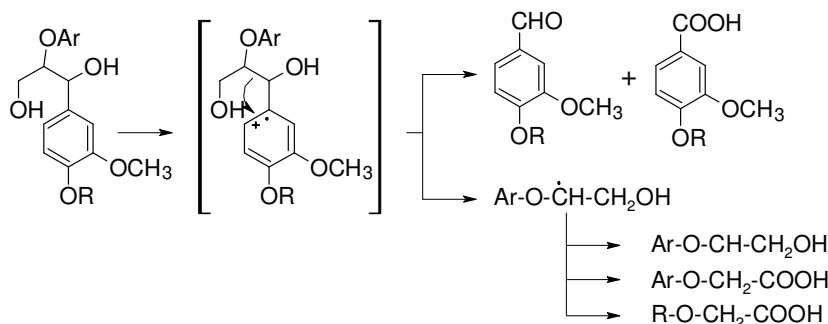
So schlagen FREUDENREICH et al. (1998) einen Reaktionsmechanismus für die Spaltung eines nichtphenolischen β-O-4-gebundenen Dimers vor. Durch die Behandlung mit Laccase, Mediator HBT und Sauerstoff kommt es zunächst zur Oxidation der

benzyliischen Hydroxylgruppe zum Keton ( $C_{\alpha}$ -Oxidation), aus dem unter den Bedingungen einer alkalischen Extraktionsstufe das entsprechende Olefin entsteht, das unter neutralen oder sauren Bedingungen leicht gespalten werden kann (Abb. 2.16). Für eine ausreichende Delignifizierung halten die Autoren eine alkalische Extraktionsstufe nach einer Laccase-Mediator-Behandlung für unerlässlich.



**Abb. 2.16:**  $\beta$ -Aryl-Ether-Spaltung nach  $C_{\alpha}$ -Oxidation der benzyliischen Alkoholgruppe durch das LMS (*T.versicolor*-Laccase / HBT) und anschließender kombinierter alkalischer sowie neutral - saurer Behandlung (FREUDENREICH et al., 1998)

SREBOTNIK et al. (1998) gelangen dagegen bereits nach einer einfachen Behandlung mit *T. villosa*-Laccase und HBT ohne alkalische Extraktion sowohl die Spaltung der  $\beta$ -O-4-Bindung des nichtphenolischen Dimers als auch die Spaltung des entsprechenden  $C_{\alpha}$ -Carbonyl-Derivatives (Tab. 2.6). BOURBONNAIS et al. (1997) wiederum können an einer sehr ähnlichen Modells substanz, die an Stelle von Ethoxy-Methoxygruppen besitzt, lediglich die Oxidation des  $C_{\alpha}$ -Atoms zur Ketogruppe beobachten (Tab 2.6). Es lässt sich jedoch schwer beurteilen, ob dieser Unterschied von der Wahl der Laccase (von *T. versicolor*), des Mediators (ABTS) oder der weniger reaktiven Modells substanz herrührt (SREBOTNIK et al., 1998). BALAKSHIN et al. (2001) schlagen schließlich einen Reaktionsmechanismus für den Abbau  $\beta$ -O-4-veretherter Ligninstrukturen vor, der im Gegensatz zum Mechanismus von FREUDENREICH et al. (1998) unabhängig von der vorhergehenden Oxidation der benzyliischen OH-Gruppe ist, da die Methylierung benzyliischer OH-Gruppen des Substrates auf die Delignifizierungsrate keinen Einfluss hat. BALAKSHIN et al. (2001) folgern, dass der Reaktionsweg von FREUDENREICH et al. (1998) nicht den Hauptreaktionsweg darstellt.

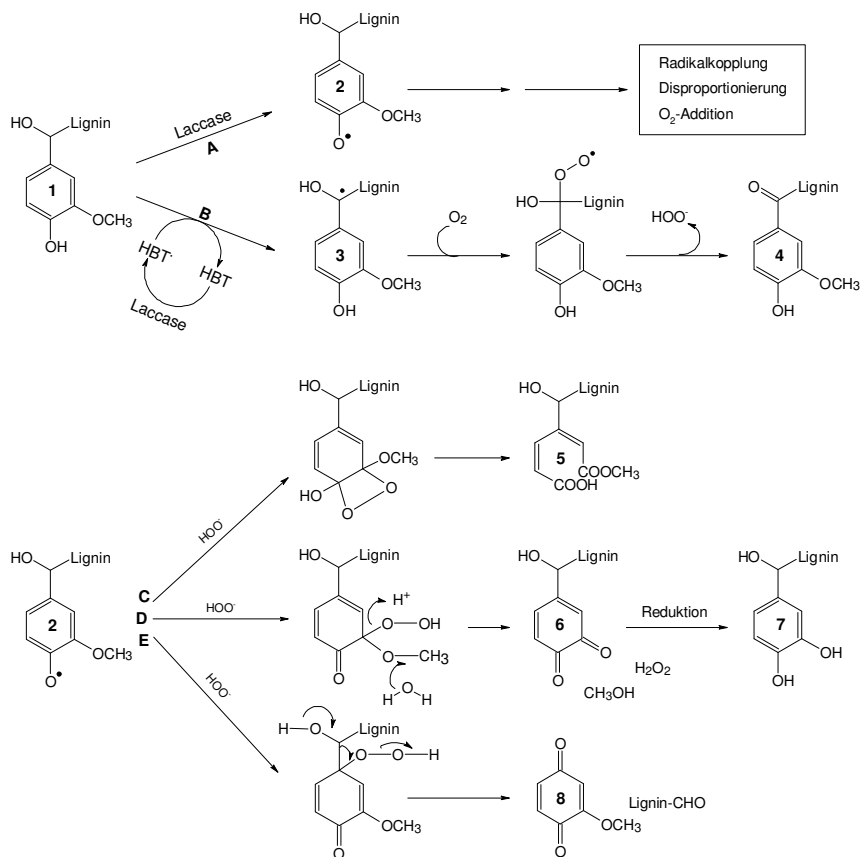


**Abb. 2.17:** Vorgeschlagener Aryl-Kation-Radikal-Reaktionsmechanismus für den Abbau von  $\beta$ -O-4-Strukturen in Restlignin bei der LMS-unterstützten Sulfatzellstoffbleiche mit HBT als Mediator (BALAKSHIN et al., 2001)

Neben der Bedeutung der benzyliischen OH-Gruppe wird vor allem die Bedeutung der phenolischen OH-Gruppe uneinheitlich diskutiert.

Einen Beitrag zu dieser Frage liefert die Arbeit von CRESTINI et al. (2001), die sich mit der Oxidation der phenolischen Modellschubstanz Vanillylalcohol und isolierten Restligninen durch Laccase alleine bzw. durch Laccase und HBT als Mediator beschäftigt. Der wesentliche Effekt von HBT zur Ausweitung des Reaktionsspektrums scheint in der Erzeugung von Perhydroxylionen aus Benzylradikalen und Sauerstoff zu liegen. Mit Laccase alleine erfolgt lediglich die oxidative Kopplung von Vanillylalcohol zu Diphenolen und in sehr geringem Umfang die Oxidation der Hydroxylgruppe am C $\alpha$ -Atom zum Carbonyl. Dagegen können im LMS zusätzlich die Bildung von *o*- und *p*-Chinonen, Demethylierung und aromatische Ringspaltungen beobachtet werden (Abb. 2.18). Reaktionen von Laccase mit isoliertem Restlignin von Sulfatzellstoff führen zu oxidativen Kopplungsreaktionen (Polymerisation). Im LMS wird dagegen die Bildung kondensierter Strukturen vermindert. Hier können Seitenkettenoxidationen und die Bildung von Additionsprodukten mit Sauerstoff beobachtet werden. Der Ausgangspunkt für die Oxidationsreaktionen des LMS bei Einsatz von HBT wird wie bei SEALEY und RAGAUSKAS (1996) oder POPPIUS-LEVLIN et al. (1997 a) in den freien phenolischen OH-Gruppen des Lignins gesehen. Das HBT-Radikal erweitert das Reaktionsspektrum der Laccase auf die Oxidation von Seitenketten (Abb. 2.18, Reaktionsweg **B**). Ein möglicher Mechanismus ist die H-Abstraktion an benzyliischen Gruppen. Das entstehende Benzylradikal (**3**) besitzt ein hohes Reaktionsvermögen mit Sauerstoff. Solch ein Intermediat reagiert mit Sauerstoffaddition. Das Ergebnis ist bei gleichzeitiger Freisetzung eines Perhydroxylions ein Produkt mit oxidierter Seitenkette (**4**). Das mit Hilfe von HBT generierte Perhydroxylion reagiert nun mit Phenoxylradikalen des phenolischen Rings (**2**), in 3, 4 oder 1-Position (Reaktionswege C-E) zu Ringffnungsprodukten (Muconsuren) (**5**),

*o*-Chinonen (**6**), Methanol und Peroxid sowie nach Reduktion zu demethylierten Ligninstrukturen (**7**) und schließlich im Fall **E** zu *p*-Chinonen (**8**). Die Phenoxylradikale (**2**) sind zuvor aus der Oxidation von Laccase ohne Mediator hervorgegangen (Reaktionsweg **A**).



**Abb. 2.18:** Vorgeschlagener Reaktionsweg für die LMS-unterstützte Oxidation von Lignin mit HBT als Mediator (CRESTINI et al., 2001)

Um die Bedeutung der freien phenolischen Hydroxylgruppen für diesen Reaktionsmechanismus zu überprüfen, wurden diese durch Acetylierung bzw. Methylierung blockiert, worauf an den Restligninen keine Veränderungen mehr beobachtet werden können. CRESTINI et al. (2001) folgern, dass HBT bei der Oxidation nichtphenolischer Ligninuntereinheiten nicht als Mediator wirkt. Im Einklang dazu beobachtet POTTHAST (1998) eine starke Inhibierung der LMS-unterstützten Delignifizierung (mit den Mediatoren ABTS bzw. HBT) methylierter Sulfatzellstoffe, also veretherter Ligninstrukturen, so dass auch sie zum Schluss kommt, dass phenolische Hydroxylgruppen bei der LMS-Reaktion am Lignin eine Schlüsselrolle einnehmen, wenn auch das LMS in der Lage ist, bei Verwendung niedermolekularer Modellverbindungen schwer oxidierbare Strukturen, wie veretherter Phenole, an Stelle von komplexen Ligninstrukturen erfolgreich zu oxidieren.

BALAKSHIN et al. (2001) können dagegen die Bedeutung freier phenolischer Hydroxylgruppen nicht bestätigen. In dieser Untersuchung hat weder die Methylierung benzyliischer noch phenolischer Hydroxylgruppen einen Einfluss auf die Delignifizierung, was vermutlich daran liegt, dass phenolische Einheiten sowohl an Polymerisierungs- als auch Depolymerisierungsreaktionen beteiligt sein können. WEN et al. (1999) beobachten, dass der Sauerstoffverbrauch bei der Ligninumsetzung nicht vom Gehalt phenolischer Hydroxylgruppen abhängt. Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass während einer mehrstufigen LMS-Behandlung die Sauerstoffaufnahme pro Gramm Restlignin nicht zurückgeht (BALAKSHIN et al., 2000), obwohl bekannt ist, dass der Gehalt phenolischer Hydroxylgruppen im Restlignin durch die enzymatische Behandlung abnimmt (SEALEY und RAGAUSKAS, 1996; TAMMINEN et al., 1998; WEN et al., 1999). WEN et al. (2001) beobachten schließlich, dass der Gehalt phenolischer Hydroxylgruppen durch die Behandlung mit Laccase und HBT deutlich sinkt, aber mit der Durchführung der alkalischen Extraktion wieder neue phenolische Hydroxylgruppen entstehen und vermuten, dass diese bei der Spaltung von alkalilabilen  $\beta$ -O-4-Etherbindungen gebildet werden. Da die Spaltung dieser Ether bei Vorhandensein von  $\alpha$ -Carbonylgruppen erleichtert wird (CRISS et al., 1998), kommt der  $\text{Ca}$ -oxidierenden Wirkung des LMS eine große Rolle zu (WEN et al., 2001).

### 2.4.3 Anwendungsgebiete für Laccase und das Laccase-Mediator-System

Auf Grund ihres weiten Substratspektrums bietet Laccase eine Vielzahl denkbarer Anwendungsmöglichkeiten, auf die hier kurz eingegangen werden soll. Lediglich die Anwendung auf dem Gebiet der Textilveredelung besitzt Praxisrelevanz.

#### 2.4.3.1 Zellstoffbleiche

Die erste Veröffentlichung, die von einer effizienten Delignifizierung eines Zellstoffes mit Hilfe isolierter Laccase berichtete, ist die Arbeit von BOURBONNAIS und PAICE (1992). In dieser wird Laccase von *Trametes versicolor* mit dem Mediator ABTS im Laccase-Mediator-System kombiniert. In der Folge werden weitere Chemikalien als Mediatoren erkannt (CALL, 1994 b). Weiterführende Untersuchungen zeigen die Eignung dieses Systems für die Delignifizierung und Bleiche von Zellstoffen aus unterschiedlichen Aufschlussverfahren (z.B. Sulfat-, Soda-, Sulfit-, Milox-Aufschluss) für Laub- und Nadelholzarten (z.B. Birke, Eucalyptus, Kiefer, Fichte, Hemlock, Bagasse) auf (z.B. CALL und MÜCKE, 1996; NELSON et al., 1998; FU et al., 1999; PAICE et al., 1995 b; FLINK und EK, 1997; KANDIOLLER und CHRISTOV, 2001 b; POPPIUS-LEVLIN et al., 1997 b). Die Kappazahlen der meisten getesteten Zellstoffe liegen im Bereich von 10-30. CHAKAR und RAGAUSKAS (1999 und 2000) beschäftigten sich auch mit der Delignifizierung und Bleiche ligninreicherer Zellstoffe bzw. Halbzellstoffe (Kappazahl 33,8 bzw. 75,4).

Bei der Zellstoffbehandlung wird bei Verwendung von ABTS die Freisetzung von Methanol beobachtet, was auf einen Abbau der Methoxygruppen des Lignins zurückzuführen ist. Weiter trägt die Spaltung von C $\alpha$ -C $\beta$ -Bindungen zum Ligninabbau bei (BOURBONNAIS und PAICE, 1992). SEALEY und RAGAUSKAS (1996) beobachten beim Restlignin eines mit Laccase und HBT behandelten Zellstoffs eine starke Erhöhung der Anzahl der Carboxylgruppen sowie eine Abnahme phenolischer und phenolisch-kondensierter Einheiten. POPPIUS-LEVLIN et al. (1997 a) finden ebenfalls nach der LMS-Behandlung vermehrt Carboxyl- und Carbonylstrukturen im Restlignin vor, die unter anderem durch die mögliche Entstehung von Muconsäurederivaten erklärt werden. Die Laccasebehandlung ohne Mediator führt zu keiner signifikanten Änderung der Anzahl phenolischer Hydroxylgruppen, wohingegen im Beisein von HBT eine starke Abnahme verzeichnet wird. In beiden Arbeiten werden (wie bei CRESTINI et al., 2001) die phenolischen Hydroxylgruppen des Lignins als Hauptangriffspunkt des Mediators angesehen.

Da in der Literatur zur Zellstoffbleiche die Delignifizierung im Vordergrund steht, werden bis auf einzelne Ausnahmen nur die Ergebnisse nach vollständiger LMS-Behandlung, d.h. nach der an die Inkubation mit Laccase und Mediator anschließenden alkalischen Extraktionsstufe dargestellt. Die Weißgradverbesserung geht dabei normalerweise mit der erfolgreichen Delignifizierung einher. Wird allerdings der Mediator ABTS verwendet, kommt es häufig zu Verfärbungen und Weißgradabfällen, die mit der Entstehung farbiger Kopplungsprodukte aus ABTS und Ligninfragmenten erklärt werden (PAICE et al., 1995 a; BOURBONNAIS und PAICE, 1996; NELSON et al., 1998; POTTHAST, 1998). Dieser Nachteil kann mit Einführung des Mediators HBT in die LMS-unterstützte Zellstoffbleiche umgangen werden (CALL 1994 b). Vereinzelt zeigen Arbeiten jedoch, dass auch dann an Stelle eines Bleicheffektes eine Weißgradminderung eintreten kann: FLINK und EK (1997) und POPPIUS-LEVLIN et al. (1997 b) können nur bei einem Teil der Zellstoffe nach der LMS-Behandlung neben der Kappazahlreduktion einen Weißgewinn erzielen. Bei den nicht mit Sauerstoff vorgebleichten Sulfit- und Nadelholzsulfatzellstoffen (Ausgangskappazahl 20 bzw. 25) und dem ligninreicheren Birkenzellstoff aus einem Miloxaufschluss (Ausgangskappazahl 35) führt die LMS-Behandlung zu einem Weißgradabfall. CHAKAR und RAGAUSKAS (1999 und 2000) beobachten den gleichen Effekt bei Versuchen zur Bleiche von ungebleichten Sulfatzellstoffen höherer Kappazahlen (Ausgangskappazahl 33 bzw. 75). Allen drei Autoren gelingt es jedoch, mit Hilfe einer Peroxidbleichstufe gegenüber den enzymfreien Varianten eine intensivere Delignifizierung sowie verbesserte Weißgrade zu erzielen. Auch POTTHAST (1998) beobachtet nach einmaliger LMS-Anwendung mit den Mediatoren ABTS und HBT eine Verdunkelung der Sulfatzellstoffe. Durch wiederholte LMS-Behandlungen kann sie gegenüber der enzymfreien Referenz schließlich einen Weißgewinn erzielen. Für die Weißgradminderung wird die Bildung chinoider Strukturen infolge der LMS-Behandlung verantwortlich gemacht.

Auf die Weißgradentwicklung zwischen den einzelnen Prozessschritten einer Laccase-Mediator-Behandlung und der anschließenden Extraktionsstufe wird in der Literatur zur Zellstoffbleiche kaum eingegangen. POPPIUS-LEVLIN et al. (1997 b) erzielen bei einem sauerstoffvorgebleichten Kiefernulfatzellstoff (Ausgangskappazahl 8,5) und einem Birkenzellstoff aus Milox-Aufschluss (Ausgangskappazahl 12,5) bereits durch die Inkubation mit Laccase alleine bzw. mit Laccase und Mediator einen Weißgewinn, der mit Hilfe der alkalischen Extraktion weiter erhöht werden kann. Dies gelingt jedoch nicht mit einem ungebleichten Kiefernulfatzellstoff (Ausgangskappazahl 25) und einem ligninreicheren Zellstoff aus Miloxaufschluss (Ausgangskappazahl 35). Hier trägt die alkalische Extraktion lediglich zum Ausgleich des Weißeverlustes bei.

Abweichend von der LMS-Behandlung wird vereinzelt auch über die Laccase-unterstützte Zellstoffbleiche im neutralen bis schwach-alkalischen Bereich ohne Zugabe von Mediatoren berichtet. DE CARVALHO et al. (1999) gewinnen Laccase von *Trametes versicolor*-Kulturen, die bei pH-Werten von 7 bis 8 vermehrt werden. Mit Hilfe einer vor der Chlordioxidbleichsequenz durchgeführten Laccase-Behandlung kann der Ligningehalt des Sulfatzellstoffes aus Eucalyptus gesenkt und die Endweise verbessert werden. Auch ALEKSANDROVA et al. (2001) berichten von der erfolgreichen Bleiche eines Birken-Sulfatzellstoffes mit Laccase ohne Mediator. Nach der einstufigen enzymatischen Behandlung erzielen sie einen Weißgradgewinn von 5 Punkten gegenüber der laccasefreien Referenz (Weißgrad 32%), der nach der alkalischen Extraktion auf 8 Punkte ansteigt. Allerdings geht aus dem Bericht nicht der pH-Wert der enzymatischen Inkubationsphase hervor.

Hinweise für einen möglichen Erklärungsansatz für eine Delignifizierung mit Laccase ohne Mediator – zumindest jedoch für eine intensive enzymatische Modifizierung von Lignin innerhalb des Fasergefüges - liefern FELBY et al. (1997) an Hand ihrer Untersuchungen zum Vorkommen von Radikalspezies bei mit Laccase behandelten Holzfasern. Laccase alleine ist nur in der Lage, Lignin auf oder nahe der Oberfläche der Holzfasern sowie gelöste bzw. kolloidale Bestandteile des Lignins zu oxidieren. Lignin, das sich im Inneren der Fasern befindet und für das relativ große Ligninmolekül nicht zugänglich ist (SREBOTNIK und MESSNER, 1990), kann von Laccase direkt nicht angegriffen werden. FELBY et al. (1997) vermuten jedoch, dass durch Laccase zum Phenyl-Radikal oxidierte gelöste bzw. kolloidale Ligninbestandteile - ähnlich wie synthetische Mediatoren - auf Grund ihrer geringen Größe in das Fasergefüge einwandern können, um dort mit dem Lignin zu reagieren. Bestätigt wird diese Vermutung durch eine spätere Arbeit (LUND et al., 2003). Sie konnten zeigen, dass durch Laccase 55 µmol phenolische Endgruppen pro Gramm eines Sulfatzellstoffes oxidiert wurden, obwohl nur 5 µmol den phenolischen Endgruppen des Oberflächenlignins zugeordnet werden können, so dass der Hauptanteil von 50 µmol auf Lignin im Inneren der Zellwand bezogen werden muss. Es sei jedoch daran erinnert, dass sich die oxidierende Wirkung von Laccase alleine auf phenolische Gruppen beschränkt und dass sich das Substratspektrum erst durch die Kombination von Laccase und Mediator auf nichtphenolische Einheiten erweitert.

#### **2.4.3.2 Enzymatische Kontrolle von Holzextraktstoffen**

Bei der Herstellung von Holzschliff und TMP geht ein Teil des Holzes in Lösung. Ein weiterer Teil liegt in kolloider Form als sog. „Pitch“ vor. Die gelösten Anteile, die im Wesentlichen aus Lignanen und neutralen Zuckern bestehen, beeinträchtigen die

Papierfestigkeiten. Die kolloidalen Bestandteile repräsentieren vor allem lipophile Extraktstoffe, die zu Verunreinigungen auf der Papiermaschine und zu Einbußen hinsichtlich der Papierqualität führen. Diese Extraktstoffe bestehen im Wesentlichen aus Triglyceriden, Fettsäuren, Harzsäuren, Sterolen und Sterylestern.

BEATSON et al. (1999) und BUCHERT et al. (2001) untersuchen die Möglichkeit, diese in TMP-Prozesswässern enthaltenen Stoffe mit Hilfe von Laccase zu entfernen. Das Enzym polymerisiert effektiv die niedermolekularen Lignane. Fett- und Harzsäuren werden in geringerem Umfang um- und abgebaut. KARLSSON et al. (2001) untersuchen diesen Effekt an Modellsubstanzen. Die Laccasen modifizieren in gewissem Umfang die Fett- und Harzsäurefraktionen. Bezüglich der Fettsäuren nimmt der Gehalt an Öl-, Linolen- und Pinolensäure ab. Harzsäuren, die konjugierte Doppelbindungen besitzen, wie z.B. Abietin-, Neoabietin- und Palustrinsäure, werden ebenfalls abgebaut.

### **2.4.3.3 Holzwerkstoffherstellung**

In verschiedenen Bereichen wird über den Einsatz von Laccase für die Herstellung von Werkstoffen geforscht.

Für die Holzwerkstoffherstellung (KHARAZIPOUR et al., 1997 und 1998) bieten sich zwei Wege an. Mit Lignin als Bindemittel und Laccase als Radikalbildner kann ein Zweikomponentenleim erzeugt werden. Bei entsprechender Faserqualität ist auch die Herstellung einer leimfreien Faserplatte durch Aktivierung des Oberflächenlignins möglich: Bei der Holzfaserherstellung wird zur Vereinzelung der Fasern das Lignin der Mittellamelle über den Glasübergangspunkt erhitzt. Mit Abkühlung der Fasern bildet sich auf der Oberfläche eine amorphe, glasartige Ligninkruste, welche die Bindungskräfte konventioneller Leime negativ beeinflusst, was zu erhöhtem Leimverbrauch führt. Mit der radikalbildenden Laccase kann man das Oberflächenlignin aktivieren, so dass sich beim Pressen der Platte Bindungen zwischen den einzelnen Fasern ausbilden.

Mit dem bereits erwähnten Zweikomponentenleim aus technischem Lignin und Laccase können weitere Verbundwerkstoffe mit nachwachsenden „Nichtholz“-Materialien wie Stroh oder Linters hergestellt (HÜTTERMANN et al., 1998; BRAUN-LÜLLEMANN et al., 1998) sowie organische Monomere, wie z.B. Acrylate, mit Lignin zu Copolymeren verbunden werden (MAI und HÜTTERMANN, 1998). Auch anorganische Materialien wie Mineral-, Glas-, Kohlenstoff- oder Metallfasern eignen sich für dieses Leimsystem (KHARAZIPOUR et al., 1993).

#### 2.4.3.4 Abbau umweltschädlicher Chemikalien

Ein weites Gebiet für mögliche Anwendungen von Laccase und Mediator bietet der Abbau umweltschädlicher Chemikalien.

SARIASLANI et al. (1984) beschreiben dazu den Abbau des Pestizides Rotenon mit Hilfe von Laccase und Mediator Chlorpromazin. AMITAI et al. (1998) nutzten für den Abbau des Nervengases „VX“ und des Insektizides „Diisopropyl-Amiton“ Laccase und ABTS.

Abwässer der Zellstoff-, Papier- und Textilindustrie, von Öltrafinerien und Färbereien sind oft mit aromatischen Verunreinigungen belastet, die toxisch und zum Teil krebserregend sein können (STAZI et al., 2001). Zu diesen Verunreinigungen gehören Phenole. Laccase bietet die Möglichkeit, diese zu polymerisieren. Die entstehenden Oligomere besitzen eine verringerte Wasserlöslichkeit (DEC und BOLLAG, 1990) und können durch Zentrifugation oder Filtration entfernt werden. Eine weitere Möglichkeit bietet die Adsorption an speziellen Polymeren (KRASTANOV, 2000). Die enzymatische Polymerisation von Chlorphenolen mit Hilfe von Oxidoreduktasen führt zur Dechlorierung. Über den Umbau halogenerter zu geringer oder nicht halogenerter Produkten entstehen weniger toxische und leichter biologisch abbaubare Strukturen (DEC und BOLLAG, 1990). LEONTIEVSKY et al. (2001) untersuchten die Oxidation von Trichlorphenol mit Laccase und TEMPO. Mit dem Mediator wird die Entstehung der schwierig zu handhabenden Polymere verhindert. Die Autoren erwägen deshalb den Einsatz von TEMPO zur Regulation des Polymerisationsgrades. ROSA und DURAN (2001) und MINUSSI et al. (2001) beschäftigten sich mit der Entfernung von Phenolen aus Abwässern der Sulfatzellstoffindustrie mit Hilfe immobilisierter Laccase bzw. immobilisierter Laccase und HBT. Den Abbau des stoffwechselaktiven Bisphenol A (2,2-bis(4-Hydroxyphenol)) mit Hilfe von Laccase belegen FUKUDA et al. (2001). Die Substanz wird zur Synthese von Polycarbonaten eingesetzt und ist Bestandteil entsprechender industrieller Abwässer. Phenolische Abwässer sind auch ein Problem bei der Herstellung von Olivenöl. Auch hier werden Versuche mit Laccase durchgeführt (D'ANNIBALE et al., 1999 und 2000).

Mit dem Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH) beschäftigt sich intensiv die Arbeitsgruppe um HÜTTERMANN. In der weit gefassten Stoffgruppe befinden sich Substanzen, die mit Laccase alleine erfolgreich oxidiert werden können. Andere lassen sich nur im LMS umsetzen. Zum Teil besitzt das LMS bei Stoffen, die sich bereits mit Laccase alleine umsetzen lassen, einen erhöhenden Effekt auf die Substratumsetzung. So ist die Umsetzung von Anthracen bereits mit

Laccase alleine erfolgreich, doch wird sie deutlich gesteigert, wenn Laccase in Kombination mit HBT oder ABTS eingesetzt wird. Phenothiazine als Mediator bringen keinen Effekt (JOHANNES et al., 1996). Acenaphthene und Acenaphthylene können mit Laccase alleine und mit Laccase und HBT vollständig umgesetzt werden. Der Mediator ABTS bleibt hier wirkungslos (JOHANNES et al., 1998). In einer umfassenderen Studie untersuchen MAJCHERCZYK et al. (1998) 14 verschiedene PAHs, von denen 11 mit Laccase alleine bei Umsetzungsraten von 10 bis 35% oxidiert werden können (Acenaphtylen, Anthracen, Benzo[a]pyren, Acenaphthen, Fluoranthen, Pyren, Benzo[a]anthracen, Chrysen, Benzo[b]fluoranthen, Benzo[k]-fluoranthen, Perylen). Mit HBT als Mediator können die Umsetzungsraten von 5 PAHs, die bereits Laccasesubstrate sind (Acenaphtylen, Anthracen, Benzo[a]pyren, Acenaphthen, Perylen) und ein PAH, das von Laccase alleine nicht umgesetzt werden kann (Fluoren), zu 100 % oxidiert werden. Für zwei weitere Laccasesubstrate wird die Oxidierbarkeit auf 50 % erhöht (Pyren Benzo[a]anthracen). ABTS erweist sich als wesentlich ineffektiver. Bei nur zweien der Substrate, deren Umsetzbarkeit mit HBT gesteigert werden kann, wird dieser Effekt auch mit ABTS erzielt (Anthracen und Benzo[a]pyren).

#### **2.4.3.5 Textilindustrie**

In der Textilindustrie bieten sich zwei Anwendungsbereiche für den Einsatz von Laccase an. Zum einen in der Textilveredelung, zum anderen für die Klärung von mit Textilfarben belasteten Abwässern.

##### **Textilveredelung**

Der Einsatz von Laccase und Mediator als Bleichsystem für Indigo - gefärbte Jeansstoffe hat sich in der Praxis etabliert. Wird das LMS niedrig dosiert mit einer Cellulase-Behandlung kombiniert, erhält man den optischen Effekt der „stone-washed“ Jeans. Alternativ zur Hypochloritbleiche können mit entsprechender Laccasedosierung neue optische Effekte erzielt werden. Bei Jeansstoffen, die aus weißen und blauen Garnen hergestellt werden, wird allein der indigoblaue Faden gebleicht. Der weiße Baumwollfaden behält seine ursprüngliche Farbe und fällt damit dunkler aus als bei Anwendung der Hypochloritbleiche. Wird also das LMS bei Stoffen angewandt, die aus zwei verschiedenfarbigen Fäden hergestellt wurden, von denen nur die Farbe des einen Fadens ein Substrat für das LMS darstellt, können neue optische Effekte erzielt werden, die mit Hilfe der konventionellen Bleiche nicht erzielbar sind (NOVO NORDISK, 1997). Derzeit laufen Untersuchungen zur Bleiche

indigogefärbter Fasern mit Laccase bei Verzicht auf einen Mediator (CAMPOS et al., 2001 a und b).

### **Klärung von Abwässern der Textilindustrie**

Die Textilindustrie ist der größte Verbraucher synthetischer Farbstoffe (EPA, 1996). 10-15% der eingesetzten Farbstoffmenge werden bei Textilfärbprozessen im Abwasser wiedergefunden (BROWN et al., 1981). Viele dieser Farbstoffe besitzen Azo-, Nitro- oder Sulfo-Gruppen und sind auf Grund der Möglichkeit, beim Abbau unter anaeroben Bedingungen krebserregende aromatische Amine zu bilden, ökologisch wie toxikologisch bedenklich (REYES et al., 1999; SOARES et al., 2002). Laboruntersuchungen zeigen, dass Laccase alleine und das LMS zum Abbau dieser Farbstoffe nutzbringend eingesetzt werden können. Bei Untersuchungen zur Anwendung des LMS wird dabei sehr oft der Mediator HBT gewählt.

ABADULLA et al. (2000) zeigen, dass mit einer Laccase von *T. hirsuta* ohne Mediatoreinsatz Farbstoffe vom Triarylmethan-, Indigo-, Azo- und Anthrachinon-Typ abgebaut werden können. REYES et al. (1999) untersuchen 38 Anthrachinon-, Oxazin-, Phtalocyanin- und Azo-Farbstoffe, die in der Textilindustrie verwendet werden. Laccase alleine bleicht 13 Farbstoffe. Mit Laccase und HBT wird die Zahl bleichbarer Farbstoffe verdoppelt. Häufig kann dabei die Entfärbungsrate deutlich gesteigert werden. In drei Fällen wird die Entfärbungsrate allerdings vermindert.

Zur Frage, ob ein Farbstofftyp mit Laccase alleine oder besser mit dem LMS behandelt werden kann, können in der Literatur voneinander abweichende Ergebnisse gefunden werden, was letztlich die große Bandbreite der auf dem Markt befindlichen Farbstoffe widerspiegelt. So beobachteten ABADULLA et al. (2000) und CAMPOS et al. (2001 a und b) mit Laccase alleine den Abbau eines Indigo-farbstoffes. WONG und YU (1999) haben mit Laccase alleine keinen Erfolg, wohl aber bei Verwendung von Laccase und Mediator ABTS. Übereinstimmend wird jedoch beobachtet, dass Farbstoffe vom Anthrachinon-Typ bereits mit Laccase alleine abgebaut werden können. Remazol Brilliant Blue R, ein weiterer Farbstoff vom Anthrachinon-Typ, lässt sich dagegen nur im LMS in Verbindung mit HBT oder Violursäure zufriedenstellend abbauen (SOARES et al., 2001 a und b). Disazo-Farbstoffe können bei entsprechender molekularer Struktur mit Laccase alleine abgebaut werden (SOARES et al., 2002; SCHLIEPHAKE et al., 2000). Der Einsatz des Mediators HBT ergibt keine Veränderung. Violursäure führt dagegen in geringsten Mengen eingesetzt zur Inhibierung der Abbaureaktion (SOARES et al., 2002).

#### **2.4.3.6 Bodensanierung**

Ein weiteres Forschungsgebiet ist die Anwendung von Laccase ohne Mediator für die Dekontaminierung von mit Xenobiotica phenolischen Charakters belasteten Böden. Die Idee besteht darin, die Chemikalien mit Hilfe des Enzyms zu polymerisieren und an den Humus zu binden. Die so komplexierten Xenobiotica sind weniger toxisch und die Menge frei verfügbarer Giftstoffe im Boden, die mit der Bodenfauna und -flora interagieren kann, wird minimiert. Durch die verringerte Mobilität wird so das Risiko einer Grundwasservergiftung reduziert. Die Freisetzung der an den Humus gebundenen Xenobiotica erfolgt im Allgemeinen so langsam, dass sie mineralisiert oder wieder immobilisiert werden können. Dadurch ist das Risiko, dass Xenobiotica letztlich zu einem späteren Zeitpunkt toxisch in Erscheinung treten, gering (BOLLAG, 1992).

#### **2.4.3.7 Weitere Anwendungsmöglichkeiten**

Darüber hinaus gibt es noch weitere Möglichkeiten für Laccase, auf die aber in diesem Rahmen nicht näher eingegangen werden soll. Dies sind Anwendungen in der organischen Synthesechemie (POTTHAST et al, 1995; POTTHAST et al., 1996; BAKER et al., 1996; CAI et al., 1993; OSIADACZ et al., 1999) sowie in der diagnostischen Chemie (GHINDILIS et al., 1992; AGEMATU, et al., 1994; ROY und ARCHIBALD, 1994; PETER und WOLLENBERGER, 1997; XU, 1999). In der Lebensmittelchemie ist der Einsatz von Laccase zur Klärung von Rotwein (ZAMORANI et al., 1995), zur Verbesserung der Haltbarkeit von Bier (MATHIASSEN, 1995), zur Entfernung von Phenolen aus Fruchtsäften (PIACQUADIO et al., 1997) und zur Entfernung von Sauerstoff aus Lebensmitteln (PETERSEN und MATHIASSEN, 1996) möglich.

## 2.5 Enzymatisches Deinking

Versuche zur Einführung von Enzymen in die Deinking-Technologie wurden aus mehreren Gründen durchgeführt. Dazu zählen die Reduzierung der Zerkleinerungsdauer und der dafür notwendigen Energie, die Verbesserung der Entwässerbarkeit des Sekundärfaserstoffs auf der Papiermaschine zur Erzielung höherer Papiermaschinengeschwindigkeiten, die Stickybekämpfung sowie die Einsparung der üblichen Deinkchemikalien (Natronlauge, Wasserglas, Wasserstoffperoxid), um letztlich die Verwirklichung eines dem alkalischen Verfahren konkurrenzfähigen Neutralverfahrens zu verwirklichen. Das heißt, dass bei Vermeidung der alkalibedingten Vergilbung Druckfarbenablösung, Schmutzpunktaustrag und Weißgrad im Neutralverfahren besser abschneiden sollen.

In der Literatur gibt es inzwischen zahlreiche Beispiele zur Anwendung von Enzymen zur Sekundärfaserstoffaufbereitung. Dabei werden verschiedene Enzymtypen auf ihre Eignung hin untersucht. Zu den Cellulose abbauenden Cellulasen zählen die Cellobiohydrolasen I und II, die vom reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Ende der Celluloseketten her kristalline Cellulose angreifen sowie Endoglucanasen, die amorphe Cellulose abbauen. Zu den für das Deinking relevanten Hemicellulasen zählt Xylanase. Sie baut ihrem Namen entsprechend Xylan ab. Daneben wird mit Amylasen, Pectinasen und Lipasen gearbeitet. Seltener wird von Untersuchungen mit Esterasen und Laccasen für die Aufbereitung von Sekundärfaserstoffen berichtet.

### 2.5.1 Cellulasen und Hemicellulasen

Am intensivsten wird der Einsatz von Cellulose und Hemicellulose abbauenden Enzymen zur Aufarbeitung von Sekundärfaserstoff untersucht. Dabei können zwei Haupteffekte beobachtet werden.

Der erste ist die mit Hilfe von Cellulase und Xylanase herbeiführbare Senkung des Entwässerungswiderstandes des Sekundärfaserstoffes. Entsprechend können Papiermaschinen bei höheren Geschwindigkeiten betrieben und damit die Produktivität erhöht werden. Dieser Effekt wurde von FUENTES et al. 1988 erstmalig beobachtet und in der Folge von verschiedenen Autoren bestätigt (POMMIER et al., 1989 und 1990; PUTZ et al., 1990).

Die Verbesserung der Entwässerungseigenschaften erfolgt durch den Abbau amorphen Materials, das sich auf den Faseroberflächen befindet und eine große Affinität zum Umgebungswasser besitzt (POMMIER et al., 1989; JACKSON et al., 1993;

STORK, 1994). Beim amorphen Material handelt es sich zum größten Teil um mechanisch fibrillierte Cellulose. Der Abbau der Feinstoffe erfolgt daher im Wesentlichen durch Endoglucanasen. Den größten Einfluss besitzt ein Enzymmix aus Endoglucanasen und Xylanasen. Die synergistische Wirkung kommt dadurch zu Stande, dass Xylanasen Oberflächenxylan, das auf den Langfasern ausgefallen ist, abbauen können, so dass für die Endoglucanase die Substratzugänglichkeit erhöht wird (STORK und PULS 1994). Der Effekt von Xylanase alleine ist dagegen gering.

Cellulasen und Xylanasen wird die Verbesserung der Druckfarbenablösung und des Druckfarbenaustrags zugeschrieben. Dieser Effekt wird vor allem bei Arbeiten unter Verwendung amerikanischer Zeitungen (OW und EOM, 1990; PRASAD, 1992 und 1993 ) sowie xerox- und laserbedruckter Deinkware beobachtet (HEISE et al., 1996; FRANKS und MUNK, 1995; SYKES et al., 1995; YANG et al., 1995). Die enzymunterstützt deinkten Stoffe besitzen vergleichbare oder höhere Weißgrade und einen geringeren Schmutzpunktgehalt als rein chemisch deinkte Stoffe.

Für die deinkende Wirkung der Cellulasen und Xylanasen gibt es verschiedene Erklärungsversuche.

Eine Vorbehandlung mit Cellulase kann zu einer Verringerung der Desintegrierzeit und damit zu einer Verringerung des Energieeintrages bei der Altpapierauflösung führen (KIM et al., 1991), indem Zwischenfaserbindungen enzymatisch geschwächt werden. Bei Abstimmung von Enzym- und Energieeintrag ist es möglich, schonend zu dispergieren, so dass die Druckfarbenpartikel in einen für die Flotation günstigen Durchmesserbereich fraktioniert werden (JEFFRIES et al., 1996).

ZEYER et al. (1993) vermuten, dass die Faser-Oberflächen-Reibung (Faser-Faser-Reibung) eine wesentliche Rolle beim enzymatischen Deinking spielt. Zwar decken die Druckfarbenpartikel die Fasern ab und schützen sie vor einem Enzymangriff. Doch können Druckfarbenpartikel durch die Einwirkung mechanischer Energie und der daraus resultierenden Faser-Faser-Reibung elastisch angehoben und der Kristallinitätsgrad der Celluloseketten im Umfeld der Druckfarbenpartikel gesenkt werden. Dadurch wird an diesen Stellen die Zugänglichkeit der Cellulose für Cellulasen (Endoglucanasen) erhöht. Die Cellulosefaser wird hier vermehrt abgebaut, und es erfolgt die Ablösung der Druckfarbe von der Faseroberfläche.

Die Wirkungsweise einer Cellulase-Xylanase-Mischung kann aber auch als Reinigungseffekt der Faseroberflächen von Mikrofibrillen und Feinanteilen interpretiert werden (JACKSON et al., 1993; JACKSON et al., 1994; JEFFRIES et al., 1994). Mit dem Abbau dieser Faserbestandteile können gleichzeitig Druckfarbenpartikel abge-

löst werden (POMMIER et al., 1989). Gleichzeitig werden in der enzymatisch behandelten Altpapiersuspension die Oberflächen abgelöster Druckfarbenpartikel von hydrophilem, anhaftendem Fasermaterial befreit, wodurch sie hydrophober werden. Dies verbessert den Austrag der Druckfarbenpartikel während der Flotation (JEFFRIES et al., 1994; SANCIOLO, 2000).

Einen großen Einfluss auf die Intensität einer Cellulase- und Hemicellulasebehandlung besitzt die Beschaffenheit des Faserstoffes, aus dem das Altpapier besteht (STORK, 1994). Während Holzstoffe durch ihre Ligninmatrix auf der Faseroberfläche vor einem Cellulaseabbau weitgehend geschützt sind und hohe Enzymdosierungen für einen entsprechenden Effekt benötigen, reagieren holzfreie Faserstoffe bei deutlich geringeren Dosierungen. Dieser Unterschied der Faserbeschaffenheit wirkt sich bei der Entwicklung der Festigkeitseigenschaften deutlich aus (STORK, 1994). Die Auswahl der richtigen Dosierung kann daher bei gemischten Altpapierqualitäten problematisch werden. Während die holzfreie Faserfraktion durch einen übermäßigen Enzymangriff unerwünschter Weise fibrilliert oder in Bruchstücke zerlegt wird, kann die holzstoffreichere Fraktion gerade erst beginnen, auf die Enzymbehandlung in beabsichtigter Weise zu reagieren.

### 2.5.2 Amylasen und Pektinasen

Der Einsatz von Amylasen und Pektinasen kann dann überlegenswert sein, wenn stärkegeleimte oder gestrichene Papiere deinkt werden sollen, sofern ihr Strich nennenswerte Stärke- oder Pektinanteile besitzt. Obwohl gerade gestrichene Papiere als besonders leicht deinkbar gelten (STETTLER, 1979; FRANK, 1993), haben LOPEZ et al. (2001) eine leichtere Stoffauflösung und ZEYER et al. (1993) eine verbesserte Druckfarbenentfernung mit diesen Enzymen feststellen können.

Amylasen bauen Stärke und Glykogen entweder direkt oder über Dextrine zu Maltose und Glucose ab. Wie bei den Cellulasen gibt es auch hier verschiedene Formen.  $\alpha$ -Amylasen greifen Stärke innerhalb der Kette an, indem sie (ähnlich Endoglucanase bei Cellulose)  $\alpha$ -1,4-glykosidische Bindungen spalten und Stärkebruchstücke produzieren.  $\beta$ -Amylasen bauen dagegen Stärke vom nicht reduzierenden Kettenende her ab (ähnlich Cellobiose II an Cellulose) und setzen dabei solange  $\beta$ -Maltose frei, bis das Enzym auf eine  $\alpha$ -1,6-Verzweigung trifft (DELLWEG et al., 1992).  $\beta$ -Amylasen eignen sich durch die Freisetzung des löslichen Zuckers weniger für einen Einsatz in der Papierindustrie. Wesentlich interessanter für das Deinking ist die  $\alpha$ -Amylase, da sie mit relativ wenigen Spaltungsreaktionen eine Fragmentierung der Stärke erzielen kann.

### 2.5.3 Lipasen

Lipasen sind Ester spaltende Enzyme, die Fette (Triglyceride) hydrolytisch in Glycerin und Fettsäuren zerlegen. Dabei werden bevorzugt Fettsäuren abgespalten, die mit dem ersten und dritten C-Atom des Glycerins verestert sind. Dagegen wird die veresterte Fettsäure in Position 2 nur sehr langsam oder gar nicht hydrolysiert (DELLWEG et al., 1992).

Die Struktur pflanzenöhlhaltiger Bindemittel von ungealterten Druckprodukten entspricht der von Fetten und Harzen, weshalb Lipasen zur Druckfarbenentfernung eingesetzt werden können, indem durch Spaltung der Esterbindungen die Bindemittelstruktur aufgelockert wird. Dadurch ist es möglich, Druckfarben leichter abzulösen, die Faseroberfläche von hydrophoben Verunreinigungen zu reinigen und den Weißgrad des deinkten Stoffes zu verbessern (OW et al., 1996; BERGER, 1998; HERMANN, 1999). Der erzielbare Effekt der Lipasen verringert sich allerdings mit zunehmender Lagerungszeit (BERGER, 1998). Durch Autoxidationsprozesse (ASPLER et al., 1995) kommt es zu einer allmählichen Abnahme an veresterten Strukturen innerhalb der Druckfarbenbindemittel. Damit nimmt die Anzahl funktioneller Gruppen ab, die dem Enzym Lipase als Substrat dienen können.

### 2.5.4 Esterasen

FITZHENRY et al. (2000) verfolgen den Einsatz von Esterasen für die Kontrolle von klebenden Verunreinigungen (Stickies), die bei der Aufarbeitung von Altpapier zu Sekundärfaserstoff für Recyclingpapiere anfallen und zu Verunreinigungen auf den Papiermaschinen führen. Makrostickies bilden sich aus Klebstoffanteilen, die beispielsweise als Gummierungen von Briefumschlägen, Adressenetiketten oder selbstklebenden Notizzetteln im Altpapier enthalten sind. Esterasen vermögen als Substrat geeignete Kleber, wie z.B. Polyvinylacetat, anzugreifen. Durch Spaltung der Esterbindungen werden Makrostickies, die besonders zur Ablagerung an der Papiermaschine neigen, fragmentiert und in ihrer Klebrigkeit reduziert, so dass sie mit dem Papier ausgetragen werden können.

### 2.5.5 Laccasen

CALL (1990) sowie CALL et al. (1990) berichten von einem Ansatz, bei dem mit Laccase bei entsprechender Steuerung des Redoxpotentials mit Hilfe von Reduktions- (z.B. Ascorbinsäure, Dithionit, Natrium-Bisulfit) und Oxidationsmitteln (z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{O}_2$ ) in einem sauren Verfahren (pH 2-5) gegebenenfalls unter Zusatz verschiedener Schwermetallsalze Altpapier behandelt wird. CALL und STRITTMATTER (1992) berichten weiter, dass dieses Verfahren auch unter neutralen Bedingungen unter Zugabe spezieller Zusatzstoffe verwirklicht werden kann, ohne jedoch diese - vermutlich aus patentrechtlichen Erwägungen - zu nennen.

Sehr allgemein gehaltenen wird in einem als strategisch einzuschätzenden Patent (FRANKS, 2001) der kombinierte Einsatz von verschiedenen Enzymklassen zur Druckfarbenentfernung von Altpapier beschrieben. Dabei kommt der Laccase, gegebenenfalls in Kombination mit einem geeigneten Mediator, die Aufgabe zu, geeignete Farbpartikel („*any dye which is a substrate of laccase*“) zu entfärben.

Weitere Arbeiten zum Laccase-unterstützten Deinken von Altpapier sind nicht bekannt. Die Literatur liefert zu diesem Thema also kaum Informationen.

### 2.6 Ziel der Arbeit

Der Literaturüberblick zeigt, dass Laccase in Verbindung mit oder ohne Mediator ein Enzym ist, das - im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen - ein weit gefasstes Substratspektrum besitzt und auf Grund des radikalischen Reaktionscharakters eine Vielzahl von Reaktionen katalysieren kann, die zu verschiedenen Produkten führen können. Aus Sicht des Deinkings ist interessant, dass insbesondere veretherte (oxidierte) Strukturen sowie Fette und Harze abgebaut werden können. Fette, Harze und oxidativ ausgehärtete Strukturen sind auch Bestandteile von Druckfarben. Diese könnten also Substrate für Laccase bzw. das LMS darstellen.

Ziel dieser Arbeit ist zu untersuchen, ob das oxidative Potential der Laccasen bzw. des Laccase-Mediator-Systems für das Deinking von Haushaltssammelware unter den praxisnahen Bedingungen eines neutralen Verfahrens (pH 7-8,5; Verzicht auf erhöhten Sauerstoffdruck) nutzbare Effekte bieten kann, um das Deinking-Ergebnis mit Blick auf Druckfarbenablösung und Schmutzpunktreduzierung zu verbessern.

### 3 Experimenteller Teil – Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Enzyme

Die Laccasen von *Trametes hirsuta* (NS 51002) und *Myceliophthora thermophila* (NS 51003) wurden von der Firma Novozymes Deutschland bereitgestellt. Die Laccase von *Trametes versicolor* stammte vom Consortium für elektrochemische Industrie GmbH.

##### 3.1.2 Chemikalien

###### 3.1.2.1 Mediatoren

ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) wurde von der Firma Fluka bezogen, HBT (1-Hydroxybenzotriazol) und VA (Violursäure) von Aldrich sowie Syringaldazin (4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd) von Sigma.

###### 3.1.2.2 Pufferlösungen

Die wichtigsten Pufferlösungen waren 0,1 M Essigsäure-Natriumazetat-Puffer pH 4,5, 0,2 M Phosphat- 0,1 M Zitronensäure-Puffer, 0,2 M TRIS- 0,1 M Malonat-Puffer verschiedener pH-Werte sowie 2,5 mM Ca-Acetat-Essigsäure-Puffer. Hersteller für das Natriumazetat war Baker, für TRIS Serva, für Natriummalonat Sigma und für die restlichen Chemikalien Merck.

###### 3.1.2.3 Chemikalien für Deinking und Bleiche

Natronwasserglas Typ 37/40 und Olinor RST Na wurden von der Firma Nopco Paper Technology bezogen. Bei Olinor RST Na handelte es sich um eine Natriumseife, die für das Flotationsdeinking als Sammler eingesetzt wurde. Wasserstoffperoxid (33%ig) stammte von Riedel-de Haën.

### 3.1.3 Faserstoffe

#### 3.1.3.1 Primärfaserstoffe

Sauerstoffgebleichter, nicht getrockneter Nadelholz-Sulfatzellstoff nach Q-Stufe (Kappazahl 8,4, Weißgrad 35% ISO) stammte von der Zellstoff- und Papierfabrik Rosenthal, Blankenstein. Fichten-Holzschliff in ungebleichter und gebleichter Form (Ligningehalt\* 30%, Weißgrad 57% ISO bzw. Ligningehalt\* 30%, Weißgrad 67% ISO) wurde von der Firma UPM-Kymmene Augsburg, ungebleichter und gebleichter Nadelholz-TMP (Ligningehalt\* 29%, 49% ISO, bzw. Ligningehalt\* 27%, Weißgrad 65% ISO) von der Firma Norske Skog Walsum zur Verfügung gestellt.

#### 3.1.3.2 Sekundärfaserstoffe

Als Modellsubstrat für gealterte Haushaltssammelware wurden die Zeitungen bzw. Zeitschriften Spiegel (LWC-Papier), Stern (SC-Papier), FAZ und Express zu gleichen Teilen verwendet. Die FAZ repräsentierte dabei vom Druckbild qualitativ hochwertige Zeitungen, die Gazette Express dagegen qualitativ geringwertigere Produkte mit hohem Farbabrieb.

Unbedrucktes Standardzeitungsdruckpapier (45 g/m<sup>2</sup>) stammte von der Firma StoraEnso Maxau, unbedruckte Magazinpapiere von UPM Kymmene Rauma (LWC, 54 g/m<sup>2</sup>) und MD Dachau (SC, 56 g/m<sup>2</sup>).

DIP (**d**einked **p**ulp) stammte von der Firma Steinbeis Temming Papier Glückstadt. Der Stoff wurde am Ende einer Deinkanlage mit einfachem Loop von der Doppelsiebpresse vor dem Disperger entnommen.

---

\* bestimmt als Hydrolyserückstand

### 3.2 Deinking-Geräte

Die Deinking-Versuche wurden in Anlehnung an die Hausmethoden der Firmen Nopco Paper Technology und Voith Paper Fiber Systems durchgeführt. Deswegen seien an dieser Stelle die eingesetzten Geräte genannt:

|                   |                                                                                                             |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aktenvernichter:  | Ideal Modell 2600 CC, Schnittbreite 2 mm, Schnittlänge 15 mm                                                |
| Kneter:           | Planetenrührmaschine NCM 20, Fa. Hobart<br>Universal-Küchenmaschine Modell N-50, Fa. Hobart                 |
| Dissolver:        | TD 200, Fa. Pendraulik                                                                                      |
| Flotationszellen: | 10 Liter Flotationszelle, Fa. Degussa<br>25 Liter Laborflotationszelle LFL25, Fa. Voith Paper Fiber-systems |
| Waschzelle:       | 10 Liter Waschzelle, Fa. Degussa                                                                            |

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Methoden zur Charakterisierung von Enzympräparaten

##### 3.3.1.1 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Laccase

Die Bestimmung der Enzymaktivität von Laccase erfolgte in Anlehnung an die Methode "CoM-005" des Consortiums für elektrochemische Industrie GmbH. Gemessen wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten im optischen Test die Zunahme der Grünfärbung von ABTS als Extinktionszunahme bei 420 nm im Spektralphotometer (UVIKON 931, Fa. Kontron Instruments). Die Standardtemperatur betrug 55°C, der pH-Wert, soweit nichts anderes erwähnt wird, pH 4,5.

Für die Durchführung des Tests wurde eine Pufferlösung aus 0,2 molarem Dinatriumhydrogenphosphat und 0,1 molarer Zitronensäure sowie eine Lösung aus 44 mg ABTS und 10 ml bidestilliertem Wasser hergestellt, die im Dunklen aufzubewahren war. Die zu testenden Laccasepräparate wurden so weit verdünnt, dass die entsprechende Extinktionsänderung im linearen Bereich verlief. Der Nullabgleich des Spektrometers erfolgte gegen Luft (bzw. gegen die leere Küvette). Pro Messung wurden 1855 µl Pufferlösung und 126 µl ABTS-Lösung vorgegeben. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 20 µl Enzymlösung. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte über die Formel:

$$1 \text{ U/ml} = \frac{\Delta E_{420}}{t} * \frac{10^3}{\epsilon_{\text{ABTS},420\text{nm}} * d} * \frac{V * F}{v}$$

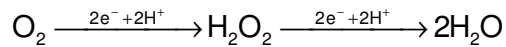
|      |                                                |   |                                                                                                            |
|------|------------------------------------------------|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| mit: | U/ml                                           | = | Units pro ml Enzymlösung                                                                                   |
|      | $\Delta E_{420}$                               | = | Extinktionsänderung bei 420 nm im linearen Bereich                                                         |
|      | t                                              | = | Reaktionszeit in min                                                                                       |
|      | $10^3/(\Delta_{\text{ABTS},420\text{nm}} * d)$ | = | Umrechnung auf $\mu\text{mol}$ umgesetztes Substrat pro ml, mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten |
|      | $\Delta_{\text{ABTS},420\text{nm}}$            | = | molarer Extinktionskoeffizient: $3600 \text{ l} * \text{mol}^{-1} * \text{mm}^{-1}$                        |
|      | d                                              | = | Länge des Lichtweges durch die Küvette in mm                                                               |
|      | V                                              | = | Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes in $\mu\text{l}$                                                       |
|      | v                                              | = | Volumen der Enzymprobe in $\mu\text{l}$                                                                    |
|      | F                                              | = | Verdünnungsfaktor zur Ausgangslösung des Enzyms                                                            |

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

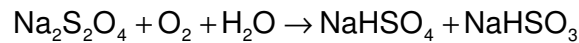
### 3.3.1.2 Bestimmung der Sauerstoffumsetzungsrate von Laccase

Der Sauerstoffverbrauch von Laccasen bei der Umsetzung der Mediatoren ABTS, VA und HBT wurde mit Hilfe einer Clark-Elektrode (Ag/Pt Elektrode) polarographisch bestimmt (KEITH und WALKER, 2000). Die Geräteanordnung bestand aus einer Ag/Pt - Elektrode (Fa. Bachofer) mit Magnetrührer, einer Hansatech Bachofer O<sub>2</sub> electrode control box CB1D und einem Servogor Z110 Schreiber von BBC Goerz. Die doppelwandige Elektrode wurde extern mit Hilfe eines Thermostaten beheizt (45°C). Das Reaktionsvolumen von zwei Milliliter enthielt 160 Units Laccase und 100  $\mu\text{l}$  0,08 mM Mediatorlösung in 0,2 M Natriumphosphat- 0,1 M Zitronensäure-Puffer (pH 4,5) bzw. 0,2 M TRIS- 0,1 M Malonat-Puffer (pH  $\geq$  7). Der Sauerstoffverbrauch wurde jeweils für einen Zeitraum von 15 min aufgezeichnet.

Die Pt-Kathode wurde vom Untersuchungsmedium durch eine Teflonmembran getrennt und über KCl-getränktes Papier mit einer ringförmigen Ag-Anode verbunden. Bei einer Polarisationsspannung von etwa 0,6 Volt zwischen beiden Elektroden wurde an der Pt-Elektrode O<sub>2</sub> über H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O reduziert. Der dadurch ausgelöste Stromfluss war der Konzentration und Diffusionsgeschwindigkeit des O<sub>2</sub> proportional:



Bei konstanter Temperatur und unter dauerndem Rühren mit Hilfe eines Magnetrührers wurde zunächst der Stromfluss bei Sättigung des Mediums (0,5 - 1 ml in der Küvette) mit Luftsauerstoff am Schreiber registriert. Zur Eichung wurden dann bei laufendem Schreiber einige Kristalle Dithionit zugegeben, die den Luftsauerstoff gemäß der Formel



verbrauchten. Die neue Schreiberstellung entsprach  $\text{O}_2$  - Freiheit des Mediums. Nach jeder Messung wurde die Küvette leergesaugt und mehrmals mit der entsprechenden Pufferlösung nachgewaschen. Ausgewertet wurden die Steigungen der vom Schreiber aufgezeichneten Signale. Die Steigungen der Laccase- und Mediatorversetzten Proben wurden dazu ins Verhältnis zur Steigung der Eichkurve gesetzt und der jeweilige Prozentwert ermittelt.

### **3.3.2 Methoden zur enzymunterstützten Druckfarbenablösung und –entfernung von Sekundärfaserstoffen**

#### **3.3.2.1 Alterung der Modellmischung für Haushaltssammelware**

Die künstliche Alterung der Zeitungen und Zeitschriften für die Altpapier-Modellmischung für deutsche Haushaltssammelware erfolgte gemäß DIN 54606 Teil 1 für 144 h bei 60 °C, wobei nur 3 Blätter übereinander liegen durften.

#### **3.3.2.2 Enzymatische Behandlung von Sekundärfaserstoffen**

Die Suspendierung der Altpapier-Modellmischung erfolgte in mehreren Schritten in Anlehnung an die „Arbeitsvorschrift zum Deinking von Altpapier“ der Firma Nopco Papertechnology.

Zunächst wurden die Drucke mit Hilfe eines Aktenvernichters (Fa. Ideal, Typ 2601) in 2\*15 mm kleine Schnipsel zerschnitten. Nach Abwiegen der benötigten Probenmenge wurde mit vortemperiertem Leitungswasser eine Stoffdichte von 25 Prozent

eingestellt. Dann wurde die Probe 15 Minuten lang mit einem Knetter (Fa. Hobart) zu einem Teig verarbeitet. Der Ansatz wurde dann in ein Aufschlaggefäß überführt, mit Leitungswasser eine Stoffdichte von 4 Prozent eingestellt und mit Hilfe eines Dissolvers (Fa. Pendraulik, Typ TD 200) 5 Minuten lang aufgelöst. DIP wurde sofort bei 4 Prozent Stoffdichte aufgelöst. Hier konnte die Knetstufe entfallen.

Die Deinking-Versuche wurden in 2 verschiedenen Maßstäben (100 und 230 g otro Stoff) durchgeführt. Entsprechend mussten die Stoffe mit verschiedenen Gerätekonfigurationen aufgeschlagen werden (vergl. Tab.3.1).

**Tab. 3.1:** Gerätekonfigurationen für die Stoffauflösung für verschiedene Deinking-Maßstäbe

| Maßstab<br>[g otro] | Knetter<br>(Arbeitstempo) | Dissolver / Scheibendurchmesser /<br>Arbeitstempo     | Aufschlaggefäß                |
|---------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 100                 | N50 / Stufe 1             | TD 200 / 90 mm /<br>Stufe 2 (1865 min <sup>-1</sup> ) | 5000 ml<br>(Glasstutzen)      |
| 230                 | NCM20 / Stufe 2           | TD 200 / 110 mm /<br>Stufe 1 (930 min <sup>-1</sup> ) | 10 000 ml<br>(Edelstahleimer) |

In der Mehrzahl der Versuche wurde im 100 g-Maßstab gearbeitet. Die Versuche des Kapitels 4.2.4.1 erfolgten im 230 g-Maßstab.

Nach Abschluss der Stoffauflösung wurde der in der Regel neutrale pH-Wert mit Hilfe von Essigsäure und NaOH eingestellt.

Sofern die enzymatische Inkubationsphase bei pH 4,5 durchgeführt werden sollte, wurde an Stelle von Leitungswasser ein 2,5 mM Ca-Acetat-Essigsäure-Puffer mit entsalztem Wasser angerührt. Das Calciumacetat diente dabei zur Gewährleistung einer ausreichenden Wasserhärte. Der pH-Wert wurde mit Eisessig eingestellt.

Nach Zugabe von Enzym- und ggf. Mediator (Aceton wurde als Lösungsvermittler des schlecht löslichen HBTs verwendet) wurde der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Die eingesetzte Enzymdosis wird als Aktivität in „U/g“ (Units Laccase pro Gramm ofentrockener Stoff), die Mediatorosis als „%“ (Prozent Mediator bezogen auf Gramm ofentrockener Stoff) angegeben.

Im Falle der alkalischen Referenz wurden 2% Natronlauge (50%ig), 2% Wasserglas, (Typ 37/40) und 2% Wasserstoffperoxid (33%ig) vor dem Verkneten zugegeben. Eine Zugabe von Laccase oder Mediator unterblieb. Ebenso die Einstellung des pH-Wertes.

Die Zugabe des Sammlers Olinor RST Na (0,4%) erfolgte zu Flotationsbeginn.

Nach Abschluss der Probenvorbereitung für die enzymatische Inkubation wurde der Stoff in doppelwandige, offene Temperiergefäße überführt und 90 Minuten lang mit Hilfe eines Blattrührers bei 60 UPM verrührt, um gleichmäßige Reaktionsbedingungen bezüglich Temperatur und Sauerstoffgehalt während der Inkubationsphase gewährleisten zu können.

### 3.3.2.3 Flotationsdeinking von Sekundärfaserstoffen

Das Flotationsdeinking erfolgte in Anlehnung an die „Arbeitsvorschrift zum Deinking von Altpapier“ der Firma Nopco Paper Technology GmbH. Dabei kam in der Regel eine 10-Liter Flotationszelle der Firma DEGUSSA zum Einsatz. Daneben stand für die Anfertigung größerer Probenmengen eine VOITH-Flotationszelle zur Verfügung (vergl. Tab. 3.2). Vor Beginn der Flotation wurde der pH-Wert mit Natronlauge auf 9,5 erhöht, um eine Fortsetzung der enzymatischen Reaktion zu verhindern. Nach Zugabe des Sammlers Olinor RST Na (0,4%) wurde 8 Minuten lang bei 1 Prozent Stoffdichte flотиert. Nach Abschluss der Flotation wurde der pH-Wert des Gutstoffes auf pH 7 eingestellt und die Proben für die Prüfblattbildung entnommen (2 Nutschblätter für die Weißgrad- und 5 Rapid-Köthen-Blätter für die Schmutzpunktbestimmung).

**Tab. 3.2:** Beschreibung der eingesetzten Flotationszellen und eingesetzte Stoffmengen.

| Flotationszellen-Typ | Volumen [ml] | Stoffmenge bei 1% Stoffdichte [g otro] |
|----------------------|--------------|----------------------------------------|
| DEGUSSA              | 10.000       | 100                                    |
| VOITH                | 23.000       | 230                                    |

### **3.3.2.4 Hyperwäsche von Sekundärfaserstoffen**

Das Waschdeinking erfolgte in Anlehnung an die „Arbeitsvorschrift zur Durchführung einer Hyperwäsche“ der Firma Nopco Paper Technology. Dazu wurde eine Waschkammer der Firma DEGUSSA mit einem 5-Liter-Siebeinsatz von 64 µm Maschenweite verwendet. 5 Liter Stoffsuspension wurden nach Durchführung des Flotationsdeinkings bei 2000 UPM mit Hilfe einer perforierten Flügelscheibe 30 Minuten lang verrührt. Waschwasser wurde mit einer Zuflussgeschwindigkeit von 60 Litern pro Stunde zugegeben.

Vor Beginn der Hyperwäsche wurde der pH-Wert mit Natronlauge auf 9,5 erhöht, um eine Fortsetzung der enzymatischen Reaktion zu verhindern. Um eine pH-Wert-Änderung durch die Zufuhr des Waschwassers zu vermeiden, wurde entionisiertes Wasser anstelle von Leitungswasser eingesetzt. Die Prüflattbildung erfolgte bei pH 7, der mit Hilfe von verdünnter Essigsäure eingestellt wurde.

### **3.3.2.5 Peroxid-, FAS-Bleiche und alkalische Extraktion von Sekundärfaserstoffen**

Alle Bleichen (inkl. der alkalischen Extraktion) wurden in verschweißten PE-Beuteln (Gefrierbeuteln) durchgeführt. Für die alkalische Extraktion wurde 2% Natronlauge eingesetzt. Bei der Peroxidbleiche wurden 2% Wasserglas (38 °Bé), 1 bis 2% Natronlauge und 2% Wasserstoffperoxid verwendet. Für die FAS-Bleiche wurden 0,5% FAS und 0,25% Natronlauge eingesetzt. Dabei wurde das FAS pulverförmig zugegeben. Nach Zugabe der Chemikalien wurde der Stoff (5 g o.tro) manuell verknetet.

Die Bleiche fand dann in einem vortemperierten Schüttelwasserbad bei 60 °C statt. Die Stoffdichte wurde einheitlich auf 10 % eingestellt. Die Reaktionszeit für alkalische Extraktion und Peroxidbleiche betrug 60, die der FAS-Bleiche 30 Minuten.

Nach Abschluss der Peroxid- bzw. der FAS-Behandlung wurde die Probe in einem Gefäß mit kaltem Wasser abgekühlt, der End-pH-Wert gemessen und eine Probe für die jodometrische Bestimmung des nicht verbrauchten Peroxids entnommen.

Schließlich wurden die Stoffe mit 1000 ml entionisiertem Wasser aufgefüllt und aufgeschlagen. Vor der Bildung der Nutschenblätter wurde der pH-Wert auf 7 eingestellt.

### **3.3.3 Methoden zur enzymunterstützten Bleiche von Primärfaserstoffen**

#### **3.3.3.1 Enzymatische Behandlung von Primärfaserstoffen**

Die Versuche wurden bei pH 4,5 mit 0,1 M Natriumazetat-Essigsäure-Puffer durchgeführt. Bei Versuchen mit höheren pH-Werten wurde 0,2M Na-Phosphat-0,1 M Citronensäure-Puffer verwendet. 15 g otro Zellstoff, Holzschliff oder TMP wurden mit Laccase und/oder Mediator HBT (1-2%) inkubiert. Bei schlechter Löslichkeit des HBT wurde Aceton als Lösungsvermittler eingesetzt.

Versuche bei Luftatmosphäre fanden in offenen Temperiergefäßen aus Edelstahl bei 4% Stoffdichte und 55°C über 2 Stunden statt. Der Stoff wurde dazu bei 60 UPM mit Hilfe von Blattrührern gleichmäßig durchmischt, um konstante Reaktionsbedingungen gewährleisten zu können.

Versuche bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck erfolgten bei 10% Stoffdichte in 250 ml fassenden, mit Teflon ausgekleideten Edelstahlgefäßen eines rotierenden, thermo-ölbeheizten Bleichautoklaven. Die Ölbad-Temperatur betrug 55°C, die Inkubationsdauer 2 Stunden.

Nach Abschluss der Inkubation wurde jede Probe über einer Nutsche abfiltriert und mit 1000 ml entionisiertem Wasser neutral gewaschen.

Der abgenutzte Stoff wurde danach in drei gleich schwere Proben aufgeteilt. Eine Probe wurde zur Bildung eines Nutschenblattes in 500 ml entionisiertem Wasser aufgeschlagen. Die Blattbildung erfolgte, nachdem der pH-Wert der Suspension mit Hilfe von 0,2 M Na-Phosphat-0,1 M Citronensäure-Puffer auf pH 7 eingestellt worden war. Die übrigen Proben wurden für die alkalische Extraktion bzw. die Peroxidbleiche verwendet.

#### **3.3.3.2 Alkalische Extraktion und Peroxidbleiche von Primärfaserstoffen**

Die alkalische Extraktion und die Peroxidbleiche wurden in verschweißten PE-Beuteln (Gefrierbeuteln) in einem vortemperierten Schüttelwasserbad bei 60°C durchgeführt. Die Stoffdichte wurde einheitlich auf 10 Prozent eingestellt. Die Reaktionszeit für alkalische Extraktion und Peroxidbleiche betrug 60 Minuten.

Für die alkalische Extraktion wurden 2% Natronlauge eingesetzt. Bei der Peroxidbleiche wurden 1 bis 2% NaOH (Initial-pH = 10,5), 2% Wasserstoffperoxid und 2% Wasserglas (38 °Bé) verwendet. Nach Abschluss der Peroxidbehandlung wurde die Probe in einem Gefäß mit kaltem Wasser abgekühlt, der End-pH-Wert gemessen und eine Probe für die iodometrische Bestimmung des nicht verbrauchten Peroxids entnommen.

Die Proben für die alkalische Extraktion wurden dann wie für die Peroxidbleiche mit 1000 ml entionisiertem Wasser über einer Fritte neutral gewaschen. Zur Bildung eines Nutschenblattes wurden die Proben nochmals in 500 ml entionisiertem Wasser aufgeschlagen. Die Blattbildung erfolgte, nachdem der pH-Wert der Suspension mit Hilfe von 0,2 M Na-Phosphat- 0,1 M Citronensäure-Puffer auf pH 7 eingestellt worden war.

### **3.3.4. Optische Eigenschaften**

Die Herstellung der Prüfblätter à 4 g für die Weißgrad- Farbort- und Gelbwertbestimmung erfolgte entsprechend Zellcheming Merkblatt V/19/63. Für die Messung der optischen Eigenschaften wurden immer die Blattoberseiten von mindestens zwei Weißgradblättern herangezogen.

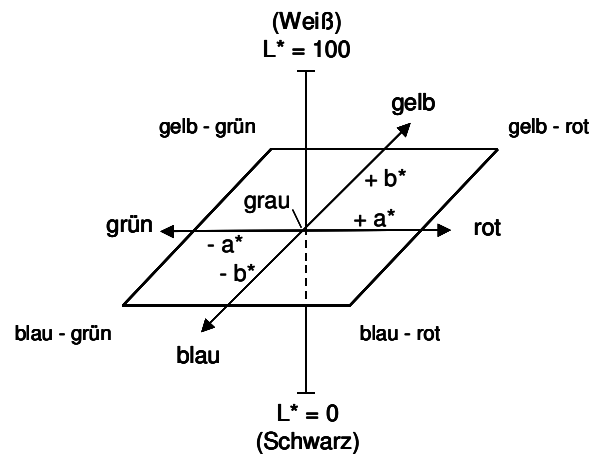
#### **3.3.4.1 Weißgrad**

Der ISO-Weißgrad wurde als spektraler Reflexionsfaktor bei einer Schwerpunktwellenlänge von 457 nm gemäß SCAN-C 11:75 bestimmt. Es wurde ein Elrepho 2000 - Photometer der Firma Datacolor verwendet.

#### **3.3.4.2 Farbort**

Der Farbort wurde nach den TAPPI Vorschriften T 524 om-94 und T 527 om-94 bestimmt und im CIELAB-System ausgedrückt (Abb. 3.1). Die Helligkeit  $L^*$  und die Koordinaten  $a^*$  und  $b^*$  beschreiben den Farbraum des Systems. Je näher der Helligkeitswert  $L^*$  an 100 heranreicht, umso weißer erscheint das Papier. Eine positive Farbkennzahl  $a^*$  deutet auf einen Rotanteil hin, eine negative auf einen Grünanteil. Dementsprechend beschreibt ein positiver  $b^*$ -Wert eine Farbortverschiebung nach Gelb und ein negativer eine Verschiebung nach Blau. Im Koordinatenursprung befindet sich ein neutrales Grau ohne jede Buntheit. Mit

wachsenden  $a^*b^*$ -Werten, je weiter also der Farbart von der Mitte entfernt liegt, wird die Buntheit größer.



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung des CIELAB-Systems (FRANKE, 1993)

### 3.3.4.3 Gelbwert

Der Gelbwert wurde nach DIN 6167 bestimmt.

### 3.3.5 Schmutzpunktanalyse

Für die Schmutzpunktanalyse wurden die Ober- und Unterseiten jeweils zweier Rapid-Köthen-Blätter von 2,4 g Gewicht ausgewertet, die nach Zellcheming-Vorschrift V/8/76 hergestellt worden waren. Die Schmutzpunktanalyse erfolgte mit einem Dot-Counter 2.0 der Firma COCAP. Dieses Gerät gibt die Schmutzpunkte in 9 Klassen von 50 bis 500  $\mu\text{m}$  Durchmesser an und in einer Klasse oberhalb 500  $\mu\text{m}$ . Diese Klassen wurden in dieser Arbeit zusammengefasst. Sie wurden wiedergegeben in einer Klasse von 50 bis 150  $\mu\text{m}$ , in einer Klasse für Schmutzpunkte größer als 150  $\mu\text{m}$  und in einer Klasse, in der alle erkannten Schmutzpunkte zusammengefasst werden. Die Auflösungsgrenze nach unten liegt bei diesem Gerät bei 50  $\mu\text{m}$ . Schmutzpunkte unterhalb dieses Durchmessers können mit diesem Gerät nicht erkannt werden. Das Gerät arbeitet kontrastabhängig, d.h., dass Schmutzpunkte nur dann erkannt werden können, wenn der Unterschied von hellem Hintergrund und dunkler Schmutzpunktfärbung groß genug ist.

### **3.3.6 Bestimmung des Ligningehaltes**

#### **3.3.6.1 Kappazahl**

Als Maß für den Ligningehalt von Zellstoffen wurde gemäß Zellcheming - Merkblatt IV/37/63 die Kappazahl ermittelt. Beim sauerstoffvorgebleichten Nadelholzsulfatzellstoff wurde die Mikrokappamethode gemäß TAPPI - Vorschrift T UM 246 angewendet.

#### **3.3.6.2 Ligningehalte ligninreicher Faserstoffe**

Bei sehr ligninreichen, kaum delignifizierten Faserstoffen (TMP, Holzschliff, Altpapier mit hohem Holzschliff- und TMP-Anteil) wurde der Ligningehalt alternativ als die Summe von Klasonlignin (= nichtsäurelösliches Lignin) und säurelöslichem Lignin bestimmt.

Zur Vorbereitung auf die Hydrolyse wurden die Proben in einer Mühle geflußt. Dann wurden 200 mg der Faserstoffprobe mit 2 ml eisgekühlter 72%iger Schwefelsäure versetzt. Die Probe wurde anschließend 60 min bei 30°C in einem thermostatisierten Wasserbad unter gleichmäßigem Umrühren vorhydrolysiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Probe sofort mit 56 ml Wasser in einen 100 ml - Messkolben überführt und mit einer Kondensationsfalle abgedeckt. Die vierzigminütige Nachhydrolyse wurde in einem Autoklaven unter Druck (0,12 MPa) bei 120°C durchgeführt.

Nach Abkühlung der Probe wurde der Hydrolyserückstand auf einer G4-Fritte abfiltriert und nach der Trocknung bei 105°C gravimetrisch bestimmt.

Zur Bestimmung des säurelöslichen Lignins wurden 2 ml des Filtrates in eine Quarzküvette pipetiert und die Extinktion im Photospektrometer bei 205 nm gegen eine Quarzküvette gefüllt mit Hydrolysensäure gemessen. Das säurelösliche Lignin konnte dann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Gehalt säurelösliches Lignin [\%]} = \frac{\Delta E_{205} * F * V}{m * 1100}$$

mit:  $\Delta E_{205}$  = Extinktion bei 205 nm  
: F = Verdünnungsfaktor  
: V = Volumen in ml  
: m = Einwaage otro in g  
: 1100 = Extinktionsfaktor

### 3.3.7 Bestimmung des Aschegehaltes

Zur Ermittlung der anorganischen Substanz in Faserstoffen, wie Füllstoffe oder Streichpigmente, wurde der Aschegehalt gemäß TAPPI Vorschrift T 211 om-93 durch Veraschung bei 525°C ermittelt und als % - Anteil des Glührückstandes an der Gesamtmasse angegeben.

## 4 Spezieller Teil - Ergebnisse und Diskussion eigener Untersuchungen

### 4.1 Charakterisierung der Laccasen

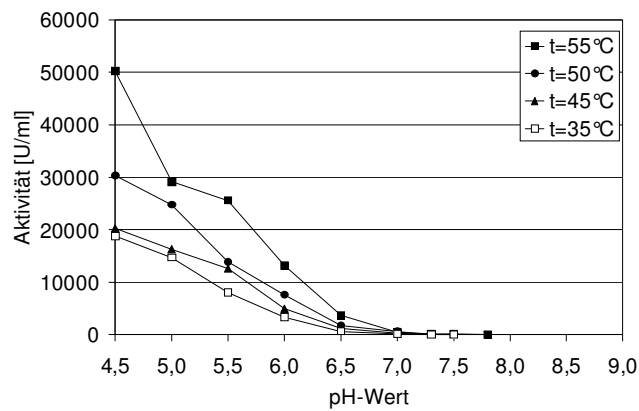
#### 4.1.1 Aktivitätsbestimmung der Laccasen

Der photometrische Test mit ABTS als Substrat dient zur Beschreibung der katalytischen Aktivität der zur Verfügung stehenden Laccasen. Sie wird in [U/ml] für flüssige und [U/mg] für pulverförmige Enzympräparate angegeben und dient als Maß für die Dosierung der Enzyme in den weiterführenden Versuchen. Zur näheren Charakterisierung der Laccasepräparate werden die Aktivitäten bei ausgewählten Temperaturen und pH-Werten bestimmt. Die Aktivitätsbestimmung bei 35 bis 55°C orientiert sich an den für das Flotationsdeinking relevanten Temperaturen. Die Durchführung der Untersuchung bei pH-Werten von 4,5 bis 9 deckt den leicht sauren pH-Bereich ab, in dem üblicherweise mit Laccase im LMS gearbeitet wird, sowie den neutral-alkalischen, der für ein neutrales Flotationsdeinkingverfahren in Frage kommt.

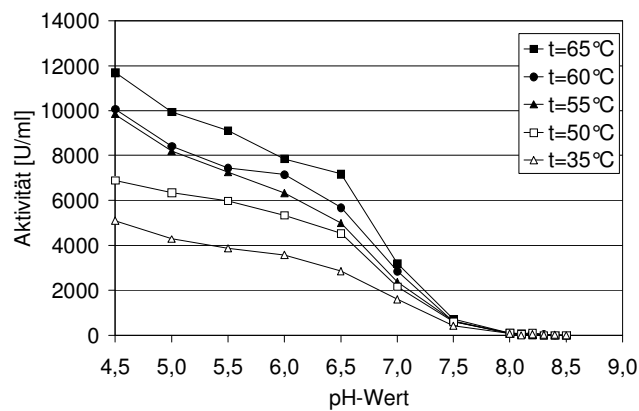
Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in Abb. 4.1.1 wiedergegeben. Die Enzympräparate unterscheiden sich deutlich bezüglich der messbaren Aktivität. Diese ist beispielsweise bei Laccase von *Trametes villosa* mit rund 50000 U/ml bei pH 4,5 fünfmal so hoch als bei Laccase von *Myceliophthora thermophila*. Die Laccase von *Trametes versicolor* besteht aus einem pulverförmigen Lyophilisat. Deren Aktivität kann daher mit denen der beiden anderen Präparate, die als Lösungen vorliegen, nicht direkt verglichen werden.

Alle drei Laccasepräparate zeigen im Rahmen des untersuchten Bereiches mit steigender Temperatur einen Anstieg der Aktivität. Mit steigendem pH-Wert sinkt die Aktivität aller drei Laccasen. Ab pH 7 kann für die Laccasen von *T. villosa* und *T. versicolor* kaum noch Aktivität beobachtet werden. Der Aktivitätsbereich der *M. thermophila*-Laccase endet bei pH-Werten über 8.

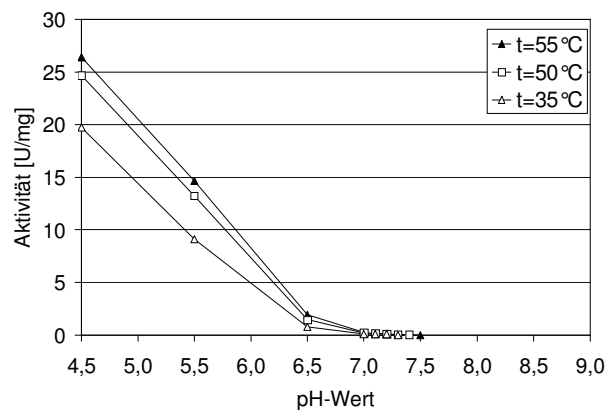
Die beobachteten Einflüsse von Temperatur und pH-Wert sind nicht als absolut anzusehen. Sie hängen von den Testbedingungen, vor allem aber vom verwendeten Testsubstrat ab. Abhängig davon gibt der Hersteller in seinen Produktbeschreibungen zu den Laccasen von *T. villosa* und *M. thermophila* unterschiedliche Aktivitätsoptima sowie Ober- und Untergrenzen an (Tab. 4.1.1):



Laccase von  
*T. villosa*



Laccase von  
*M. thermophila*



Laccase von  
*T. versicolor*

**Abb. 4.1.1:** Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen mit ABTS für *T. villosa*- (oben), *M. thermophila*- (mittig) und *T. versicolor*-Laccase (unten) bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen

TMP-Fasern können durch beide Laccasen bis pH 10 abgebaut werden. Doch wird Syringaldazin als Substrat durch Laccase von *T. villosa* nur bis pH 7,5 umgesetzt. *M. thermophila*-Laccase katalysiert die zugrunde liegende Reaktion dagegen bis pH 9. Die pH-abhängigen Aktivitätsoptima für beide Substrate befinden sich für Laccase von *T. villosa* bei pH 5 bzw. 5,5. Bei Laccase von *M. thermophila* liegt der optimale

pH-Bereich für die Umsetzung von TMP-Fasern bei pH 6, bei Syringaldazin jedoch bei pH 7,7. Dagegen wird bei der eigenen Untersuchung mit ABTS (in Abb. 4.1.1) auch bei pH 4,5 noch kein pH-bedingtes Aktivitätsoptimum erreicht. Im Fall der *T. villosa*-Laccase befinden sich die temperaturbedingte Aktivitätsobergrenze für TMP-Fasern bei 90 °C, für Syringaldazin bei 70 °C und der optimale Temperaturbereich für beide Substrate bei 50 bis 55 °C. Bei *M. thermophila*-Laccase liegt jedoch die maximale Temperatur zur Umsetzung beider Substrate bei 90 °C. Die Optimaltemperatur für TMP-Fasern beträgt 85 °C, die für Syringaldazin 75 °C.

**Tab. 4.1.1:** Temperatur- und pH-Bereiche nach Angaben des Herstellers (NOVONORDISK, o.J. a und NOVONORDISK, o.J. b)

| Laccase               | pH-Bereich           | Temperaturbereich     | Substrat      | Messgröße                 |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------------------------|
| <i>T. villosa</i>     | 2- <u>5</u> -10      | 10- <u>50</u> -90 °C  | TMP-Fasern    | O <sub>2</sub> -Verbrauch |
|                       | 4,5- <u>5,5</u> -7,5 | <20- <u>55</u> -70 °C | Syringaldazin | Extinktion                |
| <i>M. thermophila</i> | 2- <u>6</u> -10      | 10- <u>85</u> -90 °C  | TMP-Fasern    | O <sub>2</sub> -Verbrauch |
|                       | <4,5- <u>7,7</u> -9  | <20- <u>75</u> -90 °C | Syringaldazin | Extinktion                |

Anhand von Ergebnissen, die mit einem bestimmten Aktivitätstest bzw. einem bestimmten Substrat gewonnen werden, kann man also nicht auf die allgemein gültigen Grenzen für die katalytische Aktivität eines Enzympräparates schließen. Unabhängig von den verwendeten Testmethoden bzw. den Testsubstraten ist jedoch allen Ergebnissen gemeinsam, dass die Aktivität der Laccasen auch im neutral-alkalischen Milieu je nach Substrat bis zu einem bestimmten pH-Bereich nachweisbar ist.

Eigene Versuche mit Syringaldazin als Substrat für den Aktivitätstest fielen bezüglich der Wiederholbarkeit unzufriedenstellend aus. Dagegen liefert der Test mit ABTS als Substrat reproduzierbare Ergebnisse. Dabei erweist sich die Durchführung der Methode im sauren pH-Bereich am praktikabelsten, wogegen die Streuung der Einzelwerte zum Neutralbereich hin mit sinkender Aktivität zunimmt. Als Bemessungsgröße der eingesetzten Enzymmenge für die nachfolgend beschriebenen Versuche dient daher der Aktivitätstest mit ABTS im leicht sauren Milieu. Die angegebenen Units werden immer bei 55 °C und pH 4,5 ermittelt, auch wenn die Laccasen in vielen der folgenden Versuche bei höheren pH-Werten eingesetzt werden.

#### 4.1.2 Umsetzung von Mediatoren unter Deinkingbedingungen

Eine Voraussetzung für den Einsatz des LMS zum Deinking von Altpapier ist die Fähigkeit der Laccasen, mit Mediatoren im neutral-alkalischen Bereich reagieren zu können. Zur Beantwortung dieser Frage wird der Sauerstoffverbrauch der Laccasen von *T. villosa* und *M. thermophila* bei der Umsetzung der Mediatoren ABTS, HBT und Violursäure mit Hilfe einer CLARK-Elektrode bei Luftatmosphäre und 45 °C bestimmt. Der Sauerstoffverbrauch bei pH 4,5 dient als Referenz. Die eigentliche Untersuchung erfolgt im pH-Bereich von pH 7 bis 10.

Unabhängig vom pH-Wert sind für beide Laccasen die Umsatzraten für ABTS am höchsten. Deutlich niedriger sind sie für VA. Am niedrigsten fallen sie für HBT aus. Diese Tendenz wird auch von KRUUS und VIIKARI (2001) bei einer Untersuchung im sauren pH-Bereich beobachtet.

Für beide Laccasen sinkt mit steigendem pH-Wert der Sauerstoffverbrauch und damit die Umsatzgeschwindigkeit für die Mediatoren (Tab. 4.1.2). Die Umsetzung des Substrates ABTS endet bei pH 10. VA und HBT werden nur bis pH 8,5 umgesetzt. Dabei können zwischen den beiden Laccasen Unterschiede festgestellt werden.

Mit ABTS reagiert die *M. thermophila*-Laccase bezogen auf den neutral-alkalischen pH-Bereich intensiver. Zwar ist die Umsatzrate für die *T. villosa*-Laccase bei pH 4,5 und 7 mit 1228 bzw. 351  $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  höher als für *M. thermophila*-Laccase, doch fällt deren Umsatzrate langsamer ab, so dass sie ab pH 7,5 höhere Umsatzraten aufweist.

Für VA und HBT erweist sich dagegen die *T. villosa*-Laccase als das geeignetere Enzym. Bis pH 7,5 liegen ihre Umsatzraten für Sauerstoff für beide Mediatoren um ein Vielfaches über den Raten für *M. thermophila*-Laccase. Erst bei pH 8 sind sie für beide Enzyme gleich hoch. Dieses im Vergleich zur Umsetzung von ABTS abweichende Verhalten liegt vermutlich an Inaktivierungserscheinungen, wie sie von KRUUS und VIIKARI (2001) für *M. thermophila*-Laccase in Gegenwart von HBT und VA beobachtet werden, wogegen die *T. villosa*-Laccase nicht inaktiviert wird.

Wesentlich für das laccaseunterstützte Deinking ist jedoch, dass auch im neutral-alkalischen Bereich noch aktive Laccase vorhanden ist, die mit dem Mediator reagieren kann.

**Tab. 4.1.2:** Sauerstoffverbrauchsrate  $[\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$  von *T. villosa*-Laccase (*T. vill.*) und *M. thermophila* (*M. therm.*) bei der Umsetzung gebräuchlicher Mediatoren

| pH-Wert | ABTS            |                  | VA              |                  | HBT             |                  |
|---------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
|         | <i>T. vill.</i> | <i>M. therm.</i> | <i>T. vill.</i> | <i>M. therm.</i> | <i>T. vill.</i> | <i>M. therm.</i> |
| 4,5     | 1228            | 922              | 257             | 4,0              | 48              | 2,3              |
| 7       | 351             | 176              | 27              | 1,9              | 6               | 0,8              |
| 7,5     | 175             | 184              | 7               | 2,2              | 3               | 0,7              |
| 8       | 62              | 136              | 2               | 1,9              | 0,1             | 0,1              |
| 8,5     | 20              | 43               | 0,2             | 0,4              | 0,1             | 0,4              |
| 9       | 6               | 16               |                 |                  |                 |                  |
| 9,5     | 2               | 7                |                 |                  |                 |                  |
| 10      | 1               | 2                |                 |                  |                 |                  |

## **4.2 Versuche zum Laccase- und Laccase-Mediator-unterstützten Deinking von Sekundärfaserstoffen**

In den folgenden Deinkversuchen soll überprüft werden, ob der Einsatz von Laccase bzw. des Laccase-Mediator-Systems das Flotationsergebnis bezüglich Weißgrad und Schmutzpunktreduktion verbessert.

Die Inkubation erfolgt bei 55 °C, um das temperaturabhängige Aktivitätspotential der Laccasen möglichst auszunutzen. In diesem Temperaturbereich ist noch nicht mit einer hitzebedingten Vergilbung zu rechnen (HERRMANN, 1999). Im Anschluss an die 90-minütige Inkubationsphase, während der die zugegebene Laccase und der Mediator HBT bei Luftatmosphäre in offenen Temperiergefäßen mit dem Stoff reagieren können, erfolgt die 8-minütige Flotation der Proben mit zum Teil anschließender 30-minütiger Hyperwäsche. Die Seife Olinor RST Na wird erst zur Flotation zugegeben, nachdem der pH-Wert des Stoffes auf pH 9,5 angehoben worden ist. Die Zudosierung der Seife zu diesem relativ späten Zeitpunkt ist als Vorsichtsmaßnahme gedacht, da nach Arbeiten von KARLSSON et al. (2001) und BEATSON et al. (1999) Laccasen eventuell Fettsäuren in Grenzen modifizieren und abbauen können. Demnach könnte die Seife Olinor RST Na, ein Natriumsalz verschiedener Fettsäuren, als Substrat für Laccase in Frage kommen und die Gefahr bestehen, dass der Effekt der Seife bei der Flotation beeinträchtigt wird. Wird aber die Seife bei pH 9,5 zugegeben, sind die Laccasen inaktiviert. Auf diese Weise kann eine Modifikation der Seifen durch die Enzyme vermieden werden. Die Prüfblattbildung erfolgt bei pH 7,0.

Altpapier besitzt wegen seines großen Kalziumkarbonatanteils eine hohe Pufferkapazität. Deshalb ist es nur unter Einsatz entsprechender Pufferlösungen möglich, einen über die Inkubationszeit konstanten pH-Wert einzustellen. Dies führt jedoch zu Problemen bezüglich der Einhaltung einer für das Flotationsdeinking geeigneten Wasserhärte. Eine wesentlich praxisnähere und in dieser Arbeit verwendete Alternativmethode ist, Leitungswasser zu verwenden, den Anfangs-pH-Wert mit Essigsäure auf 7 abzusäuern und in der Folgezeit während der Inkubationsphase den Wiederanstieg des pH-Wertes auf den Eigen-pH-Wert des Altpapiers in Kauf zu nehmen. Dieser liegt je nach Altpapier-Charge zwischen pH 7,5 und 8,5 und wird nach 30 bis 45 Minuten erreicht. Wenn in dieser Arbeit Deinkergebnisse nach Inkubation bei „neutraler Fahrweise“, „neutralem pH-Wert“ oder „pH 7“ dargestellt werden, muss also bedacht werden, dass der pH-Wert während der Inkubation nicht konstant bleibt. Bei der Darstellung der Ergebnisse bezieht sich die Angabe von pH 7 lediglich auf den Initial-pH-Wert der Inkubationsphase.

Einige Versuche werden zu Vergleichszwecken bei pH 4,5 durchgeführt. Für diese Ansätze wird entionisiertes Wasser verwendet und der pH-Wert mit konzentrierter Essigsäure geregelt. Die Einstellung der Wasserhärte während der Inkubationsphase erfolgt durch Zugabe von 2,5 mM Ca-Acetat. Der pH-Wert wird alle 10 Minuten kontrolliert und bei Bedarf korrigiert. Als Betriebswasser der Flotation dient bei diesem Versuchstyp 2,5 mM  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

Der Eigen-pH-Wert des Altpapiers variiert je nach Altpapier-Charge, weshalb diese innerhalb einer Versuchsreihe nicht gewechselt wird, um identische Reaktionsbedingungen gewährleisten zu können. Ein Vergleich von Einzelwerten verschiedener Versuchsreihen ist nicht möglich, weil sich die verwendeten Altpapierchargen im Druckbild unterscheiden und je nach Charge die Werte auf unterschiedlichem Niveau ausfallen. Es können also lediglich die Trends, die sich zwischen den verschiedenen Versuchsreihen abzeichnen, verglichen werden.

#### **4.2.1 Versuche zum Deinking von Altpapier**

Zunächst werden Deinkversuche mit der Altpapier-Modellmischung für gealterte deutsche Haushaltssammelware durchgeführt. Sie bestehen zu je einem Viertel aus den Zeitschriften bzw. Zeitungen Spiegel, Stern, FAZ und Express, die gemäß DIN 54606 Teil 1 gealtert wurden. Die Altpapier-Modellmischung wird in den folgenden Kapiteln mit „Altpapier“ bzw. mit dem Kürzel „AP“ bezeichnet. Das Deinking von AP wird nur mit den Laccasen von *M. thermophila* und *T. villosa* getestet. Die Laccase von *T. versicolor* stand erst zum Ende des Projektes zur Verfügung.

##### **4.2.1.1 Deinking nach Inkubation mit Laccase und Mediator im neutralen pH-Bereich**

###### **4.2.1.1.1 Einfluss variabler Laccase-Dosierungen**

Im ersten Versuch wird der Einfluss unterschiedlich hoher Laccase-Gaben auf das Deinkergebnis untersucht. Dazu werden Proben von je 100 g otro AP mit je 100 bzw. 1000 U/g otro AP bei neutralem pH-Wert inkubiert. In der Versuchsreihe von Abb. 4.2.1 wird mit Laccase von *M. thermophila*, in der von Abb. 4.2.2 mit Laccase von *T. villosa* gearbeitet. Gleichzeitig werden 0 bzw. 2 Prozent HBT bezogen auf otro AP zugegeben, um den Einfluss der Laccase mit und ohne Verwendung des Mediators abschätzen zu können. Die HBT-Dosis von 2 % orientiert sich an der Arbeit von

SEALEY und RAGAUSKAS (1998). Im Anschluss an die Inkubationsphase wird flotiert und vom deinkten Stoff bei pH 7 Prüfblätter für die Weißgrad- und Schmutzpunktmessung gebildet. Neben der Enzym- und Mediator-freien, neutral deinkten Variante wird eine weitere Enzym- und Mediator-freie AP-Probe alkalisch deinkt, um als zusätzlicher Referenzwert zu dienen.

Beide Versuchsreihen zeigen das gleiche Ergebnis. Der Weißgrad der neutralen Referenz schneidet mit 54,1 % ISO um 4,4 Weißpunkte schlechter ab als der Weißgrad der alkalischen Referenz. Der hohe Weißeunterschied erklärt sich mit der deutlich geringeren Druckfarbenentfernung und mit dem Bleicheffekt des Wasserstoffperoxids, welches bei der alkalischen Fahrweise eingesetzt wird. So ist die Gesamtfläche aller mit dem DOT-Counter messbaren Schmutzpunktflächen („Schmutzpunkte > 50 µm“; 50 µm entspricht der Auflösungsgrenze des DOT-Counters) für den neutralen Referenzwert mit 3825 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> doppelt so hoch wie die Gesamtschmutzpunktfläche für den alkalischen Referenzwert. Gliedert man die Gesamtschmutzpunktfläche in Schmutzpunkte mit Durchmesser von 50 bis 150 µm und solche mit Durchmesser größer als 150 µm auf, lässt sich die unterschiedliche Wirkungsweise des alkalischen und des neutralen Deinkings erkennen. Bei alkalischer Fahrweise ist der Flächenanteil, der auf Schmutzpunkte mit „kleinem“ Durchmesser zurückgeht, etwa gleich hoch wie der Anteil der Schmutzpunkte „großer“ Durchmesser. Bei neutraler Fahrweise fehlen die Druckfarben ablösenden und dispergierenden Effekte von Alkali und Wasserglas, was offenbar zu kaum abgelösten Druckfarbenpartikeln und damit vorwiegend „großen“, schwieriger zu flotierenden Schmutzpunktdurchmessern führt, die zwei Drittel der Gesamtschmutzpunktfläche ausmachen.

Die Laccase- bzw. LMS-Behandlungen der künstlich gealterten Drucke führen zu einer Absenkung des Weißgrades nach Flotation. Mit steigenden Laccase-Gaben fällt der Weißgrad in erhöhtem Maße ab. Mit HBT wird dieser Effekt intensiviert. So sinkt in Abb. 4.2.1 im Fall der *M. thermophila*-Laccase der Weißgrad bei einer Enzym-Dosis von 100 U im Vergleich zur neutralen Referenz um zwei Punkte und bei 1000 U um 5,4 Punkte. Beim kombinierten Einsatz von Laccase und 2 % HBT ist der Weißeverlust noch größer. Bei 100 U Laccase fällt die Weiße um 3,2 und bei 1000 U sogar um 8,5 Punkte schlechter aus. Ähnlich verhalten sich die Weißgrade bei einer Behandlung mit Laccase von *T. villosa* (Abb. 4.2.2). Der Weißgrad nimmt bei 100 U Laccase um 0,6 bzw. bei 100 U Laccase und 2 % HBT um 1,3 Prozentpunkte ab. Bei 1000 U Laccase sind es 4,3 und bei 1000 U Laccase und 2 % HBT sogar 7,2 Punkte.

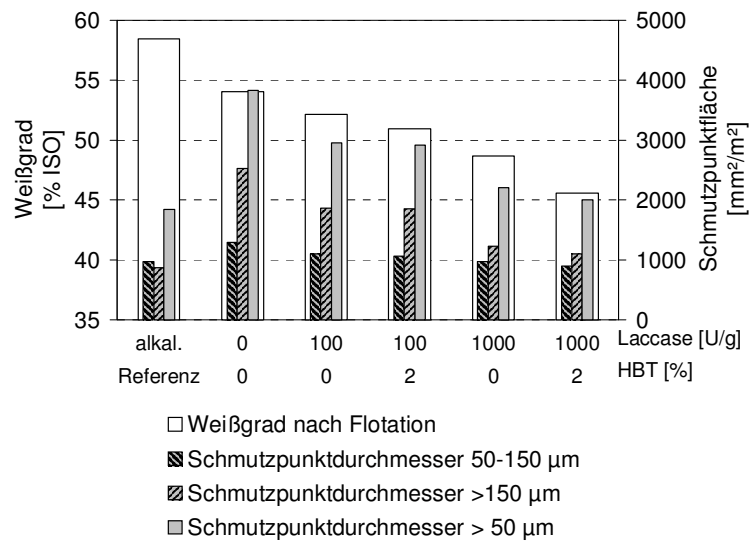
Mit der Laccase und Mediator-bedingten Weißgradabnahme geht gleichzeitig eine Abnahme der Schmutzpunktflächen einher. Sehr deutlich ist dieser Zusammenhang

in Abb. 4.2.1 bei Verwendung von *M. thermophila*-Laccase ausgeprägt. Die Gesamtschmutzpunktflächen (Schmutzpunktdurchmesser  $< 50\mu\text{m}$ ) sinken hier ausgehend vom Laccase- und Mediator-freien Referenzwert mit  $3825\text{ mm}^2/\text{m}^2$  auf  $2003\text{ mm}^2/\text{m}^2$  bei Einsatz von 1000 U Laccase und 2 % HBT. Weniger deutlich ist dieser Trend bei Einsatz von *T. villosa*-Laccase ausgeprägt (Abb. 4.2.2), doch fallen auch hier die Schmutzpunktflächen ausgehend von  $3825\text{ mm}^2/\text{m}^2$  auf  $3227\text{ mm}^2/\text{m}^2$  ab. Die extrem hohe Schmutzpunktfläche von  $4862\text{ mm}^2/\text{m}^2$  bei Einsatz von 100 U *T. villosa*-Laccase und 2 % HBT ist vermutlich als Ausreißer anzusehen, da für die Ermittlung dieses Wertes nur 1 Rapid-Köthen-Blatt zur Schmutzpunktanalyse vorliegt. Die Zugabe von 2 Prozent HBT scheint keinen wesentlichen Einfluss auf die Schmutzpunktentwicklung zu haben. Bei gleich hoher Laccasedosierung sind die Schmutzpunktflächen unabhängig von der HBT-Behandlung sowohl in Abb. 4.2.1 als auch in Abb. 4.2.2 in etwa gleich groß.

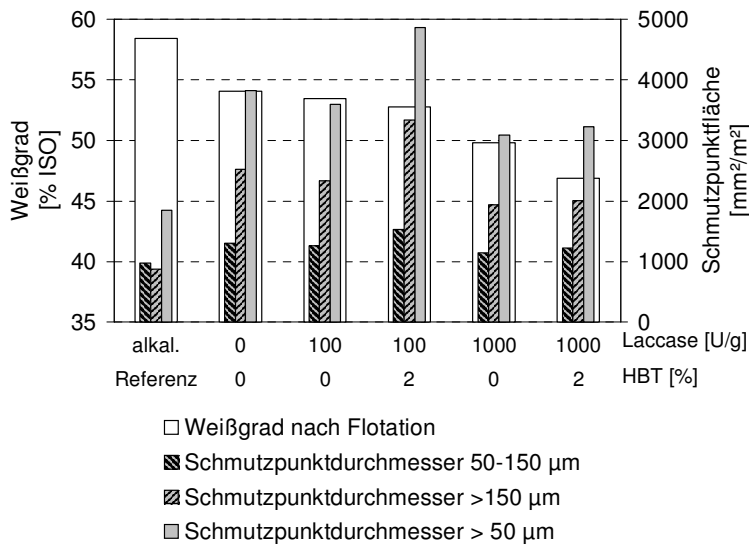
Die sinkenden Schmutzpunktflächen können allerdings bei sinkenden Weißgraden nicht als signifikant gewertet werden. Die Schmutzpunktbestimmung erfolgt mit Hilfe eines DOT-Counters. Dieses Gerät arbeitet kontrastabhängig und kann daher bei niedrigeren Weißgraden zwangsläufig nur weniger Schmutzpunkte dedektieren als bei höheren.

Wie bei der neutralen Referenz dominieren bei der Gesamtfläche aller Schmutzpunkte bei den Laccase- bzw. Laccase- und Mediator-behandelten Proben mit einem Anteil von etwa zwei Dritteln die Schmutzpunkte mit Durchmesser über  $150\mu\text{m}$ . Da es zu keiner Verschiebung dieses Verhältnisses zu Gunsten der Schmutzpunktfraction kleinerer Durchmesser gekommen ist, liefert dieses Ergebnis keinen Hinweis auf einen eventuellen enzymatischen Abbau von Druckfarbenpartikeln.

Letztlich fallen im Vergleich zur alkalischen Referenz alle anderen Ergebnisse schlechter aus.



**Abb. 4.2.1:** Weißgrad- und Schmutzpunktentwicklung von AP nach Inkubation mit *M. thermophila*-Laccase und HBT im neutralen pH-Bereich und nachfolgender Flotation



**Abb. 4.2.2:** Weißgrad- und Schmutzpunktentwicklung von AP nach Inkubation mit *T. villosa*-Laccase und HBT im neutralen pH-Bereich und nachfolgender Flotation

#### 4.2.1.1.2 Einfluss variabler Mediator-Dosierung

Durch Variation der Mediator-dosierung soll die Wirkung von HBT auf die Weißgrad- und Schmutzpunktentwicklung genauer betrachtet werden. Die Ergebnisse werden in den Abb. 4.2.3 für *M. thermophila*-Laccase und in Abb. 4.2.4 für *T. villosa*-Laccase dargestellt. Die Laccasedosierung beträgt 1000 U/g.

Die Werte der alkalischen und neutralen Referenz sowie die Werte für 1000 U bzw. 1000 U und 2 % HBT sind die gleichen wie in den Abb. 4.2.1 und 4.2.2 und bedürfen keiner intensiven Erläuterung. Wie zuvor bereits beschrieben, nehmen die Weißgrade durch die Laccasebehandlung deutlich ab.

Bei beiden Versuchsreihen (Abb. 4.2.3 und Abb. 4.2.4) zeigt sich mit steigender HBT-Dosierung ein Trend zu einem weiteren Absinken der Weißgrade. Ausgehend vom Weißgrad der mit *M. thermophila*-Laccase aber ohne HBT inkubierten Probe von 48,7 % ISO nimmt der Weißgrad mit den zusätzlichen Mediatorgaben von 0,1, 0,25, 0,5 und 2 % HBT zunächst geringfügig, aber am Ende deutlich um 1,5, 1,7, 1,9 und schließlich 3,1 Weißpunkte ab. Nicht in diesen Trend passt allerdings der Weißgrad für 1000 U Laccase und 1 % HBT, der mit 49,1 % ISO geringfügig höher liegt als der Weißgrad für 1000 U Laccase. Bei diesem Wert handelt es sich vermutlich um einen Ausreißer. Dafür sprechen die Werte einer weiteren Messreihe (Abb. 4.2.5), die im nächsten Kapitel diskutiert wird.

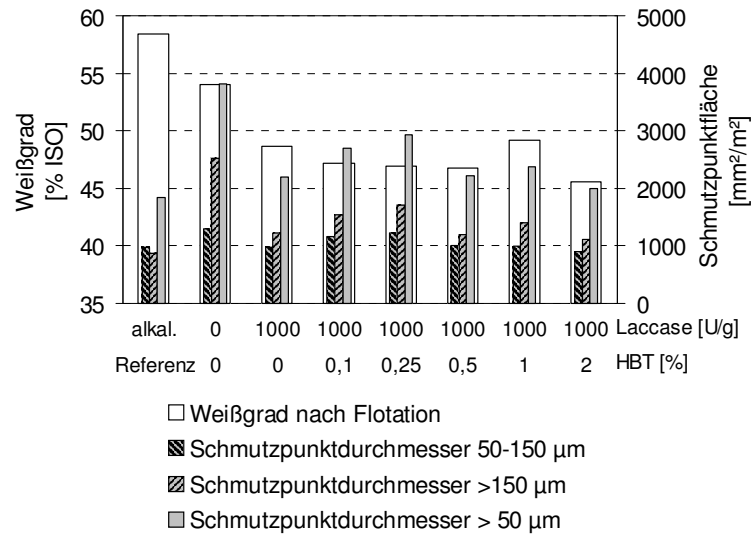
Weniger deutlich als in Abb. 4.2.3 zeigt sich der Trend zu fallenden Weißgraden mit zunehmender HBT-Dosierung in Abb. 4.2.4, da die Weißgrade für die niedrigeren HBT-Dosierungen von 0,1 % und 0,25 % mit 1,4 bzw. 1,1 Weißpunkten über dem Weißgrad der nur mit Laccase behandelten Probe liegen. Doch sinkt bei den Proben, die mit höheren HBT-Dosierungen inkubiert werden, die Weiße deutlich ab. Während bei der nur mit Laccase behandelten Probe der Weißgrad bei 49,8 % ISO liegt, beträgt er bei 0,5 % HBT 48,8 % ISO und bei 1 % 46,1 % ISO. Der Weißgrad für 2 % HBT liegt mit 46,9 % ISO zwar leicht höher als der Wert für 1 % HBT, doch liegt er mit knapp 3 Punkten Weiße deutlich unter dem Wert der HBT-freien Probe.

Für beide Versuchsreihen gilt jedoch, dass der Einfluss der Laccase-Dosierung von 1000 U auf den Weißgrad des neutralen Referenzwertes mit minus 4,4 % ISO einen größeren Einfluss hat als die getesteten HBT-Dosierungen.

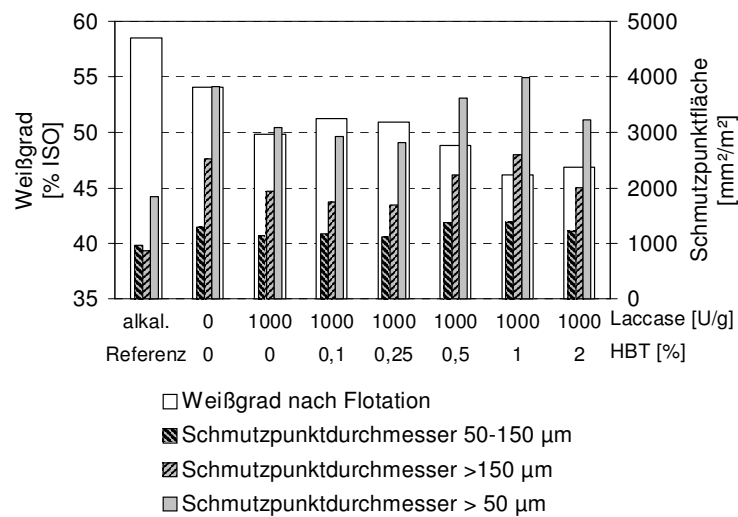
Aus den Graphiken der Abb. 4.2.3 und Abb. 4.2.4 lässt sich kein Zusammenhang zwischen der Höhe der HBT-Dosierung und einer Abnahme der Schmutzpunktflächen herleiten. Die Schmutzpunktflächen der mit HBT behandelten Proben zeigen

eine starke Schwankungsbreite und liegen auf dem Niveau der nur mit Laccase behandelten Probe oder sogar darüber. Im Fall der *M. thermophila*-Laccase liegen die insgesamt bestimmbaren Schmutzpunktflächen mit einem durchschnittlichen Wert von  $2450 \text{ mm}^2/\text{m}^2$  nur geringfügig über dem Niveau der Gesamtschmutzpunktfläche für die nur mit Laccase behandelte Probe von  $2206 \text{ mm}^2/\text{m}^2$ . Dies gilt auch im Fall der *T. villosa*-Laccase. Hier ergeben sich eine Gesamtschmutzpunktfläche von  $3086 \text{ mm}^2/\text{m}^2$  bei Behandlung mit Laccase und ein arithmetisches Mittel für die mit Laccase und Mediator behandelten Proben von  $3310 \text{ mm}^2/\text{m}^2$ .

Die Ergebnisse lassen für die Entwicklung der Schmutzpunktflächen lediglich die Aussage zu, dass sie sinken, wenn die Proben mit Laccase behandelt werden. Die mit Laccase von *M. thermophila* behandelten Proben haben eine durchschnittlich um  $1400 \text{ mm}^2/\text{m}^2$  niedrigere Gesamtschmutzpunktfläche. Bei Einsatz von *T. villosa*-Laccase sind es  $550 \text{ mm}^2/\text{m}^2$ . Doch selbst diese Aussage muss wegen der Messtechnik des DOT-Counters wie im vorhergehenden Kapitel relativiert werden. Eine zweifelsfreie Aussage zur Schmutzpunktentwicklung kann aus diesen Messreihen nicht formuliert werden.



**Abb. 4.2.3:** Weißgrad- und Schmutzpunktentwicklung von AP nach Inkubation mit *M. thermophila*-Laccase und HBT im neutralen pH-Bereich und nachfolgender Flotation



**Abb. 4.2.4:** Weißgrad- und Schmutzpunktentwicklung von AP nach Inkubation mit *T. villosa*-Laccase und HBT im neutralen pH-Bereich und nachfolgender Flotation

#### 4.2.1.2 Deinking nach Inkubation mit Laccase und Mediator im sauren pH-Bereich

Laccase-Mediator-Behandlungen werden in der Literatur in der Regel im sauren pH-Bereich durchgeführt. Hier besitzen Laccasen ihre größte Aktivität. Auch das Redoxpotential der Mediatoren bzw. die Stabilität der Mediatorradikale ist hier vermutlich am höchsten (LUND und KWEE, 1968). Die Versuchsreihen des vorhergehenden Kapitels werden daher bei pH 4,5 wiederholt, um die bei neutralem pH-Wert beobachteten Effekte unter für Laccase günstigeren Bedingungen deutlicher herausarbeiten zu können.

Im Vergleich zu den vorhergehenden Messreihen fallen die Weißgrade der Laccase- und Mediator-freien Referenzwerte um 3,5 Punkte und der alkalische Referenzwert sogar um 6 Punkte niedriger aus (Abb. 4.2.5 & 4.2.6). Dies kann auf die Verwendung eines kleinvolumigeren Ersatzkneters zurückzuführen sein (Fa. Stephan Werke Hameln, Type FD 224 / 8D h), der zwischenzeitlich für die ausgefallene Planetenrührmaschine (NCM 20, Fa. Hobart) verwendet wird. Dadurch wird die Druckfarbe bei der Altpapierauflösung vermutlich zu intensiv zerrieben. Der erhöhte Anteil von unter die Flotationsgrenze dispergierten Druckfarbenpartikeln kann dann zu einem unzureichenden Druckfarbenaustrag und unbefriedigenden Flotationsergebnissen führen. Als weiterer Grund für diese Abweichung kommt aber auch die Verwendung einer anderen Altpapiercharge in Frage.

Wie in den Versuchsreihen zuvor liefert die alkalische Fahrweise das beste Flotationsergebnis. Der Weißgrad beträgt 52,4 % ISO und liegt damit zwei Punkte über dem Weißgrad des neutralen Referenzwertes. Das Schmutzpunktniveau der alkalischen Referenz ist mit 792 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> ungefähr halb so hoch wie das Niveau der neutralen Referenz mit 1401 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>. Die Schmutzpunkte der alkalischen Referenz bestehen wieder überwiegend aus Schmutzpunkten mit Durchmessern bis 150 µm. Nur ein Drittel der Schmutzpunkte besitzt Durchmesser über 150 µm. Die Schmutzpunkte der neutralen Referenz verteilen sich etwa zu gleichen Teilen auf die beiden Durchmesserklassen.

In beiden Versuchsreihen (Abb. 4.2.5 und Abb. 4.2.6) nimmt der Weißgrad nach der Inkubation mit Laccase deutlich ab. Um 4,2 % ISO fällt er im Fall der *M. thermophila*-Laccase und sogar um 6,2 % ISO bei *T. villosa*-Laccase. Mit steigender Dosierung von HBT im sauren pH-Bereich sinken die Weißgrade zusätzlich. In Abb. 4.2.5 sind dies im Vergleich zur HBT-freien Variante bis zu 5,1 % ISO. Im Fall von *T. villosa*-Laccase (Abb. 4.2.6) sinkt er sogar um weitere 8,4 % ISO. Der Weißabfall im

sauren pH-Bereich wird also sowohl durch die Laccase-Gabe als auch durch die Mediatorgabe intensiviert.

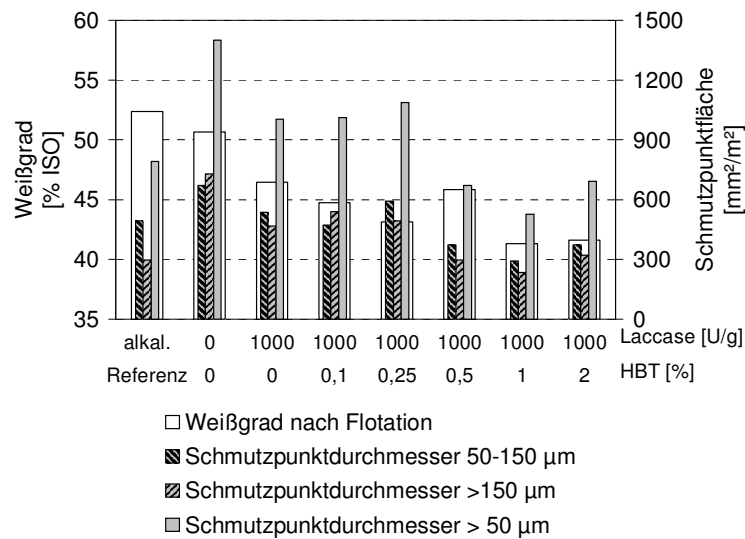
Auch in diesen Versuchsreihen nehmen die Schmutzpunktflächen bei Zusatz der Laccasepräparate ab. Sie sinken im Vergleich zum Wert der neutralen Referenz ( $1401 \text{ mm}^2/\text{m}^2$ ) im Fall der *M. thermophila*-Laccase auf  $1002 \text{ mm}^2/\text{m}^2$  und bei Verwendung von *T. villosa*-Laccase auf  $751 \text{ mm}^2/\text{m}^2$ . In beiden Versuchsreihen (Abb. 4.2.5 und Abb. 4.2.6) werden die Schmutzpunktflächen mit steigender HBT-Dosierung zusätzlich reduziert und erreichen Werte von  $527 \text{ mm}^2/\text{m}^2$  (Abb. 4.2.5) bzw.  $250 \text{ mm}^2/\text{m}^2$  (Abb. 4.2.6). Am stärksten ausgeprägt ist dieser Trend bei Verwendung der Laccase von *T. villosa*.

Einzelne Werte, die vom Trend abweichen, dürfen nach Erachten des Autors nicht überinterpretiert werden, da die Güte des Flotationsdeinkings stark von der handwerklichen Präzision bei der Versuchsdurchführung abhängt. Dieser sind jedoch im täglichen Laborbetrieb Grenzen gesetzt. Auch die Weißgrad- und Schmutzpunktanstiege bei der Dosierung von 1000 U Laccase und 2 % HBT in den Abb. 4.2.5 und 4.2.6 werden aus diesem Grund als Ausreißer angesehen, zumal in den Abb. 4.2.1 und 4.2.2 mit diesen Dosierungen die niedrigsten Weißgrade erzielt werden.

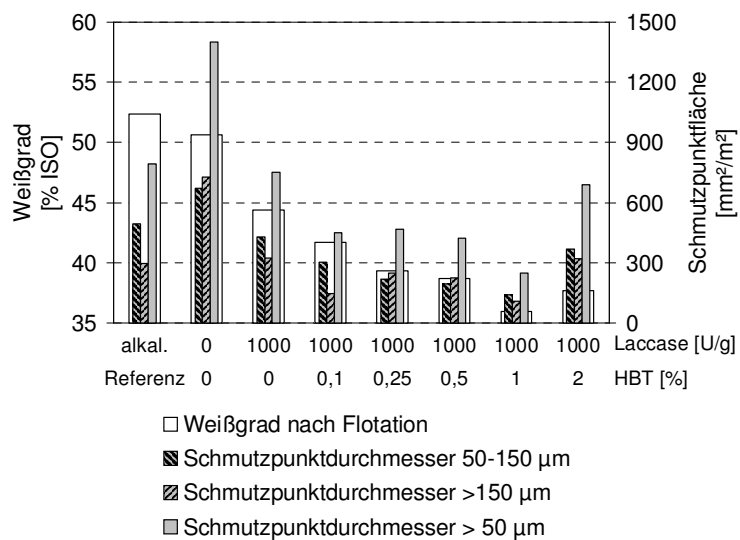
Bei den mit Laccase und Mediator behandelten Proben beträgt das Verhältnis der Schmutzpunktflächen der Schmutzpunktdurchmesser  $< 50\text{-}150\mu\text{m}$  und Schmutzpunktdurchmesser  $>150\mu\text{m}$  in etwa 1:1. Dadurch überwiegt je nach Versuch einmal die eine und einmal die andere Fraktion geringfügig.

Der bei neutralem pH-Wert unsichere Trend der Schmutzpunktabnahme mit steigender HBT-Gabe kann für die *M. thermophila*-Laccase bei pH 4,5 deutlicher herausgearbeitet werden (Abb. 4.2.5). Klar zu erkennen ist dieser Effekt bei Verwendung der *T. villosa*-Laccase (Abb. 4.2.6). Neu ist hier, dass die Schmutzpunktflächen in beiden Versuchsreihen den alkalischen Referenzwert unterschreiten können. Das Ergebnis der Schmutzpunktbestimmung muss allerdings wieder wegen des starken Weißgradverlustes relativiert werden. Die Schmutzpunktabnahme kann zu diesem Zeitpunkt für alle bisher gezeigten Resultate wegen der kontrastabhängigen Messtechnik des DOT-Counters nicht als signifikant eingestuft werden.

Bei saurer Fahrweise ist also die Abnahme des Weißgrades deutlich stärker ausgeprägt als bei neutralem pH-Wert. Im Gegensatz zur Inkubation im Neutralbereich nehmen auch die Schmutzpunktflächen mit steigender HBT-Konzentration deutlich ab. Die DOT-Counter-bedingten Interpretationsschwierigkeiten bleiben jedoch bestehen.



**Abb. 4.2.5:** Weißgrad- und Schmutzpunktentwicklung von AP nach Inkubation mit *M. thermophila*-Laccase und HBT bei pH 4,5 und nachfolgender Flotation



**Abb. 4.2.6:** Weißgrad- und Schmutzpunktentwicklung von AP nach Inkubation mit *T. villosa*-Laccase und HBT bei pH 4,5 und nachfolgender Flotation

#### 4.2.1.3 Weitere Versuche zur Dosierung von Laccase und HBT im neutralen pH-Bereich

In den bisher dargestellten Versuchen wird im Wesentlichen mit Laccase-Dosierungen von 1000 U (Aktivität bestimmt bei pH 4,5) gearbeitet und ein deutlicher Weißgradabfall beobachtet. Diese Weißgradreduzierung war auch bei 100 U vorhanden. Zur Verifizierung dieser Beobachtung werden im Folgenden Versuche mit deutlich niedrigeren Laccase-Dosierungen durchgeführt. Gewählt werden 10, 50, 100 und 1000 U/g otf Altpapier, wobei der Dosierung von 1000 U eine Referenzfunktion zukommt, da das zu erwartende Ergebnis aus den vorhergehenden Versuchen bereits mehrfach bestätigt wird. Um auch die Mediatorkonzentration zu variieren, erfolgt neben der Versuchsreihe ohne HBT-Zugabe eine weitere mit 0,25 % sowie eine mit 1 % HBT.

Die Durchführung der Versuche war aus zeitlichen Gründen nur mit einer der bisher getesteten Laccasen möglich. Die Wahl fiel auf die Laccase von *T. villosa*. Für diese Entscheidung spricht das bessere Abschneiden der *T. villosa*-Laccase bei der Umsetzung von HBT (vergl. Kap 4.1.2) und Ergebnisse aus der Literatur, in denen beschrieben wird, dass die *M. thermophila*-Laccase durch HBT schneller inaktiviert wird als die Laccase von *T. villosa* (KRUUS und VIIKARI, 2001).

Eine Hyperwäsche im Anschluss an die Flotation ergänzt die Versuche. Mit dieser Methode wird untersucht, ob durch die enzymatische Behandlung Druckfarbepartikel in feindisperse Teilchen zerlegt werden, deren Partikelgröße unterhalb der Flotationsgrenze (ca. 5 µm) liegt. Sind solche nicht flotierbare, aber auswaschbare Partikel im System vorhanden, können sie in einem Anstieg des Weißgrades nach Hyperwäsche auf oder über das Weißniveau der Referenz erkannt werden. Allerdings besteht bei solchen Partikeln auch die Gefahr, dass sie auf die Faser irreversibel aufziehen und dann zu einer Vergrauung derselben führen können. Die Hyperwäsche erfolgt wie die Flotation bei pH 9,5, um aktive Laccase im System weitgehend ausschließen zu können. Die Probenentnahmen nach Flotation und Wäsche erfolgen bei pH 7.

Alle drei Versuchsreihen führen unabhängig von der Mediatorkonzentration zu vergleichbaren Ergebnissen. Daher beschränkt sich die Diskussion der Ergebnisse auf die HBT-freie Versuchsreihe (Abb. 4.2.7, Abb. 4.2.8 sowie Tab. 4.2.1). Die Resultate der Versuchsreihen mit 0,25 % (Abb. 4.2.9, Abb. 4.2.10 sowie Tab. 4.2.2) und 1 % HBT (Abb. 4.2.11, Abb. 4.2.12 sowie Tab. 4.2.3) werden in den Anhängen 8 bis 10 wiedergegeben.

Wie gehabt stellt die alkalische Referenz das beste Flotationsergebnis mit 56,6 % ISO Weiße und einer Gesamtschmutzpunktfäche von 420 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> dar. Der Weißgrad der neutralen Referenz liegt um 5,8 % ISO niedriger, die Gesamtschmutzpunktfäche ist mit 728 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> fast doppelt so hoch. Die Weißgrade bleiben bei Laccasegaben bis 100 U/g otro AP weitgehend unbeeinflusst. Mit 1000 U Laccase sinkt jedoch der Weißgrad um weitere 3,9 % ISO.

Die Schmutzpunktfächen übertreffen im Bereich von 10 bis 100 U Laccase den Wert der neutralen Referenz. In Abb. 4.2.7 sind dies rund 200 bis 700 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> mehr als die Gesamtschmutzpunktfäche der enzymfreien, neutralen Referenz von 728 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>. Die niedrigste Schmutzpunktfäche der enzymatisch behandelten Proben von 587 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> wird bei der höchsten Laccasedosierung (1000 U) und damit bei der niedrigsten Weiße erzielt.

Wegen der gesunkenen Weißgrade ist die Beurteilung schwierig, ob die beobachtete Reduzierung der Schmutzpunkte signifikant sein kann. Wie im Methodenteil beschrieben, werden die Schmutzpunkte mit einem DOT-Counter bestimmt. Dieses Gerät arbeitet abhängig vom Kontrast und liefert daher zwangsweise bei niedrigeren Weißgraden niedrigere Schmutzpunktzahlen. Dieser Aspekt muss gerade hier berücksichtigt werden, da die erzielten Weißgrade mit der neutralen Fahrweise nur rund 50 % ISO betragen und mit 1000 U Laccase um weitere 3 Punkte auf 47 % ISO absinken.

Die Hyperwäsche der flotierten Proben sollte weitere Informationen zur Interpretation der bisher erhaltenen Ergebnisse liefern. Bei diesem Verfahren wird der Stoff gegen ein Sieb von 64 µm Maschenweite gewaschen und Partikel entsprechenden Durchmessers entfernt. Dies sind Druckfarbenpartikel, die zu klein sind, um flotiert werden zu können, Faserbruchstücke und Füllstoffe. Die Füllstoffe tragen beim Fertigprodukt Papier zur Erhöhung des Weißgrades bei. Deren Entfernung ist daher üblicherweise mit einem Abfall des Weißgrades verbunden. Um die Weißgrade einer flotierten und einer gewaschenen Altpapierprobe vergleichen zu können, werden die Aschegehalte der Proben bestimmt und die Weißgrade auf den Aschegehalt des Ausgangspapiers umgerechnet.

Die Weißgrade der alkalischen Referenz nach Flotation und Hyperwäsche (Abb. 4.2.8) sind mit 56,6 % ISO bzw. 56,2 % ISO nahezu identisch, obwohl sich ihre Aschegehalte\* mit 11,3 % bzw. 2,2 % deutlich unterscheiden. Dies liegt vermutlich daran, dass der flotierte Stoff reichlich Druckfarbenpartikel enthält, deren

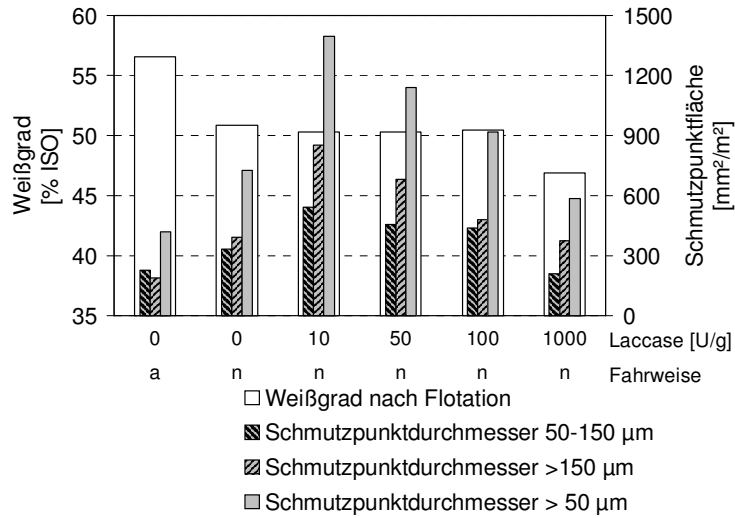
---

\* siehe Anhang 11

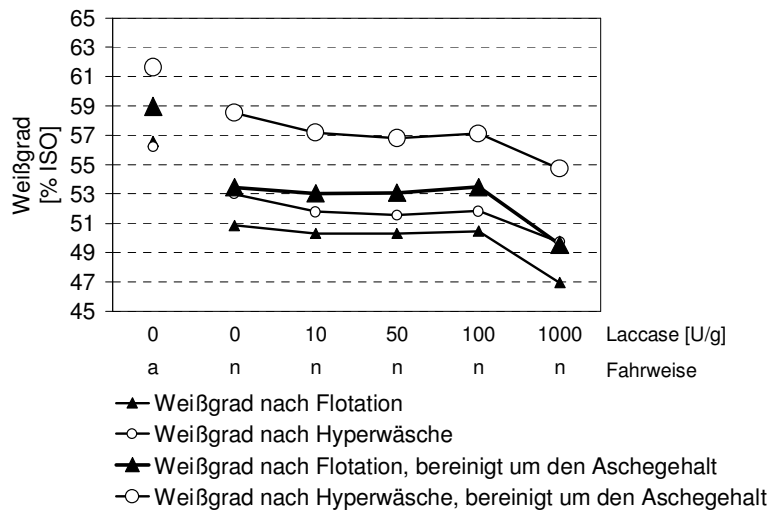
Durchmesser unterhalb der Flotationsgrenze von ca. 5  $\mu\text{m}$  liegt, so dass deren Entfernung während der Wäsche den entaschungsbedingten Weißgradabfall ausgleicht. Die um den Aschegehalt bereinigten Weißgrade (59 % ISO nach Flotation, 61,6 % ISO nach Hyperwäsche) zeigen, dass das Flotationsverfahren fast 2,6 Punkte des möglichen Weißgewinns nicht erzielen kann (Abb. 4.2.8).

Die Güte des Austrags von Druckfarben mit Hilfe des Neutralverfahrens ist deutlich schlechter, denn bereits ohne Korrektur um den Aschegehalt liegt der Weißgrad nach Hyperwäsche trotz Entaschung um 2,2 Punkte höher. Entsprechend ist der Weißgewinn als Differenz der um den Aschegehalt bereinigten Weißgrade mit 5,1 % ISO deutlich höher als im Fall der alkalischen Referenz. Dass deren Weißgrad nach Hyperwäsche und Aschekorrektur um 3,1 % ISO höher liegt als der entsprechende Wert der neutralen Referenz, liegt am Bleicheffekt des Wasserstoffperoxids und vermutlich am erhöhten Anteil nicht abgelöster Restdruckfarbe, der auch nach Hyperwäsche im Stoff enthalten ist.

Interessant ist nun der Verlauf der Weißgrade der enzymatisch behandelten Proben. Von 0 bis 100 U Laccase verlaufen die Weißgrade nach Flotation (mit und ohne Korrektur um den Aschegehalt) annähernd parallel zur X-Achse des Koordinatensystems. Erst die Dosierung von 1000 U Laccase bewirkt den Weißgradabfall von 3,9 Punkten. Sollte dieser Abfall darauf zurückzuführen sein, dass mit Hilfe der Laccase bzw. des Mediators Schmutzpunkte so fein dispergiert werden, dass sie in nicht flotierbarer Form vorliegen, müsste nach deren Entfernung durch Hyperwäsche der um den Aschegehalt korrigierte Weißgrad den Wert der neutralen Referenz erreichen. Tatsächlich aber zeigen die Weißgrade nach Hyperwäsche und Aschekorrektur mit steigender Enzymdosis eine Verringerung des Weißgrades. Damit wird ein enzymatischer Druckfarbenabbau als primäre Ursache für den Weißgradabfall unwahrscheinlich. Er kann aber nicht ausgeschlossen werden.



**Abb. 4.2.7:** Weißgrad- und Schmutzpunktentwicklung von AP nach Inkubation mit *T. villosa*-Laccase bei neutralem pH-Wert und nachfolgender Flotation. a = alkalische Referenz; n = neutrale Fahrweise



**Abb. 4.2.8:** Weißgrade von AP nach Inkubation mit *T. villosa*-Laccase bei neutralem pH-Wert sowie nachfolgender Flotation und Hyperwäsche. a = alkalische Referenz; n = neutrale Fahrweise

Um mehr Klarheit über diesen Weißgradabfall zu erhalten, werden in Tab. 4.2.1 die Helligkeitswerte  $L^*$ , die Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  des CIELAB-Systems sowie die Gelbwerte zusammen mit den entsprechenden Weißgraden für die Daten der Abb. 4.2.7 aufgelistet.

Nach Flotation wie nach Hyperwäsche verlaufen Weißgrad und Helligkeit  $L^*$  parallel zueinander. Mit steigender Laccase-Dosis sinken die Weißgrade und die Helligkeitswerte  $L^*$ . Nach Flotation nimmt dabei mit steigender Laccase-Dosierung der Farbwert  $a^*$  zu, in Tab. 4.2.1 von -0,78 auf -0,43. Für den Farbwert  $b^*$  und den Gelbwert ist nach Flotation noch kein Zusammenhang mit der Laccasedosierung zu erkennen.

Anders entwickeln sich dagegen diese Werte nach Durchführung der Hyperwäsche. Nun korrelieren Weißgrad, Helligkeit  $L^*$ , die Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  sowie der Gelbwert mit steigender Laccase-Dosierung. Dabei werden unabhängig von der HBT-Dosierung vergleichbare Werte erreicht, so dass eine besondere Wirkung des Mediators nicht zu erkennen ist.<sup>1</sup> In Tab. 4.2.1 beträgt beispielsweise der Weißgrad des neutralen Referenzwertes nach Hyperwäsche 53,0 % ISO und sinkt bei 1000 U Laccase auf 49,7 % ISO ab. Die entsprechenden Helligkeitswerte nehmen von 80,53 auf 78,96 ab. Die Farbkennzahl  $a^*$  bewegt sich vom grünen Bereich ( $a^*=-1,12$ ) in Richtung des Koordinatenursprungs ( $a^*=-0,56$ ). Die Farbkennzahl  $b^*$  steigt dabei ausgehend von  $b^*=5,64$  an und intensiviert mit  $b^*=6,32$  den gelben Farbton. Damit steigt der Gelbwert ausgehend von 11,2 bis auf 13,3 an.

In der Praxis steigt der Gelbwert beim konventionellen Flotationsdeinking holzhaltiger Papiere mit steigendem Druckfarbenaustrag ebenfalls an. Die Vergilbung wird dadurch erklärt, dass bei der Reinigung des Altpapierstoffes durch den steigenden Austrag an Druckfarbe, Fein- und Füllstoffen der Blick auf den ligninreichen, vergilbten Faserstoffanteil (TMP, Holzschliff) freigegeben wird. Dies geht allerdings beim Deinking auf Grund des Druckfarbenaustrages mit einem Weißgradanstieg einher.

Hier zeigt sich aber, dass nach der Hyperwäsche mit der Vergilbung eine Vergrauung zu beobachten ist. Als Ursache für diese Vergrauung kommen zwei Ursachen in Frage: Die Verdunkelung der enzymatisch behandelten Proben kann auf enzymatisch feindispersierte Druckfarbenpartikeln beruhen oder auf einer Laccase-induzierten Ligninvergilbung. Zur Beantwortung dieser Frage sind weitere Versuche notwendig.

---

<sup>1</sup> vergl. Tab. 4.2.2 und Tab. 4.2.3 in Anhang 10

**Tab. 4.2.1:** Weißgrade, Farborte und Gelbwerte von AP nach Inkubation mit *T. villosa*-Laccase bei neutralem pH-Wert sowie nachfolgender Flotation und Hyperwäsche

| Laccase [U/g]     | 0                | 10    | 50    | 100   | 1000  |
|-------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|
|                   | nach Flotation   |       |       |       |       |
| Weißgrad [% ISO]  | 50,8             | 50,3  | 50,3  | 50,5  | 46,9  |
| Helligkeit L* [-] | 78,87            | 78,76 | 78,77 | 79,14 | 76,66 |
| grün-rot a* [-]   | -0,78            | -0,57 | -0,52 | -0,41 | -0,43 |
| blau-gelb b* [-]  | 4,60             | 5,18  | 5,19  | 5,74  | 5,14  |
| Gelbwert [-]      | 9,7              | 10,9  | 10,9  | 12,2  | 11,1  |
|                   | nach Hyperwäsche |       |       |       |       |
| Weißgrad [% ISO]  | 53,0             | 51,8  | 51,5  | 51,8  | 49,7  |
| Helligkeit L* [-] | 80,53            | 80,00 | 79,89 | 80,19 | 78,96 |
| grün-rot a* [-]   | -1,12            | -0,80 | -0,77 | -0,66 | -0,56 |
| blau-gelb b* [-]  | 5,64             | 6,03  | 6,05  | 6,30  | 6,32  |
| Gelbwert [-]      | 11,2             | 12,3  | 12,4  | 12,9  | 13,3  |

#### **4.2.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Versuchen zum Deinking von AP**

Im Rahmen der Untersuchungen mit Laccase, Mediator HBT und Altpapier können bisher folgende Beobachtungen gemacht werden:

Die Inkubation mit bis zu 50 U Laccase pro Gramm alterter Modellpapiermischung für Haushaltssammelware hat keinen Einfluss auf Weißgrade und Schmutzpunktflächen der flotierten Proben.

Ab 100 U Laccase fällt in einem Teil der Versuchsreihen der Weißgrad deutlich ab. Dieser Effekt ist im sauren pH-Bereich deutlicher ausgeprägt als im neutralen. Es handelt sich daher vermutlich um einen enzymatisch induzierten Effekt. Zum Teil bleibt allerdings bei 100 U der Weißgrad noch konstant. Da die Messreihen mit verschiedenen Papierchargen ausgeführt werden (aber innerhalb einer Messreihe die Papiercharge nicht gewechselt wird), kann dieser Effekt eventuell dadurch erklärt werden, dass das Enzym durch Bestandteile des Substrates Altpapier in seiner Aktivität behindert wird, die je nach Altpapiercharge in unterschiedlicher Höhe vorhanden sind (vergl. Kapitel 2.3).

Nach Inkubation mit 1000 U Laccase wird schließlich reproduzierbar ein deutlicher Weißgradabfall verursacht. Diese Verdunkelung wird mit Zugabe des Mediators HBT zum Teil verstärkt. Mit dem Weißgradabfall kommt es zu einer Vergilbung des Stoffes, deren Ursache noch nicht bekannt ist.

Eine Schmutzpunktreduktion ist immer nur in Verbindung mit einem Weißgradabfall messbar. Dieses Ergebnis kann auf Grund der kontrastabhängigen Messtechnik des DOT-Counters nicht als signifikant gewertet werden.

Die Ergebnisse der Hyperwäsche können nicht belegen, dass Druckfarbenpartikel enzymatisch zerkleinert werden. Es kommt aber zu einer deutlichen Verdunkelung des Stoffes.

Mit Hilfe der Untersuchung des Farbortes können mit steigender Laccase-Dosierung eine Verdunkelung, Vergrauung und Vergilbung beobachtet werden.

#### 4.2.2 Versuche zum Deinking von DIP

In den anschließenden Untersuchungen wird das Substrat Altpapier gegen DIP-Stoff ausgetauscht, weil die Ergebnisse der mit AP durchgeführten Versuche nicht eindeutig interpretiert werden konnten.

Dies liegt daran, dass bei Zugabe von Laccase und Mediator zum AP gleichzeitig mit dem Rückgang der Schmutzpunktflächen auch die Weißgrade abnehmen. Sinkt der Weißgrad, so nimmt der Helligkeitsunterschied bzw. der Kontrast zwischen den dunklen Schmutzpunkten und dem helleren Prüfpapier ab. Schmutzpunkte, die auf einem helleren Papier noch detektierbar wären, können dann nicht mehr erkannt werden, weil ihre Farbe mit der des Prüfpapiers zusammenfällt. Das Ausmaß des Verschwindens von Schmutzpunkten durch einen Weißeverlust fällt daher bei einem Prüfpapier mit niedrigerem Weißgrad größer aus als bei einem Prüfpapier mit höherem Weißgrad. Dadurch haben geringe Weißänderungen einen großen Effekt auf die DOT-Counter-Analyse. Dies ist bei den Versuchsergebnissen mit Altpapier vermutlich der Fall, da hier Prüfbblätter ausgewertet werden, die einen Weißgrad von  $\leq 50$  % ISO besitzen.

Weniger ausgeprägt sollte dieser kontrastabhängige Messfehler des DOT-Counters bei höheren Weißgraden sein. Die Verwendung eines DIP-Stoffes sollte es ermöglichen, am Ende der Flotationsversuche Prüfbblätter mit entsprechend höherem Weißniveau zu bekommen. Die Aussagekraft der Schmutzpunktbestimmung mit Hilfe des DOT-Counters sollte dann weniger vom Weißgrad abhängen.

Ein weiterer Aspekt, der für eine Verwendung des DIP-Stoffes spricht, ist die Überlegung, dass ein positiver enzymatischer Effekt beim Deinking von Zeitungsdrucken eventuell darum nicht erkannt werden kann, weil auch bei künstlich gealterten Drucken der Großteil der anhaftenden Druckfarbe weitgehend ohne Verwendung von Laccase problemlos entfernbar sein sollte. Wenn in den bisherigen Versuchen nur ein geringer Effekt durch eine enzymatische Behandlung zu beobachten ist, kann die Ursache dafür darin begründet sein, dass die Laccasen lediglich Druckfarbenpartikel abbauen, die auch ohne enzymatischen Angriff entfernbar sind. In diesem Fall ist dann kein Effekt im Vergleich zur neutralen Referenz messbar. Deutlich erkennbar müsste ein enzymatisches Ablösen von Druckfarben sein, wenn sich das „Angebot“ von Druckfarbenpartikeln auf solche beschränkt, die mit einem enzymfreien Verfahren (neutrales oder alkalisches Deinking) nicht ohne weiteres entfernt werden können. Ein Sekundärfaserstoff, der diese Eigenschaften erfüllt, ist bereits deinkter Stoff (DIP).

Die Erwartung, mit der Wahl des im Vergleich zu AP wesentlich helleren DIP Farbstoffänderungen besser beobachten und damit eher Aussagen über die Natur des Weißgradabfalls machen zu können, ist ein dritter Aspekt zur Wahl dieses Sekundärfaserstoffes.

Bisher ist offen geblieben, ob der beobachtete Weißgradabfall und die Vergilbung des Stoffes durch ein Aufziehen feindisperser Druckfarbenpartikel auf die Faser und/oder durch eine laccasebedingte Ligninmodifikation verursacht werden. Wenn in Verbindung mit dem an Druckfarbenpartikeln deutlich ärmeren DIP in ähnlicher Weise wie beim druckfarbenreichen AP Vergrauungs- und Vergilbungserscheinungen auftreten, so kann die Ursache dafür primär nicht in einem Aufziehen von Druckfarbenpartikeln zu suchen sein. Dann muss es sich um eine laccasebedingte Ligninvergilbung handeln.

Ziel des Projektes, in dem die vorliegende Arbeit entstand, ist die Verbesserung des Neutralverfahrens. Ideal wäre für diese Versuche ein ausflotierter Stoff eines altpapierverarbeitenden Werkes, das im Neutralverfahren arbeitet. Dieser ist aber nicht verfügbar. Die Möglichkeit, den DIP-Stoff im Labor selbst herzustellen, wird angesichts des engen Projektzeitrahmens nicht wahrgenommen. Eine Alternative stellt ausflotierter Stoff dar, der von einer Papierfabrik bezogen wird, die mit dem herkömmlichen alkalischen Verfahren unter Einsatz von Natronlauge, Wasserglas und Wasserstoffperoxid arbeitet. Da sich die Druckfarbenablösung im alkalischen Verfahren von dem des Neutralverfahrens unterscheidet (Faserquellung!), sind die dabei entstehenden DIP-Stoffe sicherlich nicht direkt miteinander vergleichbar. Dieser Weg wird aber begangen. Einmal aus zeitlichen Gründen, zum anderen aus der Überlegung heraus, dass bei einem positiven Effekt sich eventuell für oxidative Enzyme Anwendungsmöglichkeiten auch in konventionell arbeitenden Fabriken auftun. Letztendlich handelt es sich bei den Schmutzpunkten, die am Ende des Flotationsprozesses noch vorhanden sind, um die schwieriger zu entfernenden Druckfarbenpartikel.

Der hier verwendete DIP-Stoff wird von der Firma Steinbeis Temming in Glückstadt bereitgestellt. Deinkt wird eine Mischung aus Druckereiabfällen und Haushalts-sammelware. Der Stoff wird an der Doppelsiebpresse nach abgeschlossener Flotation vor der Dispergerbleiche entnommen. Gelagert wird der Stoff maximal über 7 Tage bei ca. +2 bis +5 °C.

#### 4.2.2.1 DIP-Stoffbehandlung mit *Trametes villosa* - Laccase und Mediator HBT

Die Inkubation des DIP erfolgt mit Laccase von *T. villosa* und HBT als Mediator, das in 75 ml Aceton gelöst wird. Anschließend werden die Stoffproben flotiert und einer Hyperwäsche unterzogen. In einer ersten Versuchsreihe wird mit 10, 50, 100 und 1000 U Laccase pro g otro DIP und 1 % HBT gearbeitet. Die Ergebnisse werden in Abb. 4.2.13, Abb. 4.2.14 und Tab. 4.2.4 wiedergegeben.

Die Weißgrade nach Flotation bleiben nach Vorbehandlung mit bis zu 50 U Laccase auf einem konstanten Niveau von 67 % ISO. Bereits mit 100 U fallen sie auf 65,6 % ISO ab. Das Weißgradminimum von 63,3 % ISO liegt wie bei den Versuchen mit AP wieder bei der Versuchsvariante mit der höchsten Laccasedosierung von 1000 U (Abb. 4.2.13). Die Laccase-Mediator-Behandlungen haben keinen Einfluss auf die Schmutzpunktfächen, die im Rahmen der Versuchsgenauigkeit mit rund 10 % Abweichung kaum von der Fläche des neutralen Referenzwertes (147 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>) abweichen (Abb. 4.2.13).

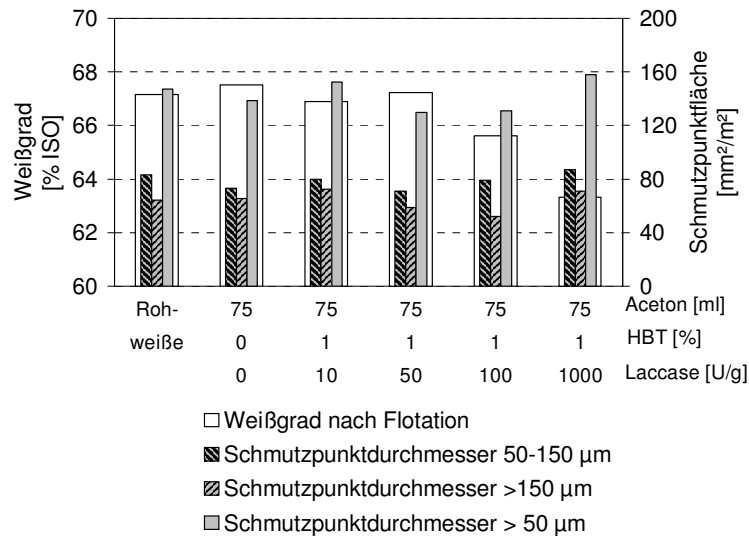
Die Weißgrade nach Flotation und Hyperwäsche verlaufen vor wie nach der Bereinigung der Werte um den Aschegehalt parallel zueinander (Abb. 4.2.14). Bis 50 U Laccase liegen die Weißgrade nach Hyperwäsche relativ konstant bei ca. 65,5 % ISO, um dann bei 100 U auf 63,3 und bei 1000 U auf 62,5 % ISO abzusinken. Dabei liegen die Werte nach Hyperwäsche um rund 1,5 % ISO niedriger als nach Flotation. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Ausmaß des Weißabfalls infolge der Entaschung den Weißzuwachs durch Entfernung nicht flotierbarer Druckfarbepartikel übertrifft. Entsprechend verläuft nach Bereinigung der Weißgrade um den Aschegehalt die Kurve der flotierten um 2,5 % ISO unterhalb der Kurve der hypergewaschenen Proben. Diese Differenz entspricht dem Ausmaß des Weißgewinns durch Austrag nicht flotierbarer Schmutzpartikel. Die erzielten Weißgrade nach Hyperwäsche liegen bis 50 U bei rund 72 % ISO und fallen dann vergleichbar mit den anderen Weißgradkurven bei 100 U um 2 % ISO und bei 1000 U sogar um 4 % ISO ab.

Der parallele Verlauf aller Weißgradkurven, insbesondere der Abfall der um den Aschegehalt bereinigten Weißgrade nach Hyperwäsche zeigt, dass die ab 100 U eintretende Vergrauung nicht mit der LMS-unterstützten Bildung fein dispergierter Druckfarbepartikel mit einem Durchmesser unterhalb der Flotierbarkeitsgrenze erklärt werden kann. Denn verglichen mit dem an Druckfarben viel reicheren AP (Abb. 4.2.8, 4.2.10<sup>1</sup> und 4.2.12<sup>2</sup>) tritt der Weißabfall bei Verwendung des deutlich

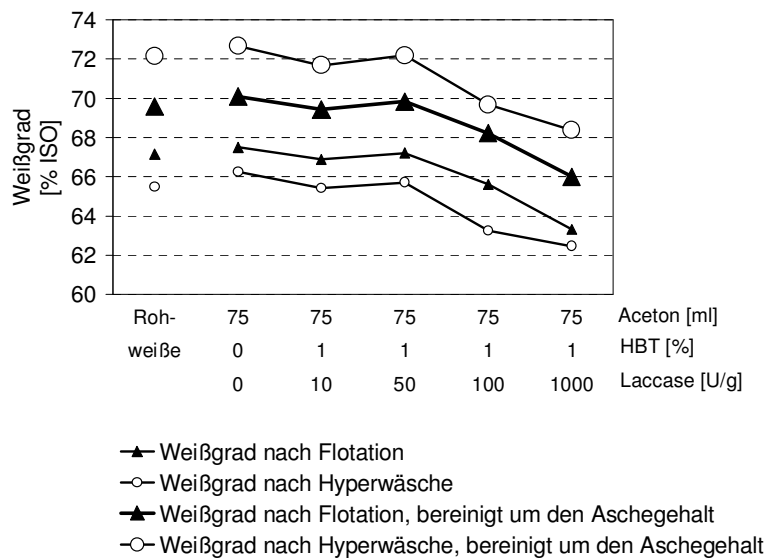
---

<sup>1</sup> siehe Anhang 8    <sup>2</sup> siehe Anhang 9

druckfarbenärmeren DIP mit rund 4 % ISO bei 1000 U ähnlich intensiv ein. Dies könnte nicht der Fall sein, wenn der Weißabfall vom Druckfarbenanteil des Sekundärfaserstoffes abhängig wäre.



**Abb. 4.2.13:** Weißgrad und Schmutzpunkte nach Flotation von mit *T. villosa*-Laccase und Mediator HBT neutral behandeltem DIP



**Abb. 4.2.14:** Weißgrade nach Flotation und Hyperwäsche von mit *T. villosa*-Laccase und Mediator HBT neutral behandeltem DIP

Bei Betrachtung der Farbwerte  $L^*$ ,  $a^*$  und  $b^*$  (Tab. 4.2.4) sind nun bereits nach Flotation die Trends vorhanden, die im Fall des AP erst nach Hyperwäsche (Tab.

4.2.1 - 4.2.3<sup>1)</sup> zu erkennen waren. So geht mit dem Abfall der Weißgrade nach Flotation die Helligkeit von 88,55 auf 86,87 zurück. Der Farbwert  $a^*$  erhöht sich gleichzeitig kontinuierlich von 0,28 auf 0,40. Der Farbwert  $b^*$  liegt nun im gelben Bereich und steigt von 5,77 auf 6,70. Der Gelbwert wächst von 11,8 auf 13,8 an.

In vergleichbarem Umfang verändern sich die Werte nach Hyperwäsche. Die Helligkeit  $L^*$  sinkt von 88,21 auf 86,40 ab, der Farbwert  $a^*$  erhöht sich von 0,03 auf 0,09, der Farbwert  $b^*$  von 6,46 auf 7,11 und der Gelbwert von 12,9 auf 14,5.

**Tab. 4.2.4:** Farbbort, Weißgrad und Gelbwert von mit *T. villosa*-Laccase und Mediator HBT neutral behandeltem DIP nach Flotation

| Laccase [U/g]        | Eingangs- | 0                | 10    | 50    | 100   | 1000  |
|----------------------|-----------|------------------|-------|-------|-------|-------|
| HBT [%]              | werte     | 0                | 1     | 1     | 1     | 1     |
| Aceton [ml]          |           | 75               | 75    | 75    | 75    | 75    |
|                      |           | nach Flotation   |       |       |       |       |
| Helligkeit $L^*$ [-] | 88,31     | 88,55            | 88,32 | 88,57 | 87,80 | 86,87 |
| grün-rot $a^*$ [-]   | 0,27      | 0,28             | 0,28  | 0,34  | 0,28  | 0,40  |
| blau-gelb $b^*$ [-]  | 5,61      | 5,77             | 5,91  | 6,05  | 6,15  | 6,70  |
| Weißgrad [% ISO]     | 67,2      | 67,5             | 66,9  | 67,2  | 65,6  | 63,3  |
| Gelbwert [-]         | 11,5      | 11,8             | 12,0  | 12,3  | 12,5  | 13,8  |
|                      |           | nach Hyperwäsche |       |       |       |       |
| Helligkeit $L^*$ [-] | 87,73     | 88,21            | 87,85 | 88,01 | 86,96 | 86,40 |
| grün-rot $a^*$ [-]   | 0,09      | 0,03             | 0,09  | 0,13  | 0,06  | 0,09  |
| blau-gelb $b^*$ [-]  | 6,33      | 6,46             | 6,56  | 6,57  | 7,02  | 7,11  |
| Weißgrad [% ISO]     | 65,5      | 66,3             | 65,4  | 65,7  | 63,3  | 62,5  |
| Gelbwert [-]         | 12,7      | 12,9             | 13,2  | 12,6  | 14,1  | 14,5  |

Dieses Ergebnis zusammen mit der Beobachtung, dass der Weißgrad nach Inkubation von AP in vergleichbarem Umfang zurückgeht wie nach Inkubation von DIP, lässt den Schluss zu, dass eine laccasebedingte Veränderung der Ligninstruktur vermutlich als Hauptverursacher der Verdunkelung und Vergilbung in Frage kommt.

Beim kommerziellen Deinking von Altpapier wird jedoch in der Praxis mit steigendem Druckfarben- und Füllstoffaustrag ein Weißanstieg und eine moderate Verschiebung des Farbwertes  $b^*$  zum Gelben hin beobachtet. Dabei kommt der Anstieg der Weiße durch den Druckfarbenaustrag und die Vergilbung durch das Hervortreten der Eigenfarbe des gelblichen Holzstoffes infolge des Austrags von Füllstoff, Feinstoff und Druckfarbenpartikeln zustande.

<sup>1</sup> Tab. 4.2.1: siehe Kap. 4.2.1.3; Tab. 4.2.2 und Tab. 4.2.3: siehe Anhang 10

Diese Farbort- und Weißentwicklung ist auch bei der Flotation des DIP - wenn auch nur in geringen Grenzen - beim Vergleich der DIP-Stoff-Eingangswerte mit den Enzym- und Mediator-freien neutralen Referenzwerten des im Labor flotierten DIP zu beobachten. Bei einem sehr geringen Weißegewinn durch die Flotation - der Weißgrad steigt von 67,2 % ISO auf 67,5 % ISO - steigen die Helligkeit  $L^*$  (von 88,31 auf 88,55), der Farbwert  $a^*$  (von 0,27 auf 0,28) und  $b^*$  (von 5,61 auf 5,77) sowie der Gelbwert (von 11,5 auf 11,8) leicht an.

Mit steigender Zugabe von Laccase und HBT wird aber mit der steigenden Vergilbung das Weißeniveau der Rohweiße (Weiße des DIP vor jeglicher Behandlung) um bis zu 4 % ISO unterschritten. Ein simples Hervortreten der Eigenfarbe der holzhaltigen Fasern reicht damit als Erklärungsansatz für die beobachteten Verfärbungsreaktionen nicht aus. Die Inkubation mit Laccase und HBT muss viel mehr einen Effekt besitzen, der einer Vergilbung entspricht.

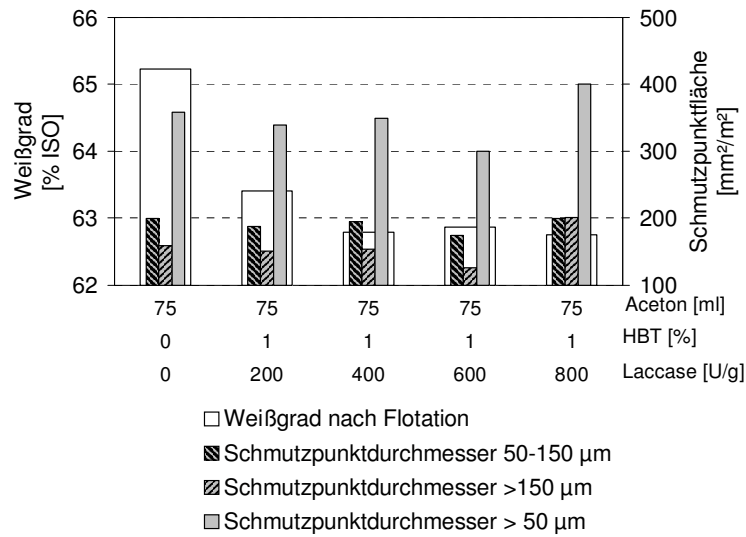
So ähneln die beobachteten Farbveränderungen sehr den Daten von ROBERT und DANEAULT (1995). Sie untersuchten die lichtinduzierte Vergilbung von Holzstoffen und fanden heraus, dass in Folge der Bestrahlung der Weißgrad und die Helligkeit  $L^*$  sinken und die Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  zunehmen. Sie geben beispielsweise an, dass der Weißgrad eines peroxidebleichten TMP von 71,4 % ISO auf 33,5 % ISO und die Helligkeit  $L^*$  von 93,61 auf 83,10 sinkt.  $a^*$  steigt dabei von -1,01 auf 2,28 und  $b^*$  von 10,91 auf 32,66.

Bei den Versuchen mit AP schien es noch zu früh, als alternativen Erklärungsansatz für die Abnahme der Helligkeit  $L^*$  ein Aufziehen enzymatisch fein dispergierter Druckfarben auf die Fasern auszuschließen. Dies ist nun möglich, da das Schmutzpunktniveau konstant bleibt (vergl. Abb. 4.2.13) und keinen Rückschluss auf einen Druckfarbenabbau zulässt.

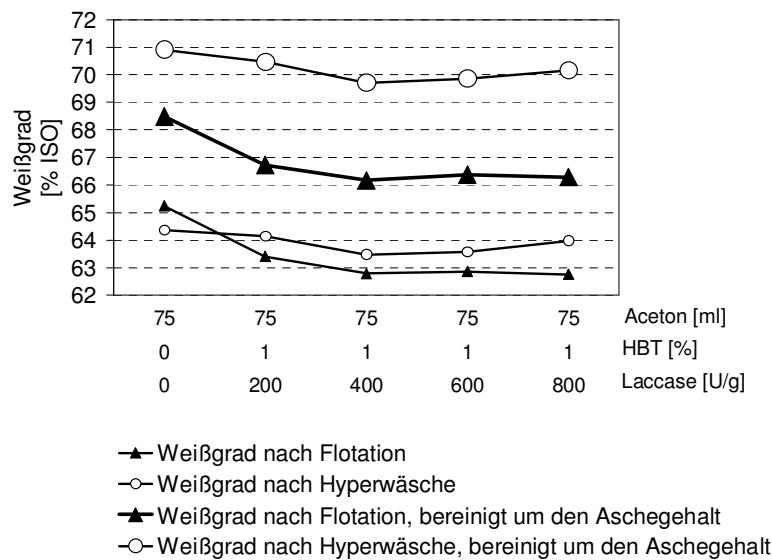
Die Durchführung einer zweiten Versuchsreihe (Abb. 4.2.15), bei der DIP vor Flotation mit 1 % HBT und Laccase-Dosierungen von 200 bis 800 U/g inkubiert wird, hat zum Ziel, eine Aussage für den gesamten Aktivitätsbereich zwischen 100 und 1000 U/g Laccase machen zu können. Diese Versuchsreihe wird mit einer neuen DIP-Charge durchgeführt, was am gegenüber Abb. 4.2.13 um 2 % ISO niedrigeren Referenzweißgrad von 65,2 % ISO und an der mit durchschnittlich 350 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> doppelt so hohen Schmutzpunktfläche zu erkennen ist.

Bereits bei einer Laccase-Dosierung von 200 U fällt der Weißgrad nach Flotation mit 63,4 % ISO gegenüber dem Referenzwert von 65,2 % ISO deutlich ab (Abb. 4.2.15). Mit 400 U erreicht der Weißgrad den Minimalwert von 62,8 % ISO, der mit höheren Laccasedosierungen nicht weiter absinkt. Die Schmutzpunktflächen ändern sich durch die LMS-Behandlung nicht. Die Flächen der enzymatisch behandelten Proben liegen im Rahmen der Versuchsgenauigkeit mit maximal 16 % Abweichung alle im Bereich der neutralen Referenz, die bei 358 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> liegt.

Ähnlich, aber weniger deutlich ausgeprägt wie in Abb. 4.2.14, sinkt der Weißgrad nach Hyperwäsche mit steigender Laccase-Dosierung. Der nicht um den Aschegehalt bereinigte Referenzwert von 64,4 % ISO wird nur um 0,3 - 0,9 % ISO und der bereinigte Referenzwert nach Hyperwäsche von 70,9 % ISO nur um 0,4 - 1,2 % ISO unterschritten. Diese geringen Weißgradunterschiede sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Referenzweißgrad nach Hyperwäsche selbst zu niedrig ausgefallen ist. Dieser liegt mit 64,4 % ISO unter dem Weißgrad nach Flotation von 65,2 % ISO. Dagegen liegen die Weißgrade nach Hyperwäsche für die enzymatisch behandelten Proben um ca. einen Punkt Weiße höher. Eventuell kann dies dadurch erklärt werden, dass die Neutralisierung des Stoffes vor der Weißgradblattbildung für den Referenzwert nach Hyperwäsche fehlerhaft durchgeführt worden ist. Dass der Weißgrad nach Hyperwäsche für den Referenzwert niedriger und für die enzymatisch behandelten Proben höher liegt, könnte auch mit der LMS-bedingten Bildung auswaschbarer Verfärbungen interpretiert werden. Da aber in dieser Untersuchung keine weitere Versuchsreihe Anhaltspunkte für einen derartigen Trend bietet, ist das Zutreffen dieser These unwahrscheinlich.



**Abb. 4.2.15:** Weißgrad und Schmutzpunkte von mit *T. villosa*-Laccase und Mediator HBT neutral behandeltem DIP nach Flotation



**Abb. 4.2.16:** Weißgrade von mit *T. villosa*-Laccase und Mediator HBT neutral behandeltem DIP nach Flotation und Hyperwäsche

Wie bisher fällt mit dem Absinken der Weißgrade bei steigender Laccase-Dosierung die Helligkeit  $L^*$  ab. Gleichzeitig nehmen die Farbwerte  $a^*$ ,  $b^*$  und die Vergilbung zu. Dies gilt für die Werte nach Flotation wie für die Werte nach Hyperwäsche. Beispielsweise sinken nach Flotation die Werte der neutralen Referenz im Vergleich zur Dosierung von 600 U Laccase und 1 % HBT für  $L^*$  von 87,49 auf 86,66. Der Farbwert  $a^*$  steigt von 0,26 auf 0,44, der Farbwert  $b^*$  von 5,98 auf 6,69 und der Gelbwert von 12,3 auf 13,9. Nicht ganz in diesen Trend passen die Werte für die Dosierung von 800 U Laccase und 1 % HBT. Hier ist die Helligkeit  $L^*$  mit 86,73 höher und der Farbwert  $a^*$  mit 0,25 niedriger als bei einer Dosierung von 600 U Laccase und 1 % HBT. Trotzdem sind die Verschiebung des Farbortes hin zu niedrigerer Helligkeit und die Zunahme der Vergilbung im Vergleich zum Referenzwert zu erkennen.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe die zuvor beobachteten Tendenzen.

**Tab. 4.2.5:** Farbort, Weißgrad und Gelbwerte von mit *T. villosa*-Laccase und Mediator HBT neutral behandeltem DIP nach Flotation und Hyperwäsche

| Laccase [U/g]        | 0                | 200   | 400   | 600   | 800   |
|----------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|
| HBT [%]              | 0                | 1     | 1     | 1     | 1     |
| Aceton [ml]          | 75               | 75    | 75    | 75    | 75    |
|                      | nach Flotation   |       |       |       |       |
| Helligkeit $L^*$ [-] | 87,49            | 86,84 | 86,65 | 86,66 | 86,73 |
| grün-rot $a^*$ [-]   | 0,26             | 0,31  | 0,32  | 0,44  | 0,25  |
| blau-gelb $b^*$ [-]  | 5,98             | 6,49  | 6,75  | 6,69  | 6,93  |
| Weißgrad [% ISO]     | 65,2             | 63,4  | 62,8  | 62,9  | 62,8  |
| Gelbwert [-]         | 12,3             | 13,3  | 13,9  | 13,9  | 14,2  |
|                      | nach Hyperwäsche |       |       |       |       |
| Helligkeit $L^*$ [-] | 87,23            | 87,19 | 87,03 | 86,99 | 87,28 |
| grün-rot $a^*$ [-]   | 0,05             | 0,16  | 0,15  | 0,32  | 0,16  |
| blau-gelb $b^*$ [-]  | 6,42             | 6,52  | 6,86  | 6,67  | 6,83  |
| Weißgrad [% ISO]     | 64,4             | 64,1  | 63,5  | 63,6  | 64,0  |
| Gelbwert [-]         | 13,0             | 13,3  | 13,9  | 13,7  | 13,8  |

#### 4.2.2.2 Einfluss steigender HBT-Gaben

In den bereits beschriebenen Versuchen mit Altpapier haben steigende HBT-Gaben teilweise ein zusätzliches Absinken des Weißgrades zur Folge. Am deutlichsten zeigt sich dies bei den Versuchen, deren Inkubationsphase im sauren pH-Bereich durchgeführt wird (Abb. 4.2.5, Abb. 4.2.6.). Undeutlicher zeichnet sich der Effekt im neutralen Bereich ab (Abb. 4.2.1, Abb. 4.2.2, Abb. 4.2.3, Abb. 4.2.4). Nicht bestätigt hat sich dieser Effekt dagegen bei Vergleich der Weißgradientwicklung zwischen den Abb. 4.2.7, 4.2.9<sup>1</sup> und 4.2.11<sup>2</sup>. Hier scheint der Mediator nicht wesentlich an der Änderung der Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  beteiligt zu sein. Die Verfärbungen sind in diesen Fällen in erster Linie von der Laccase-Konzentration abhängig. Allerdings werden für die verschiedenen Versuchsreihen unterschiedliche AP-Chargen verwendet, so dass eine direkte Vergleichbarkeit eingeschränkt ist.

Mit der folgenden Versuchsreihe wird nun der Effekt der HBT-Konzentration auf das Flotationsergebnis von DIP überprüft. Dazu wird bei konstanter Laccase-Dosierung (400 U/g) mit unterschiedlich hohen HBT-Dosierungen (0; 0,1; 0,5 und 1 % HBT/g otro DIP) gearbeitet. Zu beachten ist, dass in dieser Versuchsreihe für die Probe des Referenzwertes zwar kein Mediator, wohl aber Laccase zum Einsatz kommt.

Der Weißgrad des HBT-freien Referenzwertes nach Flotation (63,3 % ISO) wird von den Werten der übrigen Proben durch Zugabe von HBT geringfügig unterschritten (Abb. 4.2.17). Diese Werte liegen zwischen 62,5 % ISO und 62,9 % ISO. Die Daten lassen jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Höhe der HBT-Konzentration und dem Ausmaß des Weißgradabfalls zu, denn die größte Weißgraddifferenz von 0,8 % ISO wird mit der niedrigsten HBT-Dosis erzielt und die geringste von 0,4 % ISO mit 0,5 % HBT. Der Weißgrad für die höchste HBT-Dosierung liegt zwischen diesen Werten. Nach Flotation und Korrektur des Weißgrades um den ascheaustragbedingten Remissionsverlust (Abb. 4.2.18) liegen die Weißgrade um ca. 3,4 % ISO höher, es ändert sich jedoch nichts an den Relationen zwischen den Werten der einzelnen Weißgrade. Die Güte dieser Daten lässt nur eine qualitative Aussage zu, dass nämlich mit HBT der Weißgrad nach Flotation nur geringfügig abnimmt.

Das Niveau der Schmutzpunktflächen wird durch HBT nicht vermindert. Vielmehr ist die Schmutzpunktfläche der HBT-freien Referenz mit 298 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> die niedrigste innerhalb der Versuchsreihe (Abb. 4.2.17).

---

<sup>1</sup> siehe Anhang 8

<sup>2</sup> siehe Anhang 9

Nach Durchführung der Hyperwäsche sind nur geringste Unterschiede zwischen den Weißgraden der Referenz und den mit Laccase und Mediator behandelten Proben zu erkennen. Während der Referenzwert einen Weißgrad von 63,6 % ISO besitzt, liegt er mit 0,1 % HBT bei 63,8 % ISO, mit 0,5 % HBT bei 63,9 % ISO und mit 2 % HBT bei 63,4 % ISO. Mit maximal 0,3 % ISO Differenz kann hier nicht mehr von einem Weißgradunterschied gesprochen werden. Nach Durchführung der Aschekorrektur weichen die Weißgrade der mediatorbehandelten Proben maximal um 0,2 % ISO vom Referenzwert (70,3 % ISO) ab und liegen ähnlich dicht beieinander wie direkt nach der Hyperwäsche. Damit ist nach Hyperwäsche kein Einfluss durch HBT auf den Weißgrad zu erkennen.

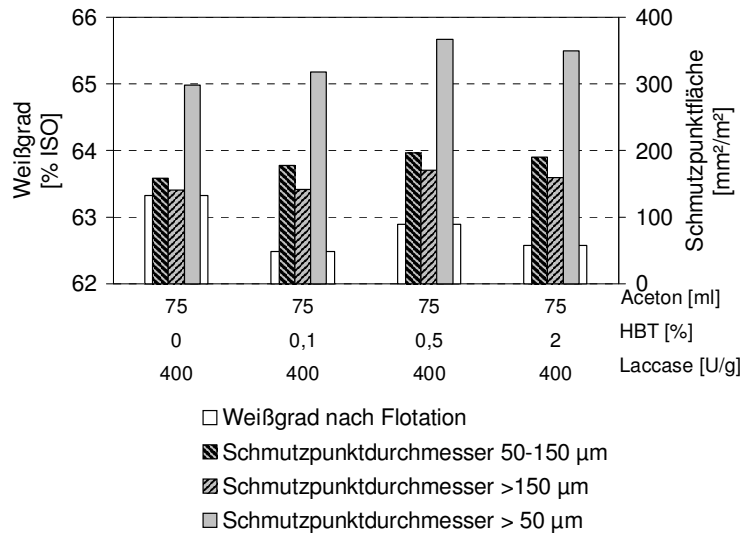
Nach Flotation und Hyperwäsche verlaufen die Helligkeitswerte  $L^*$  parallel zum Weißgrad und liefern keine neue Information (Tab. 4.2.6). Nach Flotation bleiben die Farbwerte  $a^*$  mit unwesentlichen Abweichungen von maximal 0,03 konstant im Bereich von 0,32. Die Farbwerte  $b^*$  zeigen mit steigender HBT-Konzentration eine Tendenz zur Verschiebung des Farbortes zum Gelben hin. Während der Referenzwert 6,51 beträgt, steigt  $b^*$  mit steigender HBT-Dosierung bis 6,74 an. Entsprechend steigt der Gelbwert um eine halbe Einheit. Nach Hyperwäsche kann nur eine geringfügige Steigerung des Farbwertes  $a^*$  beobachtet werden, der von 0,10 auf 0,19 ansteigt. Der Farbwert  $b^*$  bleibt dagegen im Bereich von 6,60 und verändert sich mit einer maximalen Differenz von 0,05 bei einer HBT-Dosierung von 0,1 % HBT kaum. Entsprechend bleibt die Vergilbung konstant bei 13,4.

**Tab. 4.2.6:** Einfluss steigender Mediatorgaben auf Weißgrad, Farbkennzahlen  $L^*$ ,  $a^*$  und  $b^*$  sowie Gelbwert beim LMS-unterstützten Deinking von DIP mit *T. villosa*-Laccase und HBT<sup>1</sup>

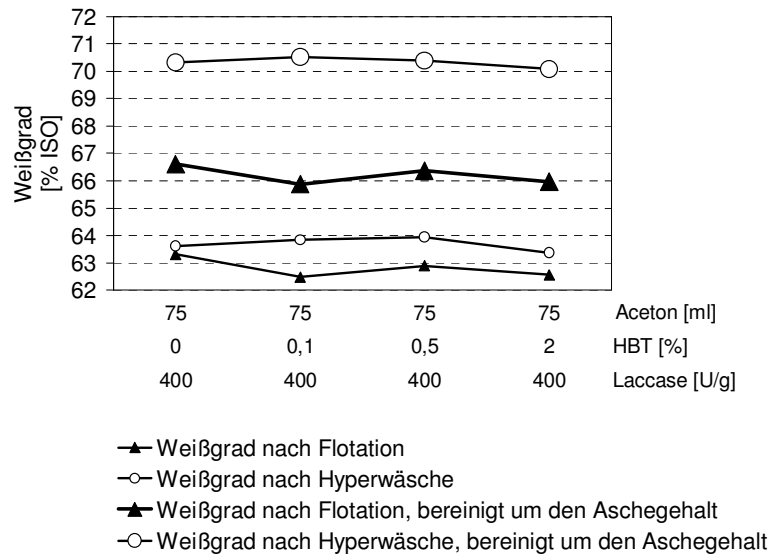
|                      |                  |       |       |       |
|----------------------|------------------|-------|-------|-------|
| Laccase [U/g]        | 400              | 400   | 400   | 400   |
| HBT [mg/U]           | 0                | 0,1   | 0,5   | 2     |
| Aceton [ml]          | 75               | 75    | 75    | 75    |
|                      | nach Flotation   |       |       |       |
| Helligkeit $L^*$ [-] | 86,79            | 86,41 | 86,65 | 86,52 |
| grün-rot $a^*$ [-]   | 0,32             | 0,30  | 0,32  | 0,35  |
| blau-gelb $b^*$ [-]  | 6,51             | 6,63  | 6,67  | 6,74  |
| Weißgrad [% ISO]     | 63,3             | 62,5  | 62,9  | 62,6  |
| Gelbwert [-]         | 13,4             | 13,7  | 13,7  | 13,9  |
|                      | nach Hyperwäsche |       |       |       |
| Helligkeit $L^*$ [-] | 86,94            | 87,10 | 87,14 | 86,82 |
| grün-rot $a^*$ [-]   | 0,10             | 0,10  | 0,15  | 0,19  |
| blau-gelb $b^*$ [-]  | 6,60             | 6,65  | 6,62  | 6,57  |
| Weißgrad [% ISO]     | 63,6             | 63,8  | 63,9  | 63,4  |
| Gelbwert [-]         | 13,4             | 13,5  | 13,4  | 13,4  |

<sup>1</sup> Referenz wurde mit Laccase durchgeführt

Diese Ergebnisse liefern den Eindruck, dass der Mediator HBT in begrenztem Rahmen zu einer Intensivierung der Vergilbung und des Weißgradabfalls beitragen kann. Zumindest trägt er nicht zu einer Verbesserung des Weißgrades oder des Farbortes bei. Wesentlich ist, dass er bei neutralem pH-Wert auf den Abbau von Schmutzpunkten keinen Einfluss hat.



**Abb. 4.2.17:** Einfluss steigender Mediatorgaben auf den Weißgrad nach Flotation und Schmutzpunkte beim LMS-unterstützten Deinking von DIP mit *T. villosa*-Laccase und HBT



**Abb. 4.2.18:** Einfluss steigender Mediatorgaben auf den Weißgrad nach Flotation und Hyperwäsche beim LMS-unterstützten Deinking von DIP mit *T. villosa*-Laccase und HBT

#### 4.2.2.3 DIP-Stoffbehandlung mit *Trametes villosa* - Laccase ohne Mediator HBT

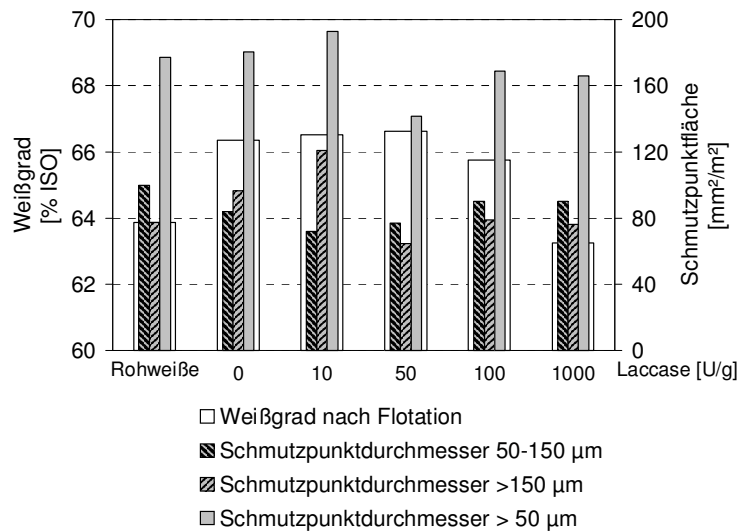
Parallel zu den Versuchen mit dem LMS werden Versuche ohne Zugabe des Mediators HBT durchgeführt. Die erste Versuchsreihe wird mit Schwerpunkt auf niedrigere Laccase-Gaben analog zum ersten Versuch in Kapitel 4.2.2.1 durchgeführt, dem Tab. 4.2.4, Abb. 4.2.13 sowie Abb. 4.2.14 zugrunde liegen. Der DIP-Stoff wird dazu mit 10, 50, 100 und 1000 U Laccase pro Gramm DIP im neutralen Verfahren (pH 7, T=55°C) behandelt. Verwendet wird für die Versuchsreihe wieder die Laccase von *T. villosa*. Die Seife Olinor RST Na wird wie zuvor zur Flotation bei pH 9,5 zugegeben, um Reaktionen zwischen Seife und Enzym zu vermeiden. Die Hyperwäsche erfolgt wiederum bei pH 9,5, sämtliche Probenentnahmen bei pH 7.

Die erste Versuchesreihe mit DIP (Abb. 4.2.19) liefert ein ähnliches Bild, wie es schon von den Versuchen mit AP bekannt ist: Die Weißgrade nach Flotation bleiben bei niedrigen Laccase-Dosierungen zunächst konstant (66,4 bis 66,6 % ISO), um dann bei höheren Dosierungen deutlich zu sinken. So beträgt der Weißgrad bei 100 U Laccase 65,8 % ISO und bei 1000 U nur noch 63,3 % ISO. Das Ergebnis unterscheidet sich damit kaum von den LMS-unterstützten Versuchen mit DIP (Abb. 4.2.13 bzw. 4.2.14).

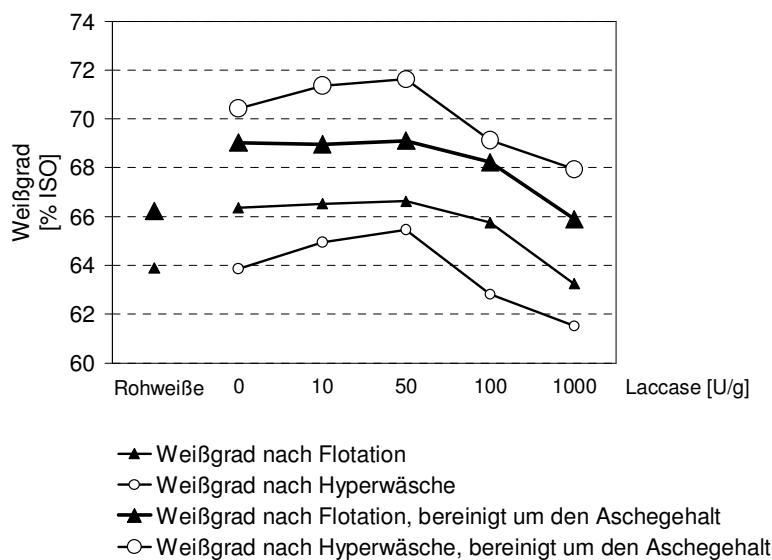
Die Gesamtschmutzpunktfäche von 181 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> reduziert sich bei 50 U auf 142 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>. Gleichzeitig werden ab 50 U mehr Schmutzpunkte mit einem Durchmesser von 50-150 µm als Schmutzpunkte mit einem Durchmesser >150 µm detektiert (Abb. 4.2.19). Dies könnte auf eine enzymatische Zerlegung größerer in kleinere Schmutzpunkte hindeuten. Allerdings ist innerhalb der Messreihe der Unterschied zwischen den Gesamtschmutzpunktfächen der übrigen Probenwerte nicht groß (10 bis 15 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>). In den folgenden zwei noch zu diskutierenden Versuchen (Abb. 4.2.21 und Abb. 4.2.23) zeigt sich schließlich, dass Laccase im Bereich von 50 U weder alleine noch in Verbindung mit dem Mediator HBT einen signifikanten Einfluss auf die Schmutzpunktfächen besitzt.

Im Bereich von 0 nach 50 U ist der Anstieg der Weißgrade nach Hyperwäsche von 63,9 % ISO auf 65,5 % ISO zunächst schwierig zu erklären (Abb. 4.2.20). Dies kann auf eine steigende Druckfarbenablösung hindeuten. Die steigende Druckfarbenablösung geht aber nicht mit einer steigenden Flotierbarkeit einher, da die Weißgrade nach Flotation von 0 nach 50 U/g Laccase mit 66,4 % ISO bis 66,6 % ISO konstant bleiben. Ein Anstieg des Weißgrades nach Hyperwäsche um zwei Punkte kann dann aber nur mit der Zunahme nicht flotierbarer Druckfarbenpartikel erklärt werden, die mit Hilfe der Wäsche erfolgreich entfernt werden sollten. In diesem Fall

müsste allerdings der Weißgrad nach Flotation fallen, da die erhöhte Anwesenheit nicht flotierbarer Druckfarbenpartikel den Weißgrad senkt. Doch das ist nicht der Fall. Die Weißgrade nach Flotation bleiben konstant bei 66,4 bis 66,6 % ISO.



**Abb. 4.2.19:** Weißgrad und Schmutzpunkte von mit *T. villosa*-Laccase neutral behandeltem DIP nach Flotation



**Abb. 4.2.20:** Weißgrade von mit *T. villosa*-Laccase neutral behandeltem DIP nach Flotation und Hyperwäsche

Blickt man nun auf die Weißgradkurven nach Hyperwäsche für die bereits gezeigten Versuche mit AP (Abb. 4.2.8) und nimmt die Ergebnisse der in den noch zu

beschreibenden Versuchen mit DIP vorweg (Abb. 4.2.22 und Abb. 4.2.24), muss man davon ausgehen, dass es sich bei dem niedrigen Weißgrad der enzymfreien Probe nach Hyperwäsche in Abb. 4.2.20 um einen Ausreißer handelt, der zu niedrig ausgefallen ist.

Wie in Abb. 4.2.14 fällt in Abb. 4.2.20 der Weißgrad nach Hyperwäsche ab 100 U zunächst auf 62,8 % ISO und bei 1000 U auf 61,5 % ISO ab. Dieser Weißgradabfall bleibt auch nach Korrektur der Weißgrade um den durch den Austrag von Asche bedingten Remissionsverlust erhalten. Da, wie bereits diskutiert, das relativ konstante und niedrige Niveau der Schmutzpunktflächen keinen Rückschluss auf einen übermäßigen Abbau von Druckfarbe in fein dispergierte, nicht mehr flotierbare und den Weißgrad nach Flotation senkende Partikel zulässt, muss wie im Fall des LMS ein anderer enzymatischer Effekt für den Abfall der Weißgrade mit erhöhter Laccase-Dosierung verantwortlich sein.

Bei Betrachtung der Daten zum Farbort ist dafür wieder eine Laccase-bedingte Strukturänderung des Lignins am wahrscheinlichsten (Tab. 4.2.7). Nach Flotation sinkt die Helligkeit  $L^*$  von 88,04 auf 86,88. Dabei intensivieren sich gegenüber der neutralen Referenz die Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$ :  $a^*$  wird von 0,28 auf 0,39 weiter in den roten und  $b^*$  von 5,94 auf 6,73 weiter in den gelben Farbbereich verschoben. Entsprechend steigt der Gelbwert von 12,1 auf 13,9. Genauso verhält es sich bei den Werten für die Proben nach Hyperwäsche.  $L^*$  fällt von 87,10 auf 86,26,  $a^*$  steigt von -0,01 auf 0,17,  $b^*$  von 6,75 auf 7,46 und der Gelbwert von 13,5 auf 15,2.

Vergleicht man die Gelbwertentwicklung für laccasebehandeltes AP nach Hyperwäsche (Tab. 4.2.1) mit den entsprechenden Werten für ebenso behandelten DIP (Tab. 4.2.7), zeigt sich, dass der Anstieg der Vergilbung des DIP um zwei Einheiten ein vergleichbares Ausmaß erreicht wie die des druckfarbenreicheren AP. Im Unterschied zum AP kann dieser Effekt bei Verwendung des DIP sogar schon nach Flotation erkannt werden (Tab. 4.2.7). Ein Aufziehen von fein dispergierten Druckfarbenpartikeln als Ursache für den Weißgradabfall kann damit nochmals ausgeschlossen werden.

**Tab. 4.2.7:** Farbart, Weißgrad und Gelbwert von mit *T. villosa*-Laccase neutral behandeltem DIP nach Flotation und Hyperwäsche

| Laccase [U/g otro DIP] | 0 <sup>1</sup>   | 0     | 10    | 50    | 100   | 1000  |
|------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                        | nach Flotation   |       |       |       |       |       |
| Helligkeit L* [-]      | 86,38            | 88,04 | 88,11 | 88,22 | 87,72 | 86,88 |
| grün-rot a* [-]        | 0,49             | 0,28  | 0,37  | 0,44  | 0,37  | 0,39  |
| blau-gelb b* [-]       | 5,14             | 5,94  | 5,85  | 5,94  | 5,86  | 6,73  |
| Weißgrad [% ISO]       | 63,9             | 66,4  | 66,5  | 66,6  | 65,8  | 63,3  |
| Gelbwert [-]           | 10,9             | 12,1  | 12,0  | 12,3  | 12,1  | 13,9  |
|                        | nach Hyperwäsche |       |       |       |       |       |
| Helligkeit L* [-]      | -                | 87,10 | 87,65 | 87,90 | 86,68 | 86,26 |
| grün-rot a* [-]        | -                | -0,01 | 0,23  | 0,22  | 0,18  | 0,17  |
| blau-gelb b* [-]       | -                | 6,75  | 6,64  | 6,63  | 6,94  | 7,46  |
| Weißgrad [% ISO]       | -                | 63,9  | 65,0  | 65,5  | 62,8  | 61,5  |
| Gelbwert [-]           | -                | 13,5  | 13,5  | 13,4  | 14,1  | 15,2  |

<sup>1</sup> Eingangswerte bei Erhalt des DIP

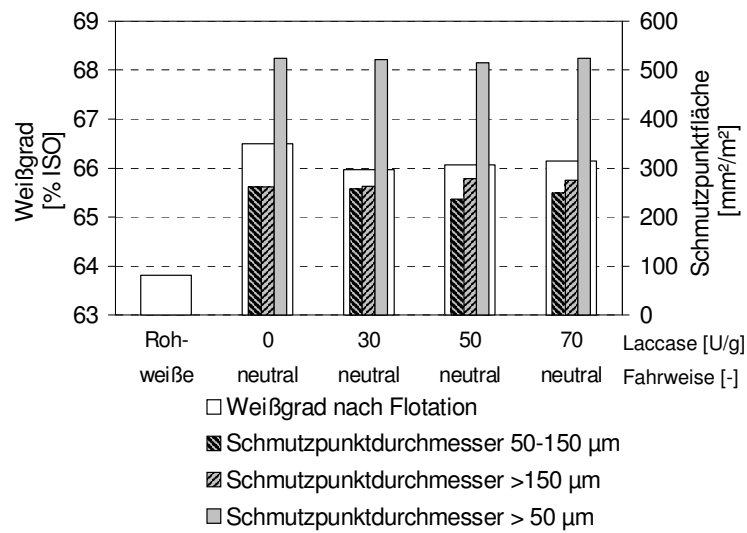
In der vorhergehenden Versuchsreihe wird bei 50 U Laccase mit  $142 \text{ mm}^2/\text{m}^2$  gegenüber dem Referenzwert von  $181 \text{ mm}^2/\text{m}^2$  eine deutlich niedrigere Gesamtschmutzpunktfläche gemessen. Dabei nimmt der Anteil von Schmutzpunktpartikeln über  $150 \mu\text{m}$  Durchmesser von 53 % auf 46 % ab. Außerdem nimmt der Weißgrad nach Hyperwäsche von 0 nach 50 U Laccase um 1,6 % ISO bzw. 1,2 % ISO nach Korrektur des Weißgrades um den ascheaustragbedingten Remissionsverlust zu. Um zu überprüfen, ob es sich dabei um ein Zufallsergebnis handelt, wird eine zusätzliche Versuchsreihe durchgeführt. Für diese werden für die Inkubationsphase Laccasedosierungen von 30, 50 und 70 U Laccase pro g otro DIP verwendet. Die Ergebnisse werden in Tab. 4.2.8, Abb. 4.2.21 und Abb. 4.2.22 dargestellt.

In diesen Messreihen schneiden die Referenzweißgrade nicht schlechter ab als die Weißgrade der laccasebehandelten Proben, sondern liegen um einen halben bzw. einen ganzen Weißgrad höher (Abb. 4.2.21, Abb. 4.2.22). Ein Weißgradanstieg nach Hyperwäsche wie in Abb. 4.2.20 ist ebenfalls nicht zu beobachten. Durch niedrige Laccasedosierungen wird der Weißgrad also nicht beeinflusst.

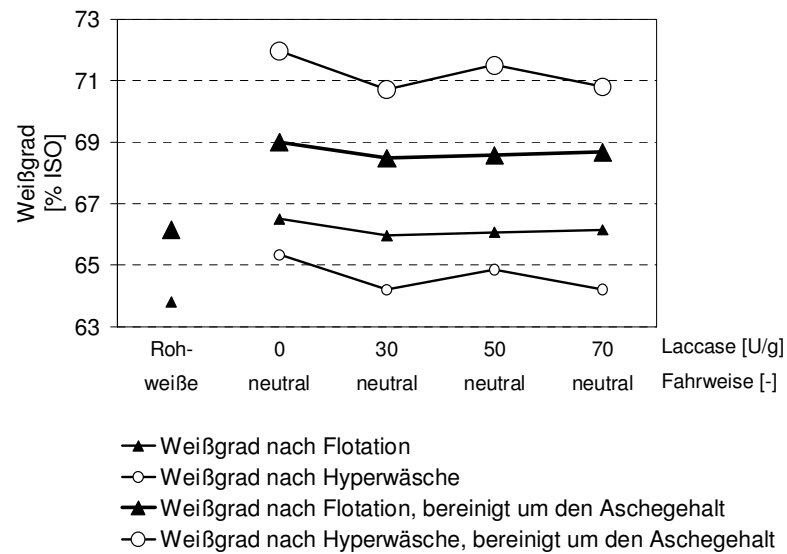
Das Schmutzpunktniveau wird durch die niedrigen Laccase-Dosierungen ebenfalls nicht verändert. Es bleibt bei allen Proben der Testreihe im Bereich von  $524 \text{ mm}^2/\text{m}^2$  und schwankt mit einer maximalen Abweichung von nur  $8 \text{ mm}^2/\text{m}^2$  nur unwesentlich. Eine Verschiebung der nach Schmutzpunktdurchmesser aufgeteilten Kollektive findet nicht statt. Der Anteil von Schmutzpunkten mit einem Durchmesser  $> 150 \mu\text{m}$  liegt bei allen Proben mit 50 bis 54 % ungefähr gleich hoch.

Mit diesem Ergebnis bestätigen sich die beiden Vermutungen, die im vorhergehenden Kapitel formuliert wurden. Die geringfügigen Änderungen in der Schmutzpunktdurchmesserzusammensetzung und der relativ niedrige Referenzweißgrad nach Hyperwäsche im Bereich von 50 U sind nicht als signifikant anzusehen.

Die übrigen Ergebnisse dieses Kapitels fügen sich in das Gesamtbild ein und bedürfen keiner weiteren Diskussion.



**Abb. 4.2.21:** Weißgrad und Schmutzpunkte von mit *T. villosa*-Laccase neutral behandeltem DIP nach Flotation



**Abb. 4.2.22:** Weißgrade von mit *T. villosa*-Laccase neutral behandeltem DIP nach Flotation und Hyperwäsche

**Tab. 4.2.8:** Farbart, Weißgrad und Gelbwerte von mit *T. villosa*-Laccase neutral behandeltem DIP nach Flotation

| Laccase [U/g otro DIP] | Eingangs-<br>werte <sup>1</sup> | 0                | 30    | 50    | 70    |
|------------------------|---------------------------------|------------------|-------|-------|-------|
|                        |                                 | nach Flotation   |       |       |       |
| Helligkeit L* [-]      | 85,98                           | 87,64            | 87,37 | 87,44 | 87,57 |
| grün-rot a* [-]        | 0,57                            | 0,35             | 0,41  | 0,49  | 0,51  |
| blau-gelb b* [-]       | 4,34                            | 4,95             | 4,94  | 4,98  | 5,15  |
| Weißgrad [% ISO]       | 63,81                           | 66,5             | 66,0  | 66,1  | 66,1  |
| Gelbwert [-]           | 9,4                             | 10,3             | 10,4  | 10,5  | 10,8  |
|                        |                                 | nach Hyperwäsche |       |       |       |
| Helligkeit L* [-]      | -                               | 87,23            | 86,79 | 87,03 | 86,67 |
| grün-rot a* [-]        | -                               | 0,12             | 0,13  | 0,16  | 0,19  |
| blau-gelb b* [-]       | -                               | 5,48             | 5,75  | 5,58  | 5,93  |
| Weißgrad [% ISO]       | -                               | 65,3             | 64,2  | 64,9  | 64,2  |
| Gelbwert [-]           | -                               | 11,2             | 11,7  | 11,4  | 12,2  |

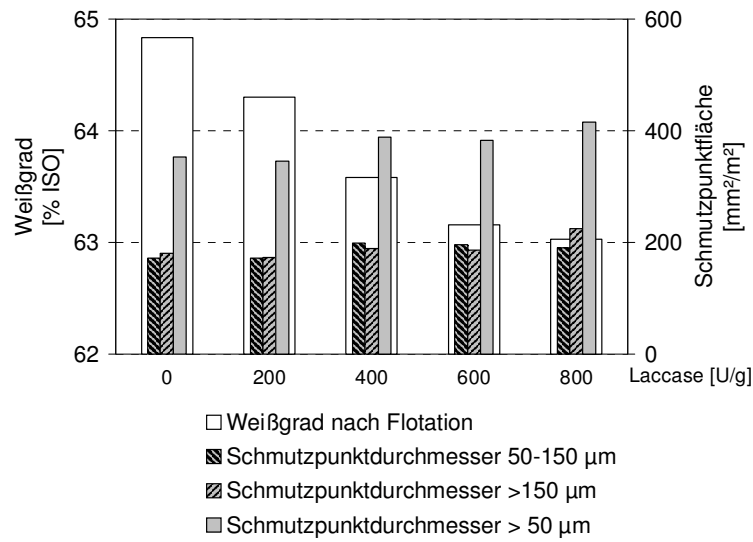
<sup>1</sup> Eingangswerte bei Erhalt des DIP

Um ein vollständiges Bild über den Einfluss der Höhe der Laccase-Dosierung auf das enzymunterstützte Deinking von DIP zu bekommen, wird in der folgenden Versuchsreihe mit 200, 400, 600 und 800 U/g inkubiert.

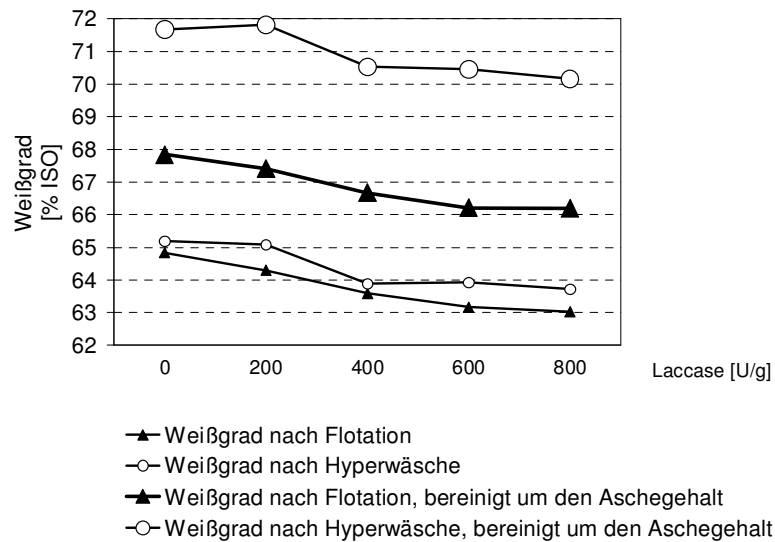
Die Ergebnisse entsprechen dem bisher beobachteten Trend. Der Weißgrad nach Flotation sinkt mit steigender Laccase-Dosierung. Er fällt in Abb. 4.2.23 von 64,8 % ISO auf 63 % ISO ab. Die Schmutzpunktf Flächen werden dabei durch die enzymatische Behandlung nicht reduziert. In Abb. 4.2.23 nehmen sie vielmehr in begrenztem Maße zu und steigen von 353 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> auf 415 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>. Das Verhältnis der Schmutzpunktf Flächen von Schmutzpunkten mit einem Durchmesser von 50 bis 150 µm zu solchen mit einem Durchmesser von über 150 µm beträgt durchgehend in etwa 1:1. Auch dies gibt keinen Hinweis auf einen enzymatischen Druckfarbenangriff.

In Abb. 4.2.24 fallen die Weißgrade nach Flotation und Hyperwäsche, vor wie nach Korrektur der Weißgrade um den aschebedingten Remissionsverlust um 1,5 bis 1,8 % ISO ab. Dies geht wieder mit einem Abfall der Helligkeit L\* und einem Anstieg der Farbwerte a\* und b\* sowie des Gelbwertes einher (Tab. 4.2.9). So sinkt nach Flotation die Helligkeit L\* von 87,23 auf 86,77 ab, a\* steigt von 0,34 auf 0,47, b\* von 5,85 auf 6,72 und der Gelbwert von 12,1 auf 13,9 an. Nach Hyperwäsche verändern sich diese Werte in vergleichbarem Umfang. L\* nimmt ausgehend vom Referenzwert mit steigender Laccasedosierung von 87,58 auf 87,11 ab, a\* steigt von 0,08 auf 0,34, b\* von 6,27 auf 6,76 und der Gelbwert von 12,6 auf 13,8.

Die Daten dieser Versuchsreihe mit DIP bestätigten damit den bisher beobachteten Trend: Ein Schmutzpunktabbau ist nicht zu erwarten. Es kommt aber zu einer gleichzeitigen Vergilbung und Vergrauung des Stoffes. Für diese Erscheinung ist vermutlich eine laccasebedingte Ligninvergilbung verantwortlich.



**Abb. 4.2.23:** Weißgrad und Schmutzpunkte von mit *T. villosa*-Laccase neutral behandeltem DIP nach Flotation



**Abb. 4.2.24:** Weißgrade von mit *T. villosa*-Laccase neutral behandeltem DIP nach Flotation und Hyperwäsche

**Tab. 4.2.9:** Farbart, Weißgrad und Gelbwerte von mit *T. villosa*-Laccase neutral behandeltem DIP nach Flotation und Hyperwäsche

| Laccase [U/g otro DIP] | 0                | 200   | 400   | 600   | 800   |
|------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|
|                        | nach Flotation   |       |       |       |       |
| Helligkeit L* [-]      | 87,23            | 87,18 | 86,92 | 86,71 | 86,77 |
| grün-rot a* [-]        | 0,34             | 0,34  | 0,43  | 0,46  | 0,47  |
| blau-gelb b* [-]       | 5,85             | 6,26  | 6,47  | 6,48  | 6,72  |
| Weißgrad [% ISO]       | 64,8             | 64,3  | 63,6  | 63,2  | 63,0  |
| Gelbwert [-]           | 12,1             | 12,9  | 13,4  | 13,5  | 13,9  |
|                        | nach Hyperwäsche |       |       |       |       |
| Helligkeit L* [-]      | 87,58            | 87,52 | 87,17 | 87,17 | 87,11 |
| grün-rot a* [-]        | 0,08             | 0,17  | 0,17  | 0,26  | 0,34  |
| blau-gelb b* [-]       | 6,27             | 6,25  | 6,73  | 6,70  | 6,76  |
| Weißgrad [% ISO]       | 65,2             | 65,1  | 63,9  | 63,9  | 63,7  |
| Gelbwert [-]           | 12,6             | 12,7  | 13,6  | 13,7  | 13,8  |

#### 4.2.3 Versuche mit unbedrucktem Zeitungsdruckpapier

Die Versuche mit AP und DIP zeigen, dass die Reduzierung von Schmutzpunkten mit Laccase bzw. mit dem Laccase-Mediator-System nicht möglich ist. Die durch Laccase bzw. das LMS einsetzende Vergilbung ist offensichtlich unabhängig von der Anwesenheit von Druckfarben, da für das druckfarbenreiche Altpapier Verfärbungseffekte in vergleichbarem Umfang erzielt werden wie für den druckfarbenarmen DIP. Zur Überprüfung dieser Beobachtung an einem druckfarbenfreien Sekundärfaserstoff wird für die nächste Versuchsreihe eine Mischung aus unbedrucktem Zeitungs- und Magazindruckpapier als Substrat eingesetzt (Tab. 4.2.10), enzymatisch mit Laccase bzw. dem LMS inkubiert und deinkt.

**Tab.4.2.10:** Komponenten der Papiermischung

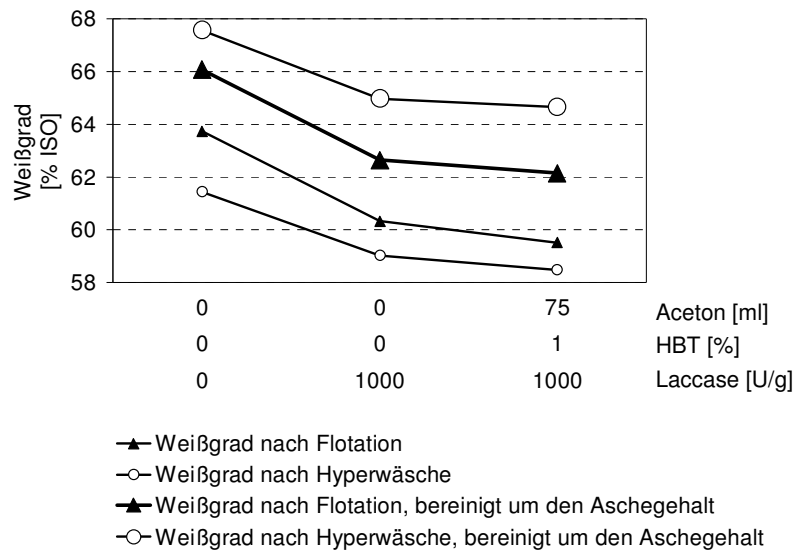
| Papiersorte<br>[-]  | Flächengewicht<br>[g/m <sup>2</sup> ] | Hersteller<br>[-]     | Anteil an der<br>Papiermischung [%] |
|---------------------|---------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| Zeitungsdruckpapier | 45                                    | Stora Enso, Maxau     | 50                                  |
| LWC (Spiegel)       | 54                                    | UPM-Kymmene, Augsburg | 25                                  |
| SC (Stern)          | 56                                    | o.A.                  | 25                                  |

Die Ergebnisse werden in Tab. 4.2.11 und Abb. 4.2.25 wiedergegeben. Auch bei der druckfarbenfreien Papiermischung sinkt der Weißgrad nach Flotation mit Zugabe der Laccase von 63,7 % ISO auf 60,3 % ISO ab. Bei Anwendung des LMS fällt er mit 59,5 % ISO um weitere 0,8 % ISO. Diese Differenz beträgt nach Bereinigung des Weißgrades um den ascheaustragbedingten Remissionsverlust 0,5 % ISO. Parallel zu diesen Werten entwickeln sich die Weißgrade nach Hyperwäsche. Gegenüber dem Referenzwert von 61,5 % ISO sinkt der Weißgrad mit Zugabe der Laccase auf 59 % ISO und bei Anwendung des LMS auf 58,5 % ISO. Diese Größenverhältnisse bleiben auch nach Korrektur der Weißgrade um den ascheaustragbedingten Remissionsverlust erhalten. Auch die Farbortentwicklung wird im Wesentlichen durch das Enzym verändert. Das LMS hat nur einen zusätzlichen Effekt. So sinkt beispielsweise nach Flotation die Helligkeit  $L^*$  von 86,90 auf 85,75 bei Einsatz von 1000 U Laccase und auf 85,73 % ISO bei Einsatz des LMS. Der Farbwert  $a^*$  verschiebt sich von -0,29 mit Laccase nach 0,14 und nach 0,16 mit dem LMS weiter in Richtung Rot. Im Vergleich zum Farbwert  $b^*$  des Referenzwertes (6,61) verschiebt sich  $b^*$  bei Einsatz von Laccase ( $b^*=7,76$ ) und des LMS ( $b^*=8,75$ ) weiter in den gelben Bereich. Entsprechend erhöht sich der Gelbwert ausgehend von 13,0 bei Inkubation mit Laccase auf 15,8 und bei Inkubation mit dem LMS auf 17,4. Vergleichbar verändern sich die Werte nach Hyperwäsche. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch druckfarbenfreies Recyclingpapier durch eine Laccase- bzw. eine LMS-unterstützte Behandlung gegenüber der enzym- und mediatorfreien Referenz vergraut und vergilbt. Die Ergeb-

nisse bestätigen außerdem die Resultate der vorhergegangenen Kapitel. Der Haupteffekt der Vergilbung und Vergrauung wird durch die Laccase verursacht. HBT intensiviert lediglich diese negative Wirkung, wobei im Gegensatz zu Kap. 4.2.2.2 die Verschlechterung der optischen Eigenschaften auch nach Hyperwäsche deutlich zu sehen ist. Vergilbung und Vergrauung deuten somit am ehesten auf eine Laccase- bzw. LMS-induzierte Änderung der Ligninstruktur hin.

**Tab. 4.2.11:** Farbort, Weißgrad und Gelbwert der enzymatisch behandelten und flotierten Proben aus unbedruckten Papieren

|                   |       |       |       |
|-------------------|-------|-------|-------|
| NS 51002 [U/g]    | 0     | 1000  | 1000  |
| HBT [mg/U]        | 0     | 0     | 1     |
| Aceton [ml]       | 0     | 0     | 75    |
| nach Flotation    |       |       |       |
| Helligkeit L* [-] | 86,90 | 85,75 | 85,73 |
| grün-rot a* [-]   | -0,29 | 0,14  | 0,16  |
| gelb-blau b* [-]  | 6,61  | 7,76  | 8,57  |
| Weißgrad [% ISO]  | 63,7  | 60,3  | 59,5  |
| Gelbwert [-]      | 13,0  | 15,8  | 17,4  |
| nach Hyperwäsche  |       |       |       |
| Helligkeit L* [-] | 86,40 | 85,82 | 85,64 |
| grün-rot a* [-]   | -0,42 | 0,18  | 0,16  |
| gelb-blau b* [-]  | 8,13  | 9,33  | 9,55  |
| Weißgrad [% ISO]  | 61,5  | 59,0  | 58,5  |
| Gelbwert [-]      | 15,9  | 18,8  | 19,3  |



**Abb. 4.2.25:** Weißgrade einer mit *T. villosa*-Laccase und Mediator HBT neutral behandelten unbedruckten Papiermischung nach Flotation und Hyperwäsche

#### **4.2.4 Versuche zur Bleichbarkeit von mit Laccase und Mediator behandeltem und deinktem DIP**

Ergebnisse zum LMS werden in der Literatur meist nur nach bereits erfolgter alkalischer Extraktion, Peroxid- oder Chlordioxidbleiche diskutiert. Zum Teil wird darauf hingewiesen, dass sich der vollständige Bleicheffekt erst nach einer Extraktionsstufe zur Ligninentfernung einstellt (vergl. Kap. 2.4.3.1). Eine Delignifizierung gilt es aber beim Deinking von Altpapier gerade zu vermeiden, da die Entfernung des Lignins in der Praxis des Altpapier-Recyclings mit unakzeptablen Ausbeuteverlusten und Abwasserbelastungen gleichgestellt werden muss.

Bisher wurde untersucht, ob mit Laccase oder dem LMS die Druckfarbenablösung vor und der Druckfarbenaustrag während der Flotation verbessert werden kann. Denn alle Verunreinigungen, die bis zur Flotation nicht entfernt werden können, werden mit dem Gutstoff weitertransportiert und mindern am Ende des Recycling-Prozesses den erzielbaren Weißgrad des fertigen Papiers. Denn nach Abschluss der Flotation erfolgt in der Praxis eine Dispergerstufe. Hier werden sichtbare Schmutzpunktpartikel durch mechanische Einwirkung unter die Sichtbarkeitsgrenze zerkleinert. Eine ligninerhaltende Bleiche, die oxidierend mit Peroxid oder reduzierend mit FAS bzw. Dithionit durchgeführt wird, dient dazu, den durch die Dispergierung der Druckfarbenpartikel eintretenden Weißgradabfall auszugleichen.

Aus diesen Überlegungen heraus stellt sich die Frage, ob es möglich ist, Weißgrad und Farbort der enzymatisch behandelten Proben mit Hilfe einer ligninerhaltenden Bleiche so weit zu verbessern, dass der Einsatz von Laccase bzw. des LMS letztlich vorteilhaft genutzt werden kann. Zur Beantwortung dieser Frage wird nun die Bleichbarkeit des enzymatisch behandelten und flotierten DIP unter ligninerhaltenden Bedingungen untersucht.

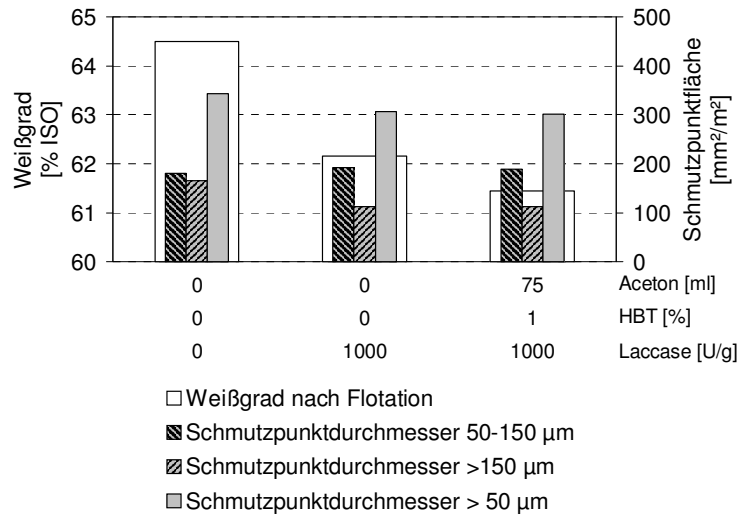
Um nach dem Deinking genügend DIP für die anschließenden Bleichversuche zu erhalten, wird für das folgende Experiment eine 25 Liter Laborflotationszelle der Firma Voith Paper Fibersystems verwendet. Nach Abschluss der Flotation wird eine Hälfte des Gutstoffes chargenweise einer Hyperwäsche unterzogen. Nach Abschluss von Flotation und Hyperwäsche werden die Stoffe in einer Wäscheschleuder trockengeschleudert, in PE-Beuteln eingeschweißt und im Kühlraum bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die Behandlung des Stoffes in der Schleuder und die Lagerung im Kühlraum machen die Herstellung eines Referenzwertes nach diesen Behandlungsschritten für die Bleichversuche notwendig. Die Bleichen (FAS und Peroxid-Bleiche) werden nach der Standard-Rezeptur von Voith Paper Fiber Systems durchgeführt. Zu Referenzzwecken werden die fertig deinkten DIP-Stoffe

einer alkalischen Extraktion unterzogen. Sie ist in der Literatur die bei der Zellstoffbleiche mit dem LMS am häufigsten angewandte Methode. Die angegebenen Ligningehalte entsprechen der Summe aus KLASON-Lignin- und säurelöslichem Ligninanteil abzüglich des Aschegehaltes der Proben.

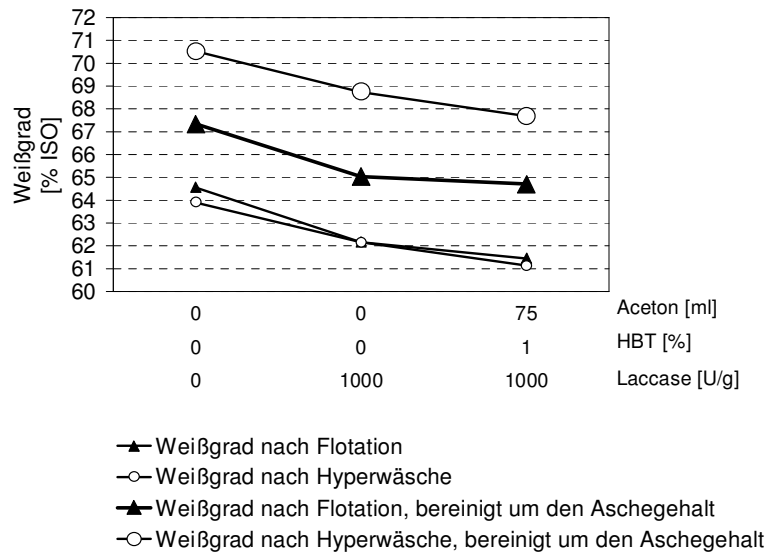
#### 4.2.4.1 Ergebnisse nach Flotation und Hyperwäsche

Optische Eigenschaften und Schmutzpunktflächen nach Flotation und Hyperwäsche entsprechen den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchungen: Mit der Laccase-Gabe von 1000 U/g otro DIP sinkt der Weißgrad wieder deutlich um 2,3 % ISO unter den Referenzwert von 64,5 % ISO. Bei Verwendung des LMS sind es 3,1 % ISO. Nach Korrektur dieser Werte um den ascheaustragbedingten Remissionsverlust bleiben die Weißgrade der beiden enzymatischen Behandlungsweisen weiterhin unter dem Referenzwert von 67,3 % ISO. Der Weißgrad der nur mit Laccase behandelten Probe liegt mit 65 % ISO etwas höher als der Weißgrad der LMS-behandelten Probe von 64,7 % ISO (Abb. 4.2.27). Eine Reduktion der Schmutzpunktflächen ist wie bei den anderen Versuchen mit DIP nicht zu erkennen. Die Gesamtschmutzpunktflächenabnahme ist gegenüber dem Referenzwert von 344 mm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> mit 12 % nicht wesentlich (Abb. 4.2.26). Wie nach Durchführung der Flotation liegen die Weißgrade nach Hyperwäsche um 1,7 bis 2,8 % ISO unterhalb des Weißgrades des Referenzwertes von 63,9 % ISO (Abb. 4.2.27). Auch nach Hyperwäsche und Korrektur der Weißgrade um den ascheaustragsbedingten Remissionsverlust besitzt der Referenzwert mit 70,5 % ISO den höchsten Weißgrad, gefolgt von der Laccase-behandelten (68,8 % ISO) und der LMS-behandelten Probe (67,7 % ISO). Die Entwicklung der Helligkeit L\*, der Farbwerte a\* und b\* sowie des Gelbwertes weist wieder auf eine Laccase- bzw. LMS-induzierte Vergilbung des Lignins hin (Tab. 4.2.12). So sinkt nach Flotation der Referenzwert für die Helligkeit L\* von 86,92 auf 86,33 nach Laccase- bzw. 86,19 nach LMS-Behandlung. Dagegen steigt der Farbwert a\* von 0,34 auf 0,52 bzw. 0,49 und der Farbwert b\* von 5,58 auf 6,75 bzw. 7,22 an. Entsprechend erhöht sich der Gelbwert von 11,6 über 14,1 auf 15,0. Eine vergleichbare Entwicklung zeigen die Werte nach Hyperwäsche.

Die Werte dieser DIP-Stoffe fügen sich in das bisher gewonnene Gesamtbild ein. Als typische Beispiele für die Auswirkungen einer Laccase- bzw. LMS-Behandlung auf DIP bilden diese Stoffe eine geeignete Grundlage für die nun folgenden Bleichversuche.



**Abb. 4.2.26:** Weißgrad und Schmutzpunkte von mit *T. villosa*-Laccase und Mediator HBT neutral behandeltem DIP nach Flotation



**Abb. 4.2.27:** Weißgrade von mit *T. villosa*-Laccase und Mediator HBT neutral behandeltem DIP nach Flotation und Hyperwäsche

**Tab. 4.2.12:** Farbart, Weißgrad und Gelbwert von mit *T. villosa*-Laccase und Mediator HBT neutral behandeltem DIP nach Flotation und Hyperwäsche

|                  |       |                  |       |
|------------------|-------|------------------|-------|
| Laccase [U/g]    | 0     | 1000             | 1000  |
| HBT [%]          | 0     | 0                | 1     |
| Aceton [ml]      | 0     | 0                | 170   |
|                  |       | nach Flotation   |       |
| Helligkeit L *   | 86,92 | 86,33            | 86,19 |
| grün-rot a *     | 0,34  | 0,52             | 0,49  |
| blau-gelb b *    | 5,58  | 6,75             | 7,22  |
| Weißgrad [% ISO] | 64,5  | 62,2             | 61,4  |
| Gelbwert [-]     | 11,6  | 14,1             | 15,0  |
|                  |       | nach Hyperwäsche |       |
| Helligkeit L *   | 87,02 | 86,56            | 86,18 |
| grün-rot a *     | -0,07 | 0,12             | 0,19  |
| blau-gelb b *    | 6,52  | 7,31             | 7,62  |
| Weißgrad [% ISO] | 63,9  | 62,2             | 61,1  |
| Gelbwert [-]     | 13,1  | 14,8             | 15,5  |

#### 4.2.4.2 Ergebnisse von Bleiche und alkalischer Extraktion

Die Ergebnisse zur Bleiche werden in den Tab. 4.2.13 und 4.2.14 dargestellt. Die Daten zeigen, dass die Laccase- bzw. LMS-bedingte Vergrauung und Vergilbung nicht ausgeglichen werden kann. Anders als vor der Bleiche, wird der Farbart a\* der enzymatischen Behandlungsvarianten nicht mehr in Richtung Rot, sondern in Richtung Grün verschoben.

So fallen nach Durchführung der Peroxidbleiche die Weißgrade des flotierten DIP für die Laccase- und LMS-behandelten Stoffe mit 67,5 % ISO niedriger aus als der Weißgrad der Referenz von 68,3 % ISO. Nach der Peroxid-Bleiche bleibt die Helligkeit L\* mit 89,5 bis 89,4 für alle Behandlungsvarianten auf konstantem Niveau und beeinflusst den Weißgrad nicht. Ursache für den Weißgradabfall ist die Verschiebung des Farbortes in den grünen und gelben Farbbereich hinein. So verschiebt sich der Farbwert a\* des flotierten und peroxidgebleichten Stoffes von -0,42 über -0,48 der laccasebehandelten Probe nach -0,63 der LMS-Variante. Die Verschiebung des Farbwertes b\* tritt am deutlichsten hervor. Sie erhöht sich von 7,01 des Referenzwertes auf 7,45 nach Laccase- und 7,63 nach LMS-Behandlung. In vergleichbarer Weise verschlechtern sich auch die optischen Eigenschaften des hypergewaschenen und peroxidgebleichten Stoffes.

Mit Hilfe der FAS-Bleiche können die Laccase- und LMS-bedingten Qualitätseinbußen hinsichtlich Weißgrad und Farbartverschiebung ebenfalls nicht ausgeglichen werden. Hinsichtlich des Weißgrades ist das Ergebnis außerdem schlechter als nach der Peroxidbleiche. Der Weißgrad der Referenz ist mit 67,6 %

ISO um 0,7 % ISO dunkler als nach der Peroxidbleiche. Zudem sind die Weißgrade der enzymatischen Varianten der FAS-gebleichten Proben deutlich niedriger als im Fall der Peroxidbleiche. So beträgt der Weißgrad nach Flotation und FAS-Bleiche für die laccasebehandelte Probe 66,1 % ISO und für die LMS-behandelte Probe 65,7 % ISO. Im Vergleich zur enzymfreien Referenz schneiden sie also um 1,5 bis 1,9 % ISO schlechter ab. Die Differenz der peroxidgebleichten Proben liegt dagegen nur bei 0,8 % ISO. Entsprechend den Weißgraden bleibt die Helligkeit  $L^*$  zwischen der enzymfreien und den enzymatisch behandelten Proben nicht wie im Fall der Peroxidbleiche konstant, sondern fällt von 88,69 über 88,17 nach 88,12 ab. Auch die Farbortverschlechterung der enzymatischen Fahrweisen kann durch die FAS-Bleiche nicht ausgeglichen werden, wenn auch der Farbort generell nicht ganz so weit im gelben Bereich liegt wie im Fall der Peroxidbleiche. So beträgt der Gelbwert nach Flotation und FAS-Bleiche für die Referenz 12,1, dagegen 13,3 für die peroxidgebleichte Variante. Der Farbort  $a^*$  verschiebt sich nach der FAS-Bleiche nur andeutungsweise in Richtung des grünen Farbbereiches (Referenzwert: 0,04; mit Laccase: 0,03; mit LMS: -0,06). Der Farbwert  $b^*$  verschiebt sich dagegen deutlich in den gelben Bereich (Referenz: 6,06; mit Laccase: 6,51; mit LMS: 6,82), was in einer Zunahme der Gelbwerte resultiert. Sie steigen von 12,1 über 13,0 auf 13,5. Auch bei der FAS-Bleiche spiegeln die Bleichergebnisse der hypergewaschenen Proben eine vergleichbare Entwicklung wider. Das Gleiche gilt auch für Proben, die statt einer Bleichstufe einer alkalischen Extraktion unterzogen werden. Auch nach Abzug der alkaliinduzierten Vergilbung sind die durch Laccase bzw. das LMS bedingten Verfärbungen deutlich zu erkennen.

Weder eine Peroxid- noch eine FAS-Bleiche können die Einbußen an Weißgrad und Farbort ausgleichen, die durch eine Behandlung mit *T. villosa*-Laccase bzw. mit Laccase und Mediator HBT verursacht werden. Weißgrad, Farbkennzahlen  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  und Gelbwerte der enzym- und mediatorfreien Varianten schneiden auch nach einer ligninerhaltenden Bleichstufe stets besser ab. Mit den enzymatischen Ansätzen ist damit kein Vorteil bei der Behandlung von Sekundärfaserstoffen zu erzielen.

Zu Kontrollzwecken werden die Ligningehalte der DIP-Proben untersucht. Sie schwanken geringfügig zwischen 13,3 % und 16,7 % und werden weder durch die enzymatische Behandlung noch durch die verschiedenen Bleich- bzw. Extraktionsstufen wesentlich verändert (Tab. 4.2.14).

**Tab. 4.2.13:** Farbort, Weißgrad und Gelbwert nach enzymatischer Behandlung, Lagerung, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- sowie FAS-Bleiche und alkalischer Extraktion

| Zeitpunkt der Weißgradmessung | nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bleiche |       |       | nach FAS-Bleiche |       |       | nach alkalischer Extraktion |       |       |
|-------------------------------|---------------------------------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|-----------------------------|-------|-------|
| DIP-Qualität                  | nach Flotation                              |       |       |                  |       |       |                             |       |       |
| Laccase [U/g]                 | -                                           | 1000  | 1000  | -                |       | 1000  | -                           | 1000  | 1000  |
| HBT [%]                       | -                                           | -     | 1     | -                | -     | 1     | -                           | -     | 1     |
| Aceton [ml]                   | -                                           | -     | 80    | -                | -     | 80    | -                           | -     | 80    |
| Weißgrad [% ISO]              | 68,3                                        | 67,5  | 67,5  | 67,6             | 66,1  | 65,7  | 55,4                        | 54,2  | 55,0  |
| Helligkeit L* [-]             | 89,53                                       | 89,36 | 89,49 | 88,69            | 88,17 | 88,12 | 84,91                       | 84,50 | 85,14 |
| grün-rot a* [-]               | -0,42                                       | -0,48 | -0,63 | 0,04             | 0,03  | -0,06 | -0,77                       | -0,52 | -0,54 |
| blau-gelb b* [-]              | 7,01                                        | 7,45  | 7,63  | 6,06             | 6,51  | 6,82  | 11,33                       | 11,79 | 12,13 |
| Gelbwert [-]                  | 13,3                                        | 14,2  | 14,4  | 12,1             | 13,0  | 13,5  | 21,9                        | 23,1  | 23,5  |
| Asche [%]                     | 4,0                                         | 4,0   | 3,2   | 4,6              | 4,6   | 3,8   | 5,1                         | 4,4   | 4,0   |
| korrigierter Weißgrad [% ISO] | 72,4                                        | 71,6  | 72,2  | 71,5             | 69,9  | 69,9  | 59,0                        | 58,1  | 59,2  |
| DIP-Qualität                  | Nach Hyperwäsche                            |       |       |                  |       |       |                             |       |       |
| NS 51002 [U/g]                | -                                           | 1000  | 1000  | -                | 1000  | 1000  | -                           | 1000  | 1000  |
| HBT [mg/U]                    | -                                           | -     | 1     | -                | -     | 1     | -                           | -     | 1     |
| Aceton [ml/mg]                | -                                           | -     | 0,08  | -                | -     | 0,08  | -                           | -     | 0,08  |
| Weißgrad [% ISO]              | 70,4                                        | 69,8  | 69,5  | 69,7             | 68,0  | 67,5  | 57,3                        | 55,8  | 55,8  |
| Helligkeit L* [-]             | 90,53                                       | 90,34 | 90,17 | 89,64            | 89,09 | 88,91 | 86,14                       | 85,62 | 85,51 |
| grün-rot a* [-]               | -0,64                                       | -0,75 | -0,66 | -0,22            | -0,22 | -0,24 | -1,21                       | -1,01 | -0,92 |
| blau-gelb b* [-]              | 6,99                                        | 7,15  | 7,10  | 5,97             | 6,52  | 6,63  | 11,72                       | 12,21 | 11,99 |
| Gelbwert [-]                  | 13,1                                        | 13,3  | 13,3  | 11,6             | 12,7  | 12,9  | 22,0                        | 23,2  | 22,9  |
| Asche [%]                     | 0,7                                         | 0,8   | 0,7   | 0,7              | 0,7   | 0,7   | 0,8                         | 0,8   | 0,8   |
| korrigierter Weißgrad [% ISO] | 77,2                                        | 76,6  | 76,4  | 76,6             | 74,8  | 74,4  | 64,1                        | 62,6  | 62,6  |

**Tab. 4.2.14:** Ligningehalte Laccase- bzw. LMS-behandelter Prüfblätter nach Flotation und Hyperwäsche sowie nach anschließender alternativer Peroxid- und FAS-Bleiche bzw. alkalischer Extraktion

|                   |                  |      |      |
|-------------------|------------------|------|------|
| Laccase [U/g]     | 0                | 1000 | 1000 |
| Mediator [%]      | 0                | 0    | 1    |
| Aceton [ml]       | 0                | 0    | 170  |
|                   | nach Flotation   |      |      |
| Referenz          | 16,7             | 15,5 | 15,7 |
| Peroxidbleiche    | 13,5             | 15,0 | 16,2 |
| FAS-Bleiche       | 14,0             | 14,0 | 15,2 |
| alkal. Extraktion | 13,7             | 14,3 | 14,6 |
|                   | nach Hyperwäsche |      |      |
| Referenz          | 14,3             | 14,4 | 14,0 |
| Peroxidbleiche    | 14,3             | 13,9 | 14,4 |
| FAS-Bleiche       | 14,4             | 14,2 | 14,4 |
| alkal. Extraktion | 13,3             | 14,0 | 13,8 |

#### 4.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Versuchen zum Deinking von AP und DIP

Folgende Beobachtungen konnten zunächst bei den Versuchen mit Laccase, Mediator HBT und Altpapier gemacht werden: Bis zu einer Dosierung von 50 U Laccase pro Gramm altes gealterter Modellpapiermischung für Haushaltssammelware ist kein klarer Effekt, weder für die Weißgrad- noch für die Schmutzpunktentwicklung, zu beobachten. Ab 100 U Laccase kommt es in einem Teil der Versuchsreihen zu einem deutlichen Weißgradabfall. Dieser Effekt ist im von den Laccasen bevorzugten sauren pH-Bereich deutlicher ausgeprägt als im neutralen. Es handelt sich damit um einen enzymatisch induzierten Effekt. Zum Teil bleibt der Weißgrad allerdings bei 100 U noch konstant. Da die Messreihen mit verschiedenen Papierchargen ausgeführt werden (aber innerhalb einer Messreihe die Papiercharge nicht gewechselt wird), kommt dieser Effekt eventuell dadurch zustande, dass das Enzym teilweise durch Bestandteile des komplexen und in seiner Zusammensetzung nicht konstanten Substrates Altpapier inaktiviert wird. Ab 1000 U Laccase wird schließlich reproduzierbar ein deutlicher Weißgradabfall beobachtet. Diese Verdunkelung wird mit Zugabe des Mediators HBT noch verstärkt. Mit dem Weißgradabfall ist nach Hyperwäsche eine Vergilbung zu beobachten. Gleichzeitig ist eine Schmutzpunktreduktion immer nur in Verbindung mit einem Weißgradabfall messbar. Dieses Ergebnis kann auf Grund der kontrastabhängigen Messtechnik des DOT-Counters nicht als signifikant gewertet werden.

Mit der Einführung des helleren DIP-Stoffes als Substrat können die Probleme der Weißgrad-abhängigen Schmutzpunktbestimmung reduziert werden. Die Laccase bzw. LMS-Behandlung hat auf die Schmutzpunktreduktion keine Auswirkung. Mit steigender Laccase- bzw. Mediatorkonzentration fallen die Weißgrade in ähnlichem Umfang ab wie bei AP. Der Weißgradabfall ist an eine Reduzierung der Helligkeit  $L^*$  sowie an eine Zunahme der Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  und damit an einen Anstieg des Gelbwertes gebunden. Versuche mit unbedrucktem Recyclingpapier zeigen, dass Druckfarben für diese Verfärbung keine Rolle spielen. Nach einer an das enzymatische Deinking anschließenden Peroxidbleiche, FAS-Bleiche oder alkalischen Extraktion schneiden die mit Laccase- bzw. mit Laccase und Mediator behandelten Proben bezüglich Weißgrad und Farbort weiterhin schlechter ab als die entsprechenden Enzym- und Mediator-freien Referenzwerte. Mit den enzymatischen Ansätzen ist damit kein Vorteil bei der Behandlung von Sekundärfaserstoffen zu erzielen.

### 4.3 Versuche zur LMS- und Laccase-unterstützten Bleiche von Primärfaserstoffen

Die durchgeführten Versuche zur Behandlung von AP und DIP mit Laccase und Mediator (Kapitel 4.2.1 und 4.2.2) ergeben nur unbefriedigende Resultate. Eine Schmutzpunktreduzierung ist nicht nachzuweisen. Die beobachteten Effekte beschränken sich auf einen Abfall der Weißgrade und auf eine zusätzliche Vergilbung der Sekundärfaserstoffe, was auf eine Vergilbung des Lignins hinweist. Um diesen Erklärungsansatz auf seine Richtigkeit zu überprüfen, wird eine weitere Versuchsreihe mit Primärfaserstoffen durchgeführt. Gleichzeitig wird mit diesen Versuchen die Funktionsfähigkeit der Laccasen im LMS unter den Bedingungen des Neutral-Deinkings untersucht.

Dies ist insofern notwendig, als dass das LMS in der Literatur zur Zellstoffbleiche im sauren Milieu eingesetzt wird. Dabei wird unter Sauerstoffdruck gearbeitet, damit das Co-Substrat Sauerstoff nicht zum begrenzenden Faktor für die ablaufende enzymatische Reaktion werden kann. Erst nach Ablauf der Inkubationsphase wird der pH-Wert zur Entfernung alkalilöslich gewordener Ligninbruchstücke angehoben, indem eine alkalische Extraktion durchgeführt wird (CALL, 1994 b), die, um schärfere Delignifizierungsbedingungen zu erhalten, alternativ als Peroxid-, Sauerstoff- oder peroxidverstärkte Sauerstoffbleiche durchgeführt werden kann (CHAKAR und RAGAUKAS, 1999 und 2000).

Beim Laccase- bzw. LMS-unterstützten Deinking von AP oder DIP muss dagegen der pH-Wert bereits während der Inkubationsphase im neutral-alkalischen Bereich liegen, um die Versuche unter praxisrelevanten Bedingungen durchführen zu können. Das liegt zum einen daran, dass sich der Eigen-pH-Wert des verwendeten Altpapiers und DIPs in diesem Bereich befindet. Dieser kann, abgesehen vom finanziellen Aspekt, nicht problemlos abgesenkt werden: Salzsäure kommt wegen des chlorbedingten AOX-Anstieges und organische Säuren wegen ihrer CSB-erhöhenden Eigenschaften nicht in Frage. Schwefelsäure würde schließlich zusammen mit Calciumionen, die vor allem dem Strich- und Füllstoffanteil des APs entstammen, als Gips ( $\text{CaSO}_4$ ) ausgefällt werden, was zu störenden Ablagerungen in der Deinkanlage und auf der Papiermaschine führen würde. Zum anderen ist das Arbeiten unter Sauerstoffdruck ebenfalls nicht praxisrelevant, da für altpapieraufarbeitende Deinkinganlagen vor Flotation keine Möglichkeit besteht, unter erhöhtem Sauerstoffdruck zu arbeiten.

Aus dem Nichteinhalten der „klassischen“ Reaktionsbedingungen für Laccase und Mediator kann jedoch eine Reihe negativer Konsequenzen resultieren.

Bei Anwendung des LMS unter Luftatmosphäre besteht die Gefahr, dass der verfügbare Sauerstoff durch die Laccasen rasch aufgebraucht wird und es dadurch zu einer Beeinträchtigung des LMS kommt.

Die meisten Laccasen besitzen im leicht sauren pH-Bereich ihre höchste Aktivität. Im alkalischen Milieu ist dagegen ihre katalytische Wirkung im Allgemeinen eingeschränkt, was auch für die in den Experimenten verwendeten Laccasen von *T. villosa* und *M. thermophila* zutrifft (vergl. Kapitel 4.1.1 und 4.1.2).

Gleichzeitig ist vom Mediator HBT bekannt, dass dessen Radikalstabilität mit steigendem pH-Wert abnimmt (MICKEL, M., 2001: mdl. Mitt.). Damit verkürzt sich die für ein HBT-Radikal zur Verfügung stehende Zeit, in der es existiert, um vom aktiven Zentrum der Laccase zum Lignin gelangen zu können, das es als Radikal angreifen soll. Gleichzeitig verliert der Mediator vermutlich auch an Redoxpotential (LUND und KWEE, 1968), so dass der Mediator, wenn überhaupt, nur noch eingeschränkt funktionstüchtig sein dürfte. Dieser Effekt des pH-Wertes auf den Mediator könnte erklären, warum sich bisher die Ergebnisse aus den Deinking-Versuchen mit Laccase alleine und mit Laccase und Mediator HBT so sehr ähneln. Denn der Einsatz von HBT führt auch nach Abschluss der Bleiche lediglich zu einer zusätzlichen Verdunkelung und Vergilbung der Stoffe. Es ist daher denkbar, dass lediglich die Deinkergebisse von AP- oder DIP-Proben beobachtet werden, die einmal mit Laccase und einmal mit Laccase und einer nicht reaktionsfähigen Mediatorchemikalie, nicht aber mit einem funktionstüchtigen LMS durchgeführt werden.

Diese Überlegungen und Beobachtungen machen es interessant, die Funktionsweise des LMS und von Laccase ohne Mediator unter optimalen (0,5 MPa O<sub>2</sub>-Druck, pH 4,5) und nicht optimalen Bedingungen (Luftatmosphäre, pH 7) zu untersuchen.

Eine weitere Ursache für das schlechte Abschneiden der mit Laccase bzw. dem LMS behandelten Proben könnte im Ligningehalt bzw. in der Faserstoffzusammensetzung von Altpapieren liegen. Bei Altpapier handelt es sich um eine inhomogene Mischung verschiedener Primärfaserstoffe. Insbesondere bei der in dieser Arbeit verwendeten Altpapierqualität, der sog. Haushaltssammelware, muss mit einem hohen Anteil holzhaltiger, ligninerhaltend gebleichter Primärfaserstoffe wie Holzschliff und TMP gerechnet werden.

Der Großteil der Publikationen zur Laccase- und Mediator-unterstützten Bleiche von Faserstoffen beschäftigt sich aber mit chemisch aufgeschlossenen Faserstoffen. Davon handelt wiederum der Großteil der Publikationen von Arbeiten mit bereits sauerstoffvorgebleichten Sulfatzellstoffen (vergl. Kap. 2.4.3.1). In den meisten

Untersuchungen werden lediglich Ergebnisse nach Abschluss der kompletten Bleichsequenz präsentiert. Nur in wenigen Arbeiten wird darauf hingewiesen, dass sich der vollständige Bleicheffekt erst nach einer alkalischen Extraktion einstellt. Noch seltener werden Zwischenergebnisse präsentiert, die die Entwicklung der Delignifizierung oder des Weißgrades nach enzymatischer Laccase-Mediator-Behandlung bzw. nach abgeschlossener alkalischer Extraktion wiedergeben. So stellt Potthast (1998) dar, dass die LMS-Behandlung eines Kiefern-Sulfatzellstoffes mit Ausgangskappazahl 23 zunächst zu einem Weißgradabfall führt und erst nach mehrfacher Wiederholung der Inkubations- und Extraktionsphase ein Weißegewinn erzielt wird. Diese Arbeit zeigt, dass der bezüglich des Weißgrades erfolgreiche Ausgang einer LMS-Behandlung vom (Rest-)Ligningehalt des Faserstoffes abhängt. Damit stellte sich die Frage, ob Altpapier mit seinem Holzschliff- und TMP-Anteil einen zu hohen Ligningehalt für eine einfache, erfolgreiche enzymatische Behandlung besitzt. Daher liegt es nahe, zum einen mit einem sauerstoffvorgebleichten, ligninarmen Nadelholz-Sulfatzellstoff zu arbeiten, um ein Substrat zur Verfügung zu haben, dessen Bleichbarkeit mit dem LMS in zahlreichen Arbeiten belegt ist und zum anderen mit ligninreichem Holzschliff und TMP als typischen Bestandteilen von Haushaltssammelware, um überprüfen zu können, ob die bei den Versuchen mit AP und DIP eingetretene Vergrauung und Vergilbung auf eine Ligninmodifikation zurückgeführt werden kann.

POTTHAST (1998) stellt in ihrer Arbeit dar, dass sich Laccasen verschiedener Quellen auch hinsichtlich der chemischen Reaktionen, die sie katalysieren können, unterscheiden. KRUUS und VIIKARI (2001) zeigen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit mit unterschiedlichen Substraten und der Eintritt einer Substrathemmung vom Laccase-Typ abhängen. Daher stellt sich die Frage, ob in dieser Arbeit eventuell mit ungeeigneten Laccasen gearbeitet wird. Deshalb werden die Versuche mit den Primärfaserstoffen zusätzlich mit einer dritten Laccase (von *T. versicolor*) durchgeführt, von der bekannt ist, dass mit ihr zumindest Zellstoffe erfolgreich delignifiziert werden können (FREUDENREICH et al., 1998).

### 4.3.1 Behandlung von Zellstoff mit Laccase und Mediator

#### 4.3.1.1 Einfluss des Laccase-Präparates auf die Funktionstüchtigkeit des LMS unter optimalen Bedingungen

Zunächst wird sauerstoffvorgebleichter Nadelholz-Sulfatzellstoff mit dem LMS bei „Optimalbedingungen“ behandelt. Das heißt, dass die Inkubationsphase mit Laccase und Mediator HBT bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck und pH 4,5 durchgeführt wird. Die Versuche werden mit drei verschiedenen Laccase-Präparaten (Laccasen von *T. villosa*, *M. thermophila* und *T. versicolor*) und unterschiedlichen Laccase- und Mediator dosierungen durchgeführt. Die Dosierungen von 5 bis 15 U Laccase und 2% HBT werden aufgrund der Produktbeschreibung zur *T. versicolor*-Laccase gewählt. 1000 U Laccase und 1% HBT entsprechen dagegen der Dosierung, bei der durchgängig die eindeutigsten Effekte bei den eigenen Versuchen mit AP und DIP erzielt wurden. Kappazahl-, Weißgrad- und Farbwertbestimmung erfolgen nach Abschluss der Inkubationsphase sowie nach Durchführung der anschließenden alkalischen Extraktion. Die Ergebnisse zu diesen Versuchen werden in den Abb. 4.3.1 und 4.3.2 sowie in Tab. 4.3.1 dargestellt.

Im Vergleich zur Kappazahl des Referenzwertes tritt bereits nach der Inkubationsphase mit Laccase und Mediator eine Delignifizierung ein, deren größtes Ausmaß aber erst nach Abschluss der alkalischen Extraktion erreicht wird (Abb. 4.3.1). Beispielsweise nimmt die Kappazahl bei Einsatz von 1000 U *T. villosa*-Laccase und 1 % HBT von 8,1 auf 6,1 ab. Nach alkalischer Extraktion beträgt sie 5,3 und ist damit um 35% niedriger als die Ausgangskappazahl des Referenzwertes. Diese sinkt in Folge der alkalischen Extraktion lediglich um 12% auf einen Wert von 7,1.

Die Inkubation der Proben mit Laccase und Mediator führt zunächst zu einem Weißgradabfall. Erst durch die alkalische Extraktion kommt es zu einem Weißgewinn (Abb. 4.3.2). So sinkt der Weißgrad des Zellstoffs nach einer Behandlung mit 1000 U *T. villosa*-Laccase und 1% HBT im Vergleich zum Referenzwert um 1% ISO ab. Doch übertrifft nach Abschluss der Extraktionsstufe die Endweise mit 48,2% ISO den Weißgrad der ebenfalls alkalisch extrahierten Referenz um 5,2% ISO.

Parallel zur Weiße verändern sich die Werte des CIELab-Systems.

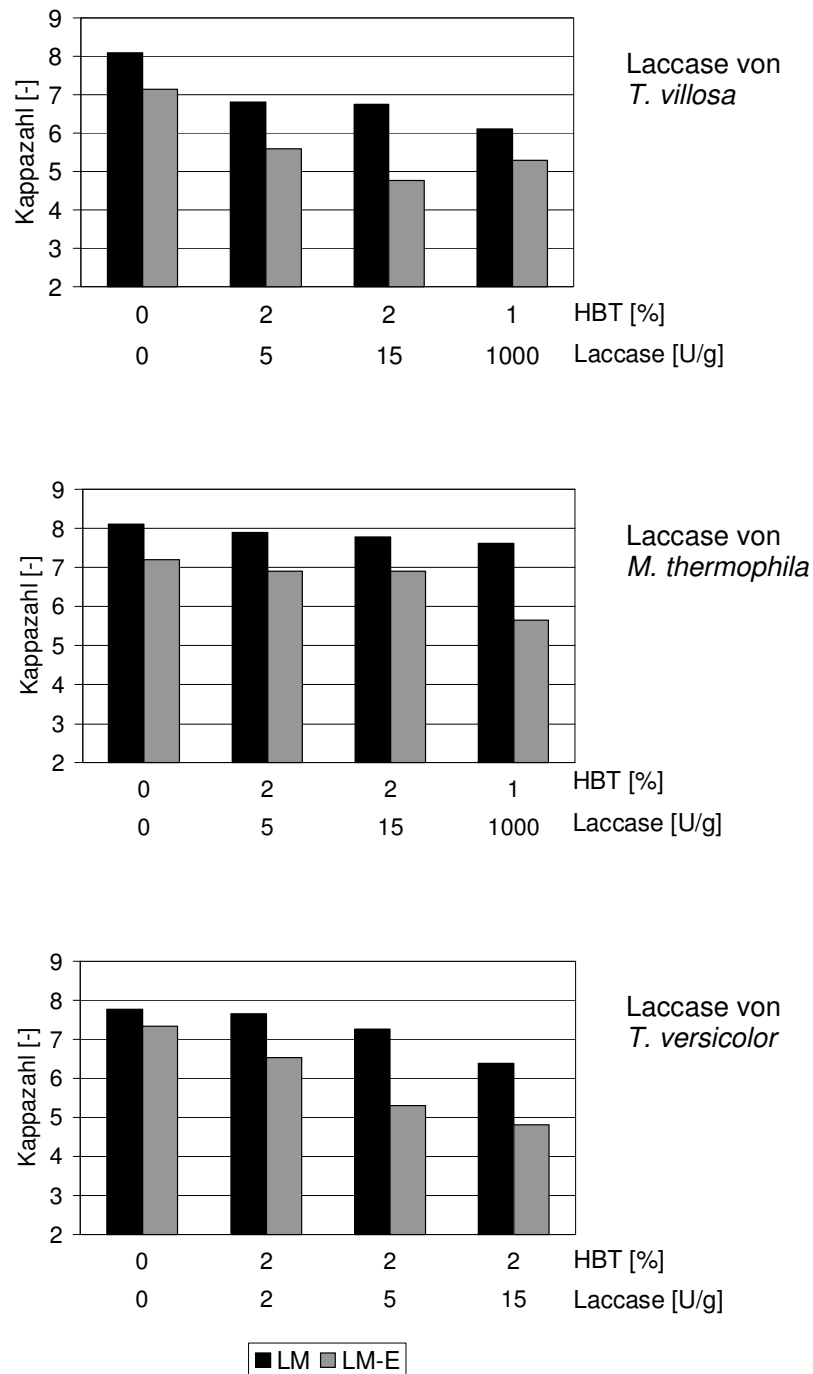
Nach der enzymatischen Inkubation nimmt mit sinkendem Weißgrad die Helligkeit  $L^*$  ab und die Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  verschieben sich in Richtung Rot und Gelb, so dass der Gelbwert ansteigt. Während bei einem Referenzweißgrad von 40,6% ISO  $L^*$  bei

81,25 liegt (Tab. 4.3.1), beträgt z.B. die Helligkeit  $L^*$  der mit 1000 U *T. villosa*-Laccase und 1% HBT inkubierten Probe bei einem Weißgrad von 39,6% ISO nur noch 80,84. Der Farbwert  $a^*$  steigt bei dieser Behandlung von 4,22 auf 4,60 und  $b^*$  von 20,97 auf 21,43, so dass die Vergilbung durch die enzymatische Behandlung intensiviert wird. Im Beispiel erhöht sich der ursprüngliche Gelbwert von 44,5 auf 45,8.

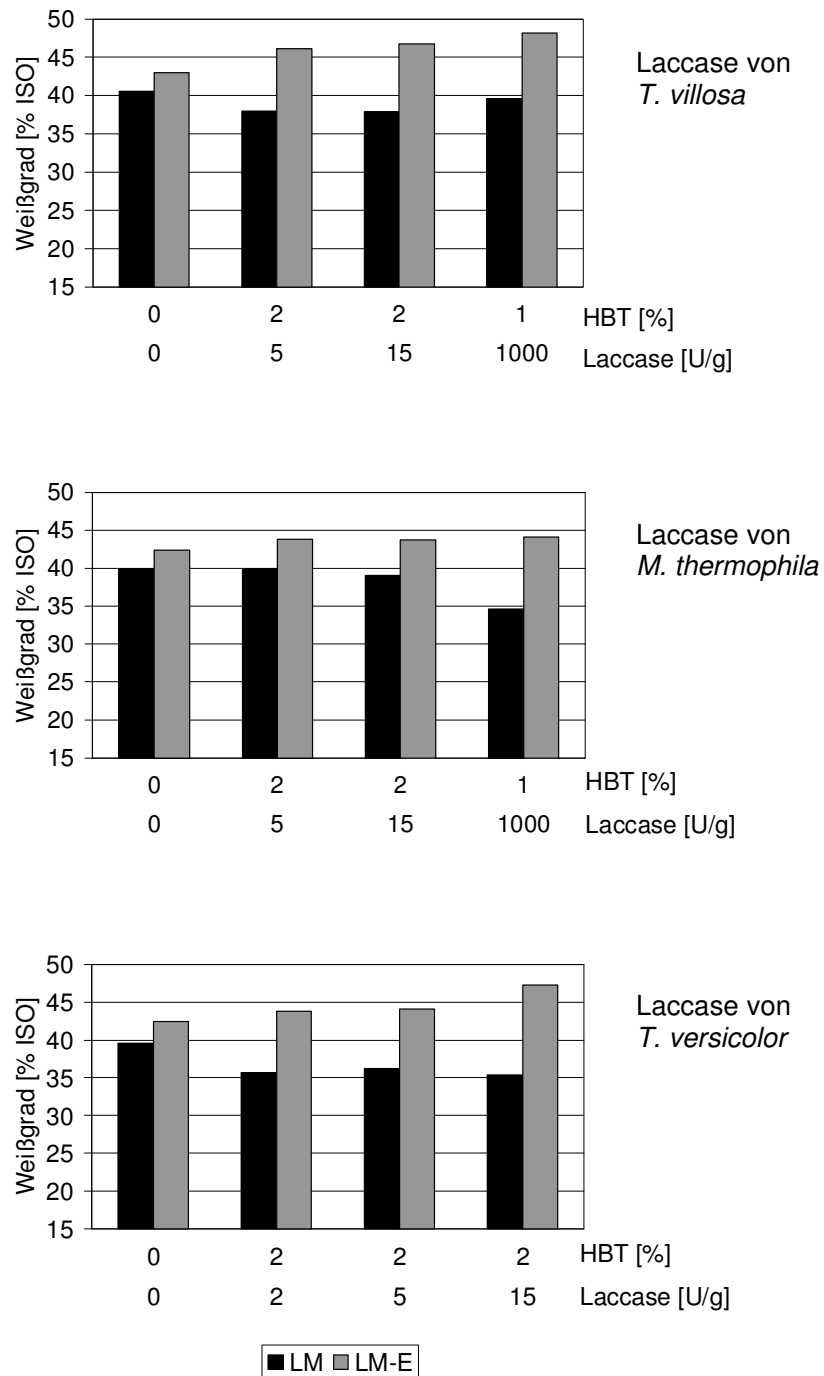
Umgekehrt verhält es sich nach Durchführung der alkalischen Extraktion. Mit dem durch den Einsatz von Laccase und HBT letztlich erzielten Weißegewinn verbessern sich nun sowohl die Helligkeit  $L^*$  als auch die Farbkennzahlen  $a^*$  und  $b^*$ . Die Vergilbung sinkt (Tab. 4.3.1). Im Beispiel betragen bei einem Weißgrad von 43% ISO die Werte des Referenzwertes für  $L^*$  82,86, für  $a^*$  3,88 und für  $b^*$  20,89. Beim um 5,2 % ISO höheren Weißgrad der mit 1000 U *T. villosa*-Laccase und 1% HBT inkubierten und extrahierten Probe sind dies 85,12 für  $L^*$  sowie nur noch 3,26 für  $a^*$  und 18,82 für  $b^*$ . Der Gelbwert nimmt von 43,5 auf 38,6 ab.

Mit 5 bis 1000 U Laccase und 2% bzw. 1% HBT kann dabei die Dosierung der Laccasen in einem weiten Rahmen variiert werden, ohne dass es zu einer Änderung dieses Trends kommt.

Die beschriebene Entwicklung der Zellstoffeigenschaften kann für alle drei Laccasen beobachtet werden. Insofern sind sie alle drei prinzipiell für die Laccase-Mediator-unterstützte Zellstoffbleiche geeignet. Die Ergebnisse zeigen bereits hier, dass eine Entfernung des durch Laccase und Mediator verfärbten und nun alkalilöslichen Lignins durch eine entsprechende Extraktionsstufe unumgänglich ist, um für den vergrauten und vergilbten Stoff einen Bleicheffekt zu erzielen.



**Abb. 4.3.1:** Kappazahlen eines sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes nach einer Inkubationsphase (LM) mit Laccase und HBT bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck und pH 4,5 sowie nach anschließender alkalischer Extraktion (LM-E). Versuchsergebnisse bei Verwendung von Laccase von *T. villosa* (oben), *M. thermophila* (Mitte) und *T. versicolor* (unten)



**Abb. 4.3.2:** Weißgrade eines sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes nach einer Inkubationsphase (LM) mit Laccase und HBT bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck und pH 4,5 sowie nach abgeschlossener alkalischer Extraktion (LM-E). Versuchsergebnisse bei Verwendung von Laccase von *T. villosa* (oben), *M. thermophila* (mittig) und *T. versicolor* (unten)

**Tab. 4.3.1:**  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ - und Gelbwerte eines sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes nach einer Inkubationsphase (LM) mit verschiedenen Laccasen und HBT bei 0,5 MPa  $O_2$  und pH 4,5 sowie nach abgeschlossener alkalischer Extraktion (LM-E)

| Behandlung<br>[-]                                 | Aktivität<br>[U/g otro] | HBT<br>[%] | $L^*$<br>[-] | $a^*$<br>[-] | $b^*$<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|---------------------------------------------------|-------------------------|------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| bei Verwendung von <i>T. villosa</i> -Laccase     |                         |            |              |              |              |                 |
| Referenz                                          | 0                       | 0          | 81,25        | 4,22         | 20,97        | 44,5            |
| LM                                                | 5                       | 2          | 79,98        | 4,64         | 22,01        | 47,2            |
| LM                                                | 15                      | 2          | 80,00        | 4,68         | 22,18        | 47,5            |
| LM                                                | 1000                    | 1          | 80,84        | 4,60         | 21,43        | 45,8            |
| Referenz-E                                        | 0                       | 0          | 82,86        | 3,88         | 20,89        | 43,5            |
| LM-E                                              | 5                       | 2          | 84,35        | 3,46         | 19,82        | 40,7            |
| LM-E                                              | 15                      | 2          | 84,63        | 3,41         | 19,65        | 40,3            |
| LM-E                                              | 1000                    | 1          | 85,12        | 3,26         | 18,82        | 38,6            |
| bei Verwendung von <i>M. thermophila</i> -Laccase |                         |            |              |              |              |                 |
| Referenz                                          | 0                       | 0          | 81,01        | 4,37         | 21,32        | 45,4            |
| LM                                                | 5                       | 2          | 80,90        | 4,39         | 21,15        | 45,1            |
| LM                                                | 15                      | 2          | 80,49        | 4,49         | 21,54        | 46,0            |
| LM                                                | 1000                    | 1          | 78,35        | 5,47         | 23,62        | 51,4            |
| Referenz-E                                        | 0                       | 0          | 82,67        | 4,03         | 21,30        | 44,3            |
| LM-E                                              | 5                       | 2          | 83,40        | 3,85         | 20,85        | 43,2            |
| LM-E                                              | 15                      | 2          | 83,40        | 3,88         | 20,99        | 43,4            |
| LM-E                                              | 1000                    | 1          | 83,57        | 3,88         | 20,75        | 42,9            |
| bei Verwendung von <i>T. versicolor</i> -Laccase  |                         |            |              |              |              |                 |
| Referenz                                          | 0                       | 0          | 80,88        | 4,42         | 21,59        | 45,9            |
| LM                                                | 2                       | 2          | 78,22        | 5,14         | 21,92        | 48,3            |
| LM                                                | 5                       | 2          | 78,76        | 5,17         | 22,05        | 48,3            |
| LM                                                | 15                      | 2          | 78,55        | 5,51         | 22,92        | 50,2            |
| Referenz-E                                        | 0                       | 0          | 82,68        | 3,97         | 21,27        | 44,2            |
| LM-E                                              | 2                       | 2          | 83,36        | 3,72         | 20,80        | 43,0            |
| LM-E                                              | 5                       | 2          | 83,60        | 3,81         | 20,82        | 43,0            |
| LM-E                                              | 15                      | 2          | 84,86        | 3,35         | 19,43        | 39,8            |

#### **4.3.1.2 Einfluss suboptimaler Reaktionsbedingungen auf die Funktionstüchtigkeit des LMS**

In den nächsten Versuchen mit dem sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoff werden die Inkubationsbedingungen sukzessive von den optimalen Bedingungen des LMS zu den suboptimalen Bedingungen des Neutraldeinkings verschoben. Dazu werden zunächst Versuche durchgeführt, bei denen die Inkubation im neutral-alkalischen Bereich bei pH-Werten von 7 bis 8 durchgeführt wird. Dann wird zusätzlich die Sauerstoffversorgung während der Inkubationsphase reduziert, indem nicht mehr in einem Bleichautoklaven bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck, sondern in offenen Temperiergefäßen bei Luftatmosphäre gearbeitet wird.

##### **4.3.1.2.1 Einfluss neutral-alkalischer pH-Werte während der Inkubationsphase auf die Funktionstüchtigkeit des LMS**

In Abb. 4.3.3 wird dargestellt, welchen Einfluss ein neutraler bis alkalischer pH-Wert während der Inkubationsphase mit Laccase und Mediator bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck hat. Als Vergleichswerte dienen bei pH 4,5 inkubierte Proben.

Bei konstantem pH Wert führt die Inkubation mit Laccase und Mediator im Vergleich zum Referenzwert vor bzw. nach alkalischer Extraktion jeweils zur niedrigsten Kappazahl. Das generelle Ausmaß der Ligninentfernung und das Ausmaß der durch Laccase und Mediator zusätzlich möglichen Delignifizierung nehmen jedoch mit steigendem pH-Wert ab. So liegt die Kappazahl nach Inkubation mit 1000 U *T. villosa*-Laccase und 1% HBT bei pH 4,5 mit 6,1 deutlich unterhalb der Kappazahl des Referenzwertes von 8,1. Genauso schneidet nach alkalischer Extraktion die enzymatische Variante mit einer Kappazahl von 5,3 besser ab als der Referenzwert mit 7,1. Mit steigendem pH-Wert während der Inkubationsphase reduzieren sich nun diese Unterschiede zwischen dem Referenzwert und der enzymatischen Variante. Bei pH 8 liegen nach der Inkubationsphase die Kappazahlen für die enzymfreie und die enzymatische Variante mit 7,4 schließlich auf gleich hohem Niveau. Nach Durchführung der alkalischen Extraktion schneidet die LMS-behandelte Probe mit einer Kappazahl von 6,7 nur noch tendenziell besser ab als die Referenzprobe mit 6,8. Vergleichbare Werte werden bei Verwendung von *M. thermophila*- und *T. versicolor*-Laccase erzielt (Abb. 4.3.3).

Die Ergebnisse zeigen, dass das LMS mit steigendem pH-Wert prinzipiell funktionstüchtig bleibt. Dabei zeigt die deutliche Abnahme der Intensität der Delignifizierung, dass das LMS im neutral-alkalischen pH-Bereich nur noch eingeschränkt funktioniert (Abb. 4.3.3).

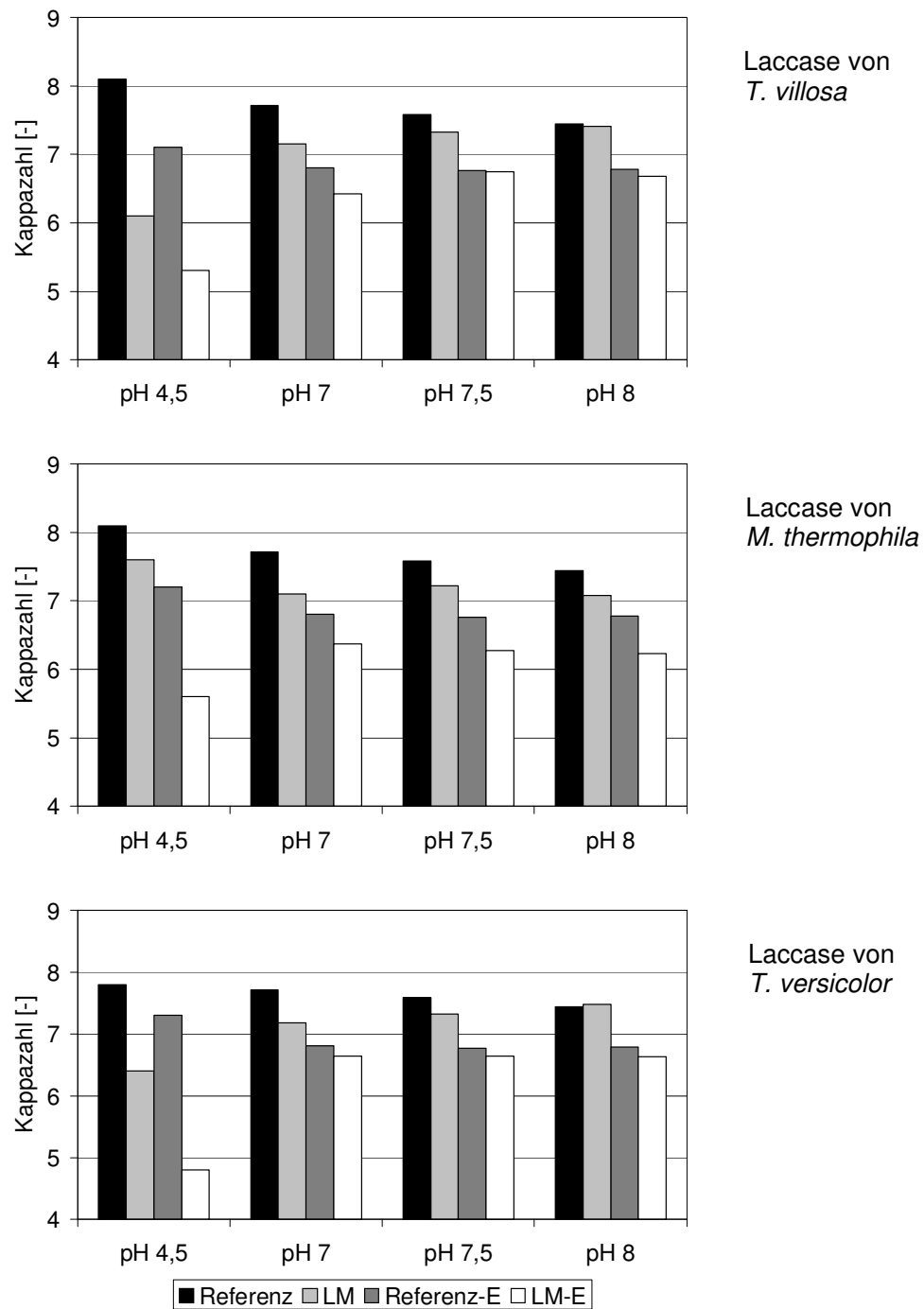
Bei Einsatz der Laccasen von *T. villosa* und *M. thermophila* sinken bei fast allen Versuchen die Weißgrade der mit Laccase und HBT behandelten Proben im Vergleich zum Referenzwert ab (Abb. 4.3.4). Die Weißgraddifferenz ist im Fall der *T. villosa*-Laccase relativ gering und schwankt zwischen 1% ISO bei pH 4,5 und 0,3 % ISO bei pH 7 bzw. 0,5% ISO bei pH 7,5. Bei Durchführung der Inkubation bei pH 8 liegt der Weißgrad der mit Laccase und Mediator inkubierten Probe mit nur 0,1% ISO Differenz im Rahmen der Messgenauigkeit auf gleich hohem Niveau. Durchweg niedriger als der Referenzweißgrad ist der Weißgrad der mit Laccase und Mediator inkubierten Proben bei der Laccase von *M. thermophila*. Auch hier liegen die Differenzen im neutralen pH-Bereich mit 0,3% ISO bis 0,7% ISO eng beieinander. Bemerkenswert ist der starke Weißgradabfall der enzymatisch behandelten Proben von 5,3% ISO bei pH 4,5. Da diese Differenz auch bei Verwendung von Laccase von *T. versicolor* mit 4,2% ISO oder von *T. villosa*-Laccase mit 1% ISO hier am größten ist, spiegelt dies die hohe enzymatische Aktivität der Laccasen im sauren pH-Bereich wider. Interessanter Weise liegen im neutralen pH-Bereich die Weißgrade unmittelbar nach Inkubation mit *T. versicolor*-Laccase und HBT mit 0,3% ISO bis 0,5% ISO geringfügig über dem Weißgrad des Referenzwertes. Es wird jedoch in späteren Versuchen gezeigt, dass bei Verwendung von ligninreichen Faserstoffen auch mit dieser Laccase der Weißgrad unmittelbar nach Inkubation deutlich absinkt (vergl. Kap. 4.3.2).

Bei konstantem pH-Wert wird unabhängig vom verwendeten Laccasepräparat der höchste Weißgrad erst nach alkalischer Extraktion erzielt (Abb. 4.3.4). Dabei übertrifft der Weißgrad der mit Laccase und Mediator behandelten Probe jeweils den Weißgrad der Referenz. So beträgt der Weißgrad nach alkalischer Extraktion bei Einsatz der *T. villosa*-Laccase und HBT bei pH 4,5 48,2% ISO, der Weißgrad der Referenz dagegen lediglich 43% ISO. Im neutralen pH-Bereich fällt der erzielbare Weißgewinn deutlich geringer aus. Bei pH 8 liegt der Weißgrad der enzymatischen Variante mit 41,9% ISO deutlich niedriger und nur um 1% ISO über dem Wert der neutralen Referenz von 40,9% ISO. Die Abnahme des durch das LMS erreichbaren Weißgewinns gegenüber der Referenzprobe ist auch bei Verwendung der *T. versicolor*-Laccase zu beobachten. Während bei pH 4,5 ein maximaler Weißgrad von 47,3% ISO und eine Weißgewinn von 4,9% ISO erzielt wird, beträgt der Weißgrad der mit Laccase und HBT behandelten Probe bei pH 8 nur noch 42,5% ISO und übertrifft den Weißgrad der Referenz nur noch um 1,6% ISO. Bei Verwendung von *M. thermophila*-Laccase unterscheiden sich die Ergebnisse nach alkalischer Extraktion insofern, als dass bei pH 4,5 mit 44% ISO kein wesentlich höherer maximaler Weißgrad als bei neutralem pH-Wert erzielt werden kann, was eventuell mit dem mehr zum neutralen pH-Bereich verschobenen Aktivitätsbereich zusammenhängt (vergl. Kap. 4.1). Wie bei den anderen beiden Laccasen wird auch hier der

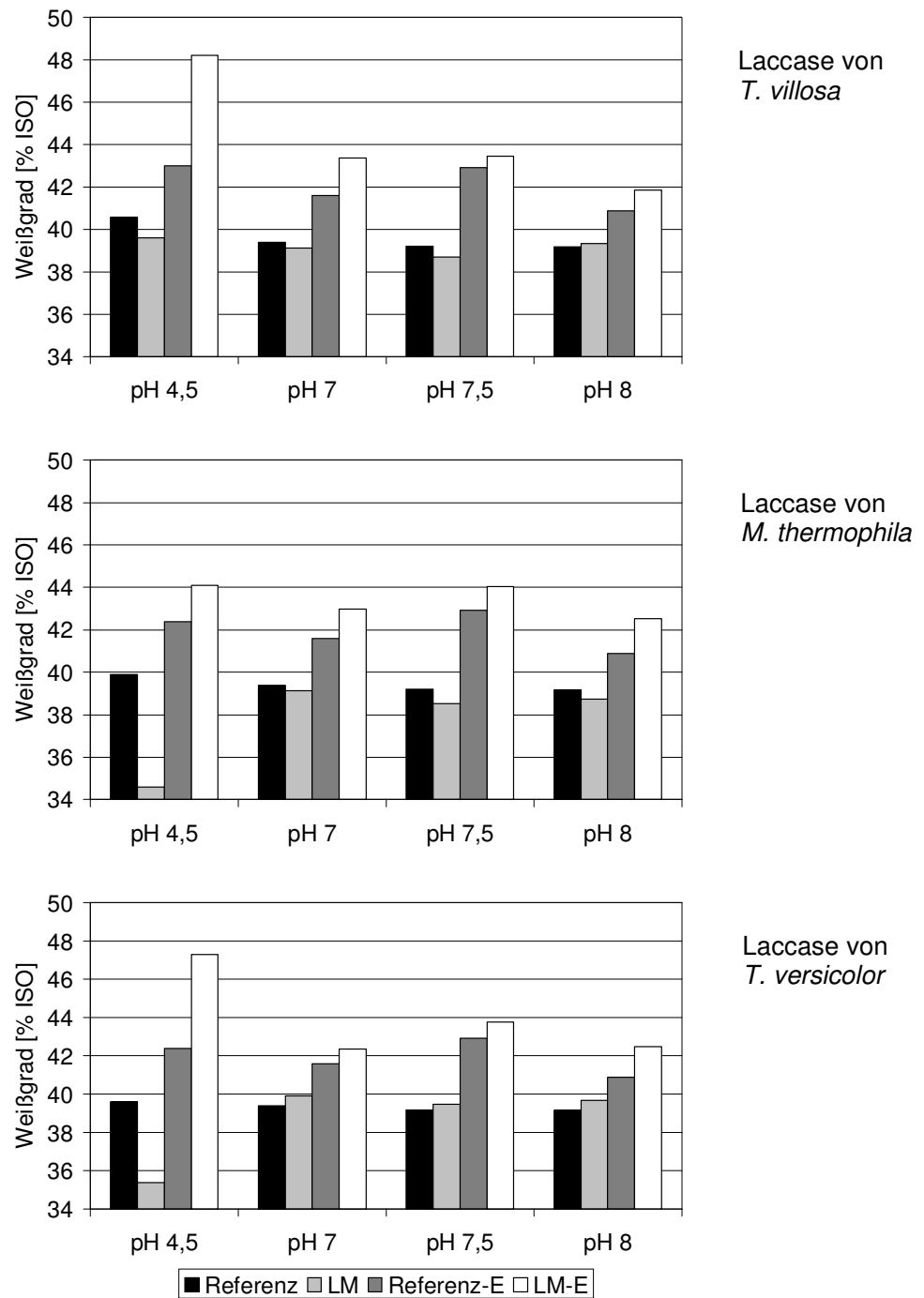
maximale Weißgrad stets nach der an die Inkubation mit Laccase und HBT anschließenden alkalischen Extraktion erzielt.

Die Helligkeiten  $L^*$ , die Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  sowie die Gelbwerte korrespondieren mit der Weißgradentwicklung. Nimmt der Weißgrad ab, so steigen die Farbkennzahlen  $a^*$  und  $b^*$  in Richtung Rot und Gelb, so dass sich die Vergilbung intensiviert. Umgekehrt steigt mit steigendem Weißgrad der Helligkeitswert  $L^*$ . Die Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  sowie die daraus resultierende Vergilbung gehen wieder zurück (Tab. 4.3.2). So sinkt nach Abschluss der Inkubationsphase mit *T. villosa*-Laccase und Mediator HBT bei pH 7 der Weißgrad im Vergleich zum Referenzwert von 39,4% ISO auf 39,1% ISO. Entsprechend ist die Helligkeit  $L^*$  der enzymatisch behandelten Probe mit 80,62 niedriger als die der unbehandelten Probe mit 80,70. Gleichzeitig fällt der Farbwert  $a^*$  durch die Laccase-Mediator-Behandlung mit 4,33 und der Farbwert  $b^*$  mit 21,71 gegenüber den Referenzwerten (4,23 bzw. 21,50) höher aus. Entsprechend steigt der Gelbwert von 45,7 ohne, auf 46,1 mit Laccase-Mediator-Behandlung. Durch die alkalische Extraktion wird der Weißgrad der Laccase-Mediator-behandelten Probe gegenüber 41,6% ISO des Referenzwertes auf 43,4% ISO angehoben. Parallel dazu steigt die Helligkeit  $L^*$  im Vergleich zu 82,24 auf 83,15. Gleichzeitig sinkt der Farbwert  $a^*$  gegenüber 3,91 auf 3,67 und der Farbwert  $b^*$  gegenüber 21,53 auf 21,01. Damit fällt der Gelbwert mit 43,4 niedriger aus als bei der ohne Laccase und Mediator behandelten Probe.

Nicht nur der Weißgrad des sauerstoffgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes kann damit bei allen getesteten pH-Werten nach Abschluss der alkalischen Extraktion erfolgreich mit dem LMS angehoben, sondern auch der Gelbstich des Ausgangsmaterials reduziert werden. Ohne Extraktionsstufe kommt es dagegen ähnlich wie bei den Versuchen mit AP oder DIP zu einer ungünstigen Weißgrad- und Farbortentwicklung. Für die *T. versicolor*-Laccase gilt dies nur bei pH 4,5. Bei den pH-Werten von 7 bis 8 findet dagegen eine geringfügige Verbesserung der Farbwerte statt.



**Abb. 4.3.3:** Einfluss verschiedener pH-Werte während der Inkubationsphase einer Laccase-Mediator-Behandlung auf die Entwicklung der Kappazahlen eines sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes. Inkubationsbedingungen: 0,5 MPa Sauerstoffdruck; 1% HBT; Aktivität: 1000 U/g (*T. villosa*- und *M. thermophila*-Laccase) bzw. 15 U/g (*T. versicolor*-Laccase). R=Referenz; LM=Inkubation mit Laccase und Mediator; E=alkalische Extraktion



**Abb. 4.3.4:** Einfluss verschiedener pH-Werte während der Inkubationsphase einer Laccase-Mediator-Behandlung auf die Entwicklung des Weißgrades eines sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes. Inkubationsbedingungen: 0,5 MPa Sauerstoffdruck; 1% HBT; Aktivität: 1000 U/g (*T. villosa*- und *M. thermophila*-Laccase) bzw. 15 U/g (*T. versicolor*-Laccase). R=Referenz; LM=Inkubation mit Laccase und Mediator; E=alkalische Extraktion

**Tab. 4.3.2:** Einfluss verschiedener pH-Werte während der Inkubationsphase einer Laccase-Mediator-Behandlung auf die Entwicklung der Farbwerte  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  und des Gelbwertes eines sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes. Inkubationsbedingungen: pH 4,5 - 8; Sauerstoffdruck: 0,5 MPa; HBT: 1%; Aktivität: 1000 U/g (*T. villosa*- und *M. thermophila*-Laccase) bzw. 15 U/g (*T. versicolor*-Laccase)

| Behandlung<br>[-]                                 | Aktivität<br>[U/g] | HBT<br>[%] | pH<br>[-] | $L^*$<br>[-] | $a^*$<br>[-] | $b^*$<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|---------------------------------------------------|--------------------|------------|-----------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| bei Verwendung von <i>T. villosa</i> -Laccase     |                    |            |           |              |              |              |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 81,25        | 4,22         | 20,97        | 44,5            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 4,5       | 80,84        | 4,60         | 21,43        | 45,8            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 82,86        | 3,88         | 20,89        | 43,5            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 4,5       | 85,12        | 3,26         | 18,82        | 38,6            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 80,70        | 4,23         | 21,50        | 45,7            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7         | 80,62        | 4,33         | 21,71        | 46,1            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 82,24        | 3,91         | 21,53        | 44,8            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7         | 83,15        | 3,67         | 21,01        | 43,4            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7,5       | 80,64        | 4,22         | 21,64        | 45,9            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7,5       | 80,49        | 4,35         | 22,01        | 46,7            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7,5       | 82,75        | 3,68         | 20,79        | 43,1            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7,5       | 83,10        | 3,63         | 20,79        | 43,0            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 8         | 80,54        | 4,11         | 21,48        | 45,6            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 8         | 80,59        | 4,13         | 21,38        | 45,4            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 8         | 81,60        | 3,86         | 21,28        | 44,6            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 8         | 82,12        | 3,70         | 20,96        | 43,7            |
| bei Verwendung von <i>M. thermophila</i> -Laccase |                    |            |           |              |              |              |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 81,01        | 4,37         | 21,32        | 45,4            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 4,5       | 78,35        | 5,47         | 23,62        | 51,4            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 82,67        | 4,03         | 21,30        | 44,3            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 4,5       | 83,57        | 3,88         | 20,75        | 42,9            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 80,70        | 4,23         | 21,50        | 45,7            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7         | 80,74        | 4,42         | 21,95        | 46,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 82,24        | 3,91         | 21,53        | 44,8            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7         | 82,94        | 3,81         | 21,08        | 43,7            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7,5       | 80,64        | 4,22         | 21,64        | 45,9            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7,5       | 80,47        | 4,47         | 22,25        | 47,2            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7,5       | 82,75        | 3,68         | 20,79        | 43,1            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7,5       | 83,54        | 3,66         | 20,88        | 43,0            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 8         | 80,54        | 4,11         | 21,48        | 45,6            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 8         | 80,46        | 4,39         | 21,95        | 46,7            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 8         | 81,60        | 3,86         | 21,28        | 44,6            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 8         | 82,70        | 3,83         | 21,22        | 44,0            |
| bei Verwendung von <i>T. versicolor</i> -Laccase  |                    |            |           |              |              |              |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 80,88        | 4,42         | 21,59        | 45,9            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 4,5       | 78,55        | 5,51         | 22,92        | 50,2            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 82,68        | 3,97         | 21,27        | 44,2            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 4,5       | 84,86        | 3,35         | 19,43        | 39,8            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 80,70        | 4,23         | 21,50        | 45,7            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 7         | 81,00        | 4,21         | 21,37        | 45,3            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 82,24        | 3,91         | 21,53        | 44,8            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 7         | 82,61        | 3,76         | 21,24        | 44,0            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7,5       | 80,64        | 4,22         | 21,64        | 45,9            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 7,5       | 80,85        | 4,20         | 21,65        | 45,8            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7,5       | 82,75        | 3,68         | 20,79        | 43,1            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 7,5       | 83,24        | 3,60         | 20,64        | 42,7            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 8         | 80,54        | 4,11         | 21,48        | 45,6            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 8         | 80,85        | 4,07         | 21,41        | 45,3            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 8         | 81,60        | 3,86         | 21,28        | 44,6            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 8         | 82,53        | 3,73         | 20,97        | 43,6            |

#### 4.3.1.2.2 Einfluss der Sauerstoffversorgung während der Inkubationsphase auf die Funktionstüchtigkeit des LMS

Zur Untersuchung des Einflusses der Versorgung des LMS mit dem Co-Substrat Sauerstoff während der Inkubationsphase auf die Funktionstüchtigkeit des LMS werden in Anlehnung an die bisher gezeigten Versuche, die bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck und pH-Werten von 4,5 und 7 im Bleichautoklaven durchgeführt wurden, vergleichbare Tests in offenen Temperiergefäßen bei Luftatmosphäre vollzogen. Die Ergebnisse beider Versuchsvarianten werden in den Abb. 4.3.5 und 4.3.6 sowie in Tab. 4.3.3 gegenübergestellt.

Betrachtet man zunächst nur die Kappazahlen, sieht man, dass auch bei Luftatmosphäre bei beiden pH-Werten der Delignifizierungseffekt des LMS vorhanden ist (Abb. 4.3.5). Am deutlichsten ist dies bei pH 4,5 zu erkennen. Hier sinkt die Kappazahl bereits nach Abschluss der Inkubationsphase mit Ausnahme der *M. thermophila*-Laccase ab. So liegt bei Einsatz von *T. villosa*-Laccase die Kappazahl von 6,7 um 1,2 Einheiten niedriger als der entsprechende Referenzwert, bei Einsatz von *T. versicolor*-Laccase beträgt die Differenz 0,9 Kappazahlen. Bei pH 7 unterscheiden sich die Kappazahlen der ohne bzw. mit Laccase und Mediator inkubierten Proben mit 0,1 Kappazahlen nicht mehr. Das volle Ausmaß der Delignifizierung zeigt sich nach Abschluss der alkalischen Extraktion. Die Kappazahlen der unter Luftatmosphäre und pH 4,5 mit Laccase und HBT inkubierten Proben fallen nun um 2,3 (bei Verwendung von *T. villosa*-Laccase) bis 1 Einheiten (bei Verwendung von *M. thermophila*-Laccase) niedriger aus als die entsprechenden Referenzwerte. Viel geringer ist der Unterschied bei pH 7 und Luftatmosphäre. Bei Verwendung der *T. villosa*-Laccase beträgt die Differenz 0,7, im Falle der *M. thermophila*- bzw. *T. versicolor*-Laccase nur 0,2 Kappazahlen.

Beim Vergleich der bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck und Luftatmosphäre durchgeführten Ergebnisse zeigt sich, dass im Rahmen der angewandten Inkubationsbedingungen der pH-Wert für das Ausmaß der Delignifizierung wichtiger ist als die Sauerstoffversorgung. Denn unabhängig vom Laccase-Typ werden sowohl unter 0,5 MPa Sauerstoffdruck als auch unter Luftatmosphäre im sauren pH-Bereich die niedrigsten Kappazahlen erzielt. Beispielsweise werden bei Verwendung von *T. villosa*-Laccase und HBT bei pH 4,5 mit und ohne zusätzlichem Sauerstoffdruck Kappazahlen von 5,3 bzw. 4,9 erreicht. Die entsprechenden Kappazahlen bei pH 7 liegen dagegen bei 6,4.

Die Sauerstoffversorgung hat in zweierlei Hinsicht Einfluss auf die Weißgradentwicklung (Abb. 4.3.6).

Zum einen führt die Inkubation mit Laccase und Mediator bei Luftatmosphäre zu einem größeren Weißgradabfall als die Inkubation bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck. So liegt bei pH 4,5 der Weißgrad der bei 0,5 MPa O<sub>2</sub> mit z.B. *T. villosa*-Laccase und HBT inkubierten Probe mit 39,6% ISO gerade 1% ISO niedriger als der Referenzwert von 40,6% ISO. Dagegen beträgt der entsprechende Weißgradunterschied bei Luftatmosphäre 6,9 % ISO. Diese Entwicklung ist ebenso bei pH 7 zu beobachten. Während der Weißgrad bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck lediglich um 0,3% ISO niedriger liegt als der Referenzwert von 39,4% ISO, nimmt die bei Luftatmosphäre mit *T. villosa*-Laccase und HBT inkubierte Probe gegenüber dem Referenzwert um 2,9% ISO ab.

Zum anderen hat die Sauerstoffversorgung bei pH 4,5 einen deutlichen Einfluss auf den erzielbaren Weißgrad der enzymatisch behandelten Proben nach alkalischer Extraktion. Bei diesem pH-Wert wird bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck der höchste Weißgrad innerhalb der Versuchsreihen erzielt. Dieser liegt beispielsweise bei Verwendung von *T. villosa*-Laccase und HBT bei 48,2% ISO und übertrifft den Referenzwert um 5,2% ISO. Nur noch 1,9% ISO höher liegt dagegen der Weißgrad der mit Enzym und Mediator behandelten Probe von 43,4% ISO bei Luftatmosphäre. Bei pH 7 ist dagegen kein Einfluss der Sauerstoffversorgung auf den Weißgrad der enzymatisch behandelten Proben nach alkalischer Extraktion zu erkennen, der nun bei hoher wie niedriger Sauerstoffversorgung auf vergleichbarem Niveau liegt. Im Fall der *T. villosa*-Laccase sind dies 43,4% ISO.

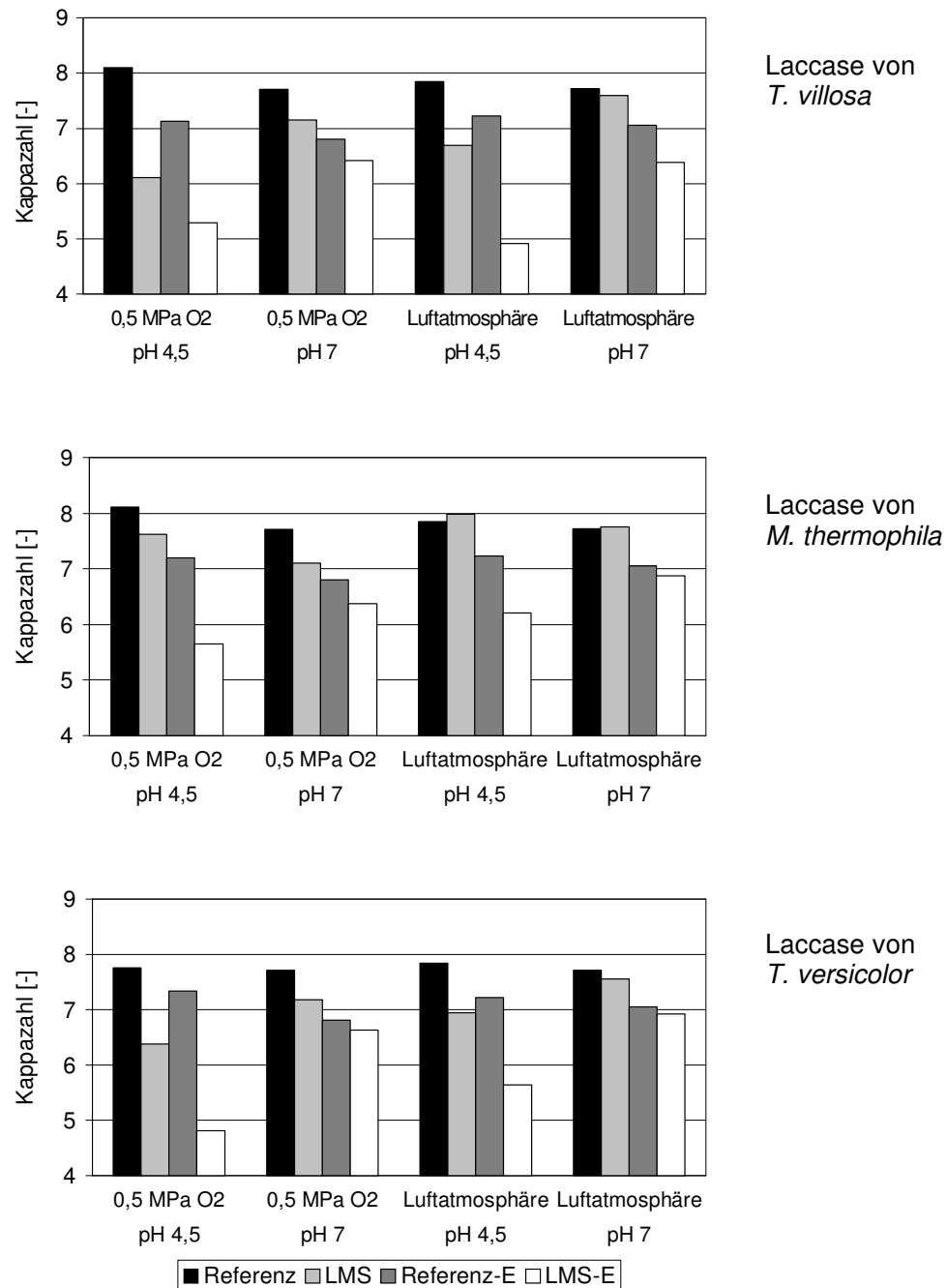
Die Inkubation bei höherem Sauerstoffgehalt war beim pH-Wert 4,5 vermutlich deshalb für das Erreichen höherer Weißgrade nach alkalischer Extraktion wichtig, weil die Laccasen im leicht sauren Milieu aktiver sind und dadurch mehr Sauerstoff pro Zeiteinheit umsetzen. Bei ungenügender Sauerstoffversorgung wird dadurch im sauren pH-Bereich rasch ein Stadium erreicht, in dem kein Sauerstoff mehr als Co-Substrat für die Laccase und damit für die zu katalysierende LMS-Reaktion zur Verfügung steht. Der bei Luftatmosphäre höher ausfallende Weißgradabfall der enzymatisch behandelten Proben nach Abschluss der Inkubationsphase vor Durchführung der alkalischen Extraktion könnte ein Hinweis darauf sein, dass abhängig von der Sauerstoffversorgung im LMS verschiedene Reaktionen ablaufen können. Bei den später noch zu beschreibenden Versuchen mit Holzschliff und TMP wird diese Beobachtung allerdings nicht bestätigt. Eine vertiefende Beschäftigung mit dieser Frage war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Die Kennzahlen des CIELab-Farbsystems und der Gelbwert entwickeln sich wieder entsprechend den Weißgraden. Nimmt der Weißgrad nach der Inkubation mit Laccase und Mediator ab, so sinkt auch die Helligkeit L\* und die Farbwerte a\* und b\*

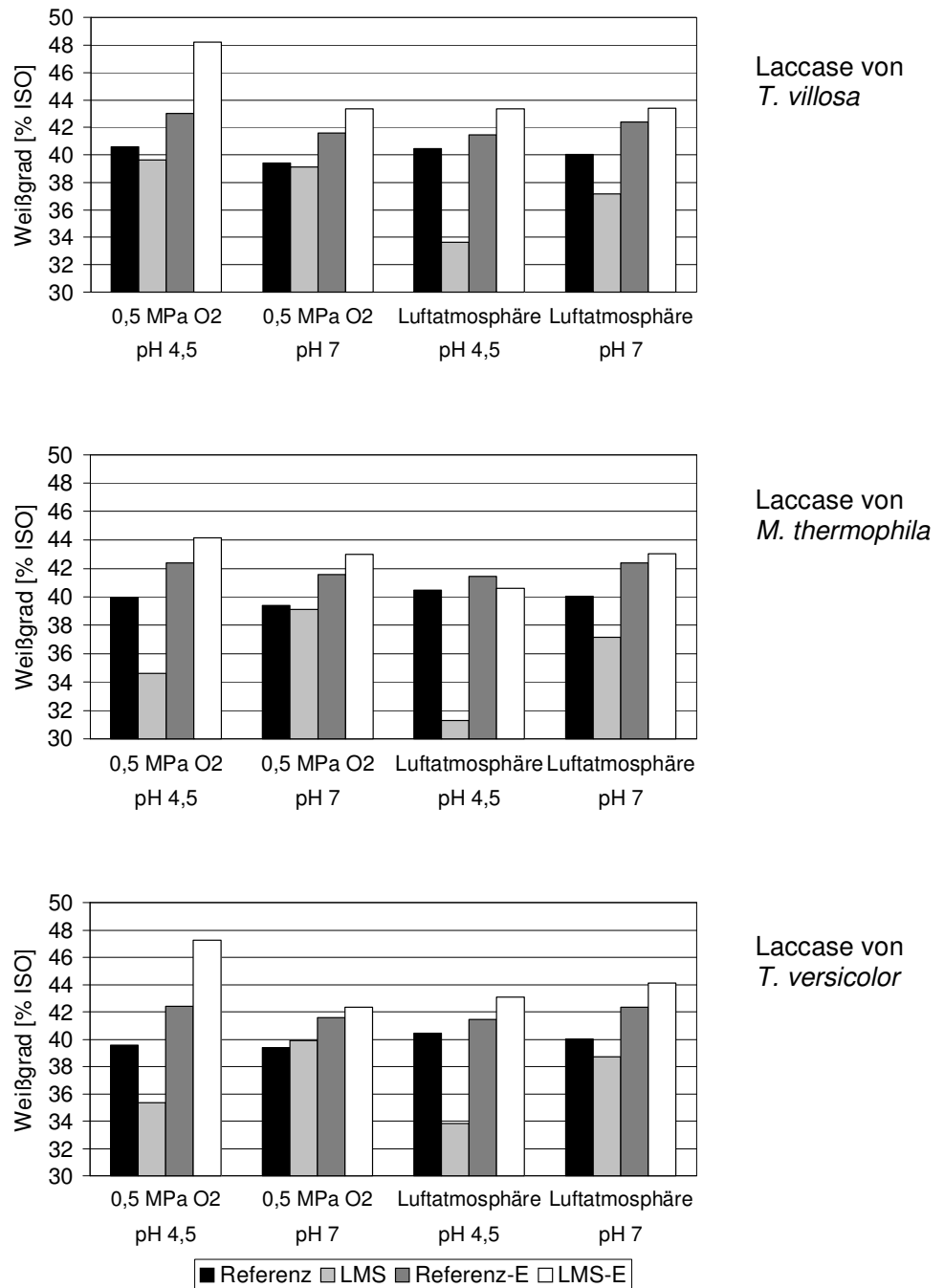
bewegen sich Richtung Rot und Gelb, so dass der Gelbwert ansteigt. Nimmt dagegen mit dem Weißgrad die Helligkeit  $L^*$  zu, fallen die Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  ab, so dass das Ausmaß der Vergilbung zurückgeht. Diese Dynamik wurde bereits in den vorhergegangenen Kapiteln beschrieben und bedarf keiner wiederholenden Darstellung. Für den Interessierten werden die entsprechenden Daten in Tab. 4.3.3 wiedergegeben.

Wesentlich für das Arbeiten mit AP und DIP ist, dass auch bei pH 7 und Luftatmosphäre ein - wenn auch eingeschränkt - funktionsfähiges Laccase-Mediator-System vorliegt. Für einen Weißgradgewinn ist eine Entfernung des in der Inkubationsphase modifizierten Lignins eine wesentliche Voraussetzung.

Vergleicht man die Ergebnisse der Versuche, die bei Luftatmosphäre durchgeführt wurden, mit denen von AP und DIP, so kann man bereits hier gut erkennen, dass die bei AP und DIP nach Inkubation beobachtete Vergrauung und Vergilbung in erster Linie beim Angriff des Lignins durch Laccase und Mediator zu Stande gekommen ist. Noch nicht erklärt werden kann, warum die Vergilbung des DIP nach der Bleiche bzw. nach der alkalischen Extraktion bestehen bleibt.



**Abb. 4.3.5:** Einfluss der Sauerstoffversorgung während der Inkubationsphase einer Laccase-Mediator-Behandlung auf die Entwicklung der Kappazahlen eines sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes. Inkubationsbedingungen: pH 4,5 und 7; Sauerstoffdruck: 0,5 MPa und Luftatmosphäre; HBT: 1%; Aktivität: 1000 U/g (*T. villosa*- und *M. thermophila*-Laccase) bzw. 15 U/g (*T. versicolor*-Laccase). LM = nach Inkubation mit Laccase und Mediator; LM-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; Referenz und Referenz-E = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase und Mediator



**Abb. 4.3.6:** Einfluss der Sauerstoffversorgung während der Inkubationsphase einer Laccase-Mediator-Behandlung auf die Entwicklung der Weißgrade eines sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes. Inkubationsbedingungen: pH 4,5 und 7; Sauerstoffdruck: 0,5 MPa und Luftatmosphäre; HBT: 1%; Aktivität: 1000 U/g (*T. villosa*- und *M. thermophila*-Laccase) bzw. 15 U/g (*T. versicolor*-Laccase). LM = nach Inkubation mit Laccase und Mediator; LM-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; Referenz und Referenz-E = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase und Mediator

**Tab. 4.3.3:** Einfluss der Sauerstoffversorgung während der Inkubationsphase einer Laccase-Mediator-Behandlung auf die Entwicklung der Farbwerte  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  und des Gelbwertes eines sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes. Inkubationsbedingungen: pH 4,5 und 7; Sauerstoffdruck: 0,5 MPa und Luftatmosphäre; HBT: 1%; Aktivität: 1000 U/g (*T. villosa*- und *M. thermophila*-Laccase) bzw. 15 U/g (*T. versicolor*-Laccase). LM = nach Inkubation mit Laccase und Mediator; LM-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; Referenz und Referenz-E = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase und Mediator

| Behandlung<br>[-]                                 | Aktivität<br>[U/g] | HBT<br>[%] | pH <sup>a</sup><br>[-] | O <sub>2</sub> <sup>a</sup><br>[MPa] | L*<br>[-] | a*<br>[-] | b*<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|---------------------------------------------------|--------------------|------------|------------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| bei Verwendung von <i>T. villosa</i> -Laccase     |                    |            |                        |                                      |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 81,25     | 4,22      | 20,97     | 44,5            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 80,84     | 4,60      | 21,43     | 45,8            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 82,86     | 3,88      | 20,89     | 43,5            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 85,12     | 3,26      | 18,82     | 38,6            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 80,70     | 4,23      | 21,50     | 45,7            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 7                      | 0,5                                  | 80,62     | 4,33      | 21,71     | 46,1            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 82,24     | 3,91      | 21,53     | 44,8            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 7                      | 0,5                                  | 83,15     | 3,67      | 21,01     | 43,4            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 81,32     | 4,27      | 21,22     | 44,9            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 76,91     | 6,15      | 22,38     | 50,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 82,20     | 4,10      | 21,59     | 45,1            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 82,87     | 3,91      | 20,40     | 42,7            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 80,93     | 4,25      | 21,06     | 44,9            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 78,97     | 4,84      | 21,30     | 46,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 82,70     | 3,89      | 21,38     | 44,3            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 83,21     | 3,85      | 21,08     | 43,6            |
| bei Verwendung von <i>M. thermophila</i> -Laccase |                    |            |                        |                                      |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 81,01     | 4,37      | 21,32     | 45,4            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 78,35     | 5,47      | 23,62     | 51,4            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 82,67     | 4,03      | 21,30     | 44,3            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 83,57     | 3,88      | 20,75     | 42,9            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 80,70     | 4,23      | 21,50     | 45,7            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 7                      | 0,5                                  | 80,74     | 4,42      | 21,95     | 46,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 82,24     | 3,91      | 21,53     | 44,8            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 7                      | 0,5                                  | 82,94     | 3,81      | 21,08     | 43,7            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 81,32     | 4,27      | 21,22     | 44,9            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 75,02     | 6,33      | 22,33     | 51,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 82,20     | 4,10      | 21,59     | 45,1            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 81,75     | 4,41      | 21,81     | 45,9            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 80,93     | 4,25      | 21,06     | 44,9            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 79,01     | 4,87      | 21,33     | 46,7            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 82,70     | 3,89      | 21,38     | 44,3            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 82,89     | 3,92      | 20,94     | 43,5            |
| bei Verwendung von <i>T. versicolor</i> -Laccase  |                    |            |                        |                                      |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 80,88     | 4,42      | 21,59     | 45,9            |
| LMS                                               | 15                 | 2          | 4,5                    | 0,5                                  | 78,55     | 5,51      | 22,92     | 50,2            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 82,68     | 3,97      | 21,27     | 44,2            |
| LMS-E                                             | 15                 | 2          | 4,5                    | 0,5                                  | 84,86     | 3,35      | 19,43     | 39,8            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 80,70     | 4,23      | 21,50     | 45,7            |
| LMS                                               | 15                 | 2          | 7                      | 0,5                                  | 81,00     | 4,21      | 21,37     | 45,3            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 82,24     | 3,91      | 21,53     | 44,8            |
| LMS-E                                             | 15                 | 2          | 7                      | 0,5                                  | 82,61     | 3,76      | 21,24     | 44,0            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 81,32     | 4,27      | 21,22     | 44,9            |
| LMS                                               | 15                 | 2          | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 76,81     | 5,86      | 21,87     | 49,5            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 82,20     | 4,10      | 21,59     | 45,1            |
| LMS-E                                             | 15                 | 2          | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 82,90     | 3,97      | 20,76     | 43,3            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 80,93     | 4,25      | 21,06     | 44,9            |
| LMS                                               | 15                 | 2          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 80,54     | 4,39      | 22,05     | 46,8            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 82,70     | 3,89      | 21,38     | 44,3            |
| LMS-E                                             | 15                 | 2          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 83,45     | 3,68      | 20,64     | 42,6            |

<sup>a</sup> während der Inkubationsphase

<sup>b</sup> 0,1 MPa = Luftatmosphäre

#### 4.3.1.3 Behandlung von Zellstoff mit Laccase ohne Mediator

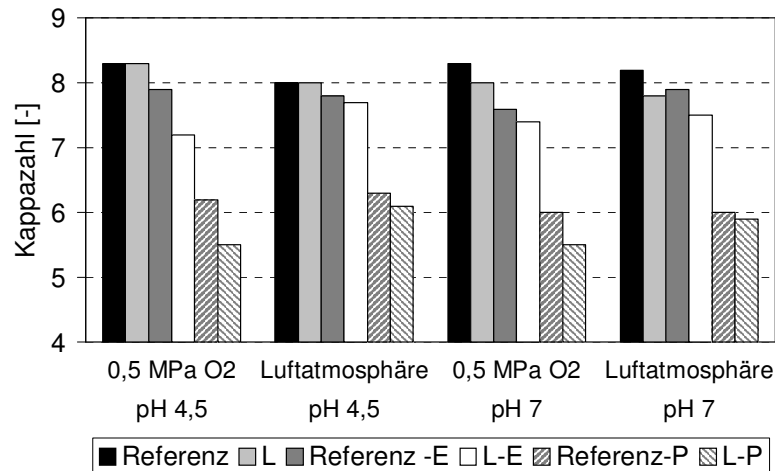
Bei Inkubation von Altpapier und DIP mit Laccase alleine werden ähnliche Verfärbungsreaktionen beobachtet wie beim Einsatz von Laccase und Mediator HBT (vergl. Kap. 4.2). Daher werden nun mit dem Nadelholz-Sulfatzellstoff analog zu den Versuchen mit dem LMS Versuche mit Laccase ohne Mediatorzusatz durchgeführt.

Der Zellstoff wird wie bisher bei pH-Werten von 4,5 und 7 sowie bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck bzw. Luftatmosphäre inkubiert und anschließend alkalisch extrahiert. Zusätzlich wird er alternativ zur alkalischen Extraktion einer Peroxidbleiche unterzogen. Aus Zeitgründen werden die Versuche nur mit *T. villosa*-Laccase und zwar zu 1000 U/g otro Zellstoff durchgeführt.

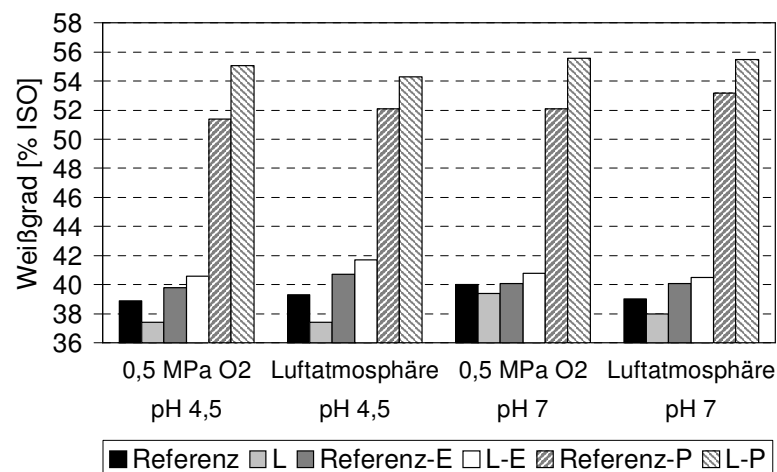
Auch bei alleinigem Einsatz von Laccase kann im Vergleich zur enzymfreien Referenz mehr Lignin abgebaut werden. Der Trend ist unabhängig vom pH-Wert oder der Sauerstoffversorgung bei jeder Versuchsreihe in Abb. 4.3.7 zu beobachten. Dabei ist die durch Laccase erhöhte Intensität der Delignifizierung begrenzt. So liegen die Kappazahlen direkt nach Abschluss der Inkubationsphase nur bei den bei pH 7 enzymatisch behandelten Proben um Kappa 0,3 bis 0,4 niedriger als die Referenzwerte von 8,3 bzw. 8,2. Im Fall der bei pH 4,5 inkubierten Proben liegen die enzymatisch- und Laccase-frei behandelten Stoffe auf gleich hohem Niveau. Im Fall der alkalisch extrahierten bzw. peroxidgebleichten Proben liegen die Kappazahlen der Laccase-behandelten Proben im Vergleich zu den Referenzproben dann durchweg auf leicht niedrigerem Niveau, so dass man von einem Trend Laccase-unterstützter Delignifizierung sprechen kann. Die Kappazahl-Differenzen sind durchweg gering und schwanken zwischen Kappa 0,7 (nach alkalischer Extraktion von bei pH 4,5 und Luftatmosphäre inkubertem Stoff) und 0,1 (nach Peroxidbleiche von bei pH 7 und Luftatmosphäre inkubertem Stoff).

Den wesentlichen Einfluss auf die Delignifizierung besitzt in Abb. 4.3.7 wie im Fall des LMS die Art der chemisch-mechanischen Behandlung. Während die Kappazahlen nach Inkubation 8 bis 8,3 betragen, liegen sie nach alkalischer Extraktion zwischen 7 und 8. Die alternativ zur alkalischen Extraktion durchgeführte Peroxidbleiche bewirkt mit Kappazahlen zwischen 5,5 und 6,3 den größten Ligninabbau.

Die größte Bedeutung hat die Peroxidbleiche für den erzielbaren Weißgrad (Abb. 4.3.8), der 10% ISO über den Weißgraden der inkubierten bzw. alkalisch extrahierten Proben liegt. Deutlicher wie bei den Kappazahlen kommt hier auch der Einfluss der Laccasebehandlung zum Vorschein.



**Abb. 4.3.7:** Einfluss unterschiedlicher Inkubationsbedingungen bei einer Behandlung von sauerstoffvorgebleichtem Nadelholz-Sulfatzellstoff mit *T. villosa*-Laccase auf die Kappazahlentwicklung. L = nach Inkubation mit Laccase; L-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; L-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase



**Abb. 4.3.8:** Einfluss unterschiedlicher Inkubationsbedingungen bei einer Behandlung von sauerstoffvorgebleichtem Nadelholz-Sulfatzellstoff mit *T. villosa*-Laccase auf die Entwicklung der Weißgrade. L = nach Inkubation mit Laccase; L-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; L-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase

In allen Fällen kommt es durch die Inkubation mit Laccase zu einem Weißgradabfall, der im Vergleich zum Referenzwert mit 1,5% ISO bis 1,9% ISO Unterschied bei pH 4,5 deutlicher ausgeprägt ist als bei pH 7 mit 0,6% ISO bis 1% ISO. Der Laccasebedingte zusätzliche Weißgradgewinn nach alkalischer Extraktion bewegt sich dann

mit 0,8% ISO bis 1% ISO für pH 4,5 und 0,7% ISO bis 0,4% ISO bei pH 7 in einem begrenzten Rahmen. Die Weißgrade der peroxidgebleichten Proben werden durch die zuvor erfolgte Inkubation mit Laccase vergleichsweise deutlich um 3,7% ISO bis 2,2% ISO verbessert. Dabei scheinen unabhängig vom pH-Wert die bei 0,5 MPa O<sub>2</sub> inkubierten Proben mit 3,7% ISO (bei pH 4,5) bzw. 3,5% ISO (bei pH 7) günstiger abzuschneiden als die bei Luftatmosphäre inkubierten Proben, die lediglich um 2,2% ISO (bei pH 4,5) bzw. 2,3% ISO (bei pH 7) besser ausfallen als die Referenzwerte. Doch unterscheiden sich die Weißgrade der Referenzwerte nach Peroxidbleiche mit 51,4% ISO bis 53,2% ISO relativ stark, so dass eine sichere Aussage bezüglich der Weißgradentwicklung abhängig von der Sauerstoffversorgung nicht abgegeben werden kann.

Mit dem Weißgradabfall nach Inkubation kommt es wie bisher zu einem Abfall der Helligkeit L\* und einer Zunahme des Farbwertes a\* (Tab. 4.3.4). So sinkt L\* nach Inkubation bei Luftatmosphäre und pH 7 von 80,67 um 1,13 Einheiten. Dabei verschiebt sich a\* von 4,41 auf 4,62. weiter in den roten Farbbereich hinein. Anders wie beim LMS nimmt der Farbwert b\* nicht zu, sondern ab. Er sinkt beispielsweise bei pH 7 und Luftatmosphäre von 21,99 auf 21,23. Entsprechend der gegensätzlichen Entwicklung der Farbwerte a\* und b\* fällt der resultierende Gelbwert uneinheitlich aus. Bei pH 4,5 und 0,5 MPa Sauerstoffdruck ist der Gelbwert der enzymfreien und der mit Laccase inkubierten Probe mit 46,1 bzw. 46,0 gleich hoch, bei pH 4,5 und Luftatmosphäre ist der Gelbwert der enzymatischen behandelten Probe um 0,5 Einheiten höher, doch im Gegensatz zur Inkubation der Faserstoffe mit dem LMS übertrifft der Referenzwert den Gelbwert der mit Laccase behandelten Probe im Fall der neutral behandelten Stoffe um 0,4 bis 0,6 Einheiten.

Einheitlich und unabhängig von der jeweiligen Inkubationsvariante entwickeln sich dagegen diese Werte nach Durchführung der alkalischen Extraktion bzw. der Peroxidbleiche. Entsprechend der Weißgradzunahme steigt die Helligkeit L\* und die Farbwerte a\* und b\* sowie der Gelbwert gehen zurück. Die enzymatische Variante erzielt dabei in allen Fällen höhere Helligkeiten L\* und niedrigere a\*-, b\* -und Gelbwerte, was zu einer zusätzlichen farblichen Verbesserung der Proben führt (Tab. 4.3.4). Dabei führt die Peroxidbleiche erwartungsgemäß zu den günstigsten Werten. Nach der Inkubation des Zellstoffes bei pH 7 und Luftatmosphäre steigt beispielsweise nach alkalischer Extraktion die Helligkeit L\* von 81,44 auf 81,70. a\* sinkt von 4,22 auf 4,28 und b\* von 21,98 auf 21,88. Die Vergilbung sinkt von 46,1 auf 45,9. Mit der Peroxidbleiche kommt es dann auf Grund des Bleicheffektes zu einer deutlichen farblichen Verbesserung der Proben, die für die laccasebehandelten Stoffe wiederum besser ausfällt als für die Referenzwerte. So liegen für das genannte Beispiel im Fall der Referenz L\* bei 88,25, a\* bei 2,13 und b\* bei 19,16.

Die Helligkeit der enzymatisch behandelten Probe übertrifft mit  $L^*=89,17$  diesen Wert. Der Farbwert  $a^*$  wird auf 1,75 und  $b^*$  auf 18,36 reduziert.

Die mediatorfreien Behandlungen des sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffs führen also insgesamt zu ähnlichen Ergebnissen wie die Behandlungen mit Mediator. Im Vergleich zur LMS-Behandlung kann bei dieser Messreihe jedoch keine klare Abhängigkeit der Ergebnisse von den Inkubationsbedingungen beobachtet werden. Der verwendete vorgebleichte Nadelholz-Sulfatzellstoff erweist sich nach abgeschlossener Extraktion bzw. Peroxidbleichstufe bei Verwendung von Laccase alleine als delignifizierbar, bleichbar und farblich verbesserbar.

Wesentlich für die Interpretation der Ergebnisse mit AP und DIP ist, dass Laccase alleine mit dem LMS vergleichbare Effekte bezüglich Kappazahl, Weißgrad und Farbort erzielen kann. Diese Effekte werden im sauren wie im neutralen pH-Bereich unabhängig von der Sauerstoffversorgung erreicht. Erst die Entfernung des Lignins mit Hilfe einer alkalischen Extraktion und noch besser mit Hilfe einer Peroxidbleiche führt zu Weißgrad- und Farbortverbesserungen.

**Tab. 4.3.4:**  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ - und Gelbwerte eines sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes nach *T. villosa*-Laccase-Behandlung (L) im Bleichautoklaven bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck bzw. im offenen Temperiergefäß bei Luftatmosphäre bei pH-Werten von 4,5 und 7 sowie nach anschließender alkalischer Extraktion (E) bzw. Peroxidbleiche (P)

| Behandlung<br>[-] | Aktivität<br>[U/g] | pH <sup>a</sup><br>[-] | O <sub>2</sub> <sup>a</sup><br>[MPa] | L*    | a*   | b*    | Gelbwert |
|-------------------|--------------------|------------------------|--------------------------------------|-------|------|-------|----------|
| Referenz          | 0                  | 4,5                    | 0,5                                  | 80,35 | 4,43 | 21,57 | 46,1     |
| L                 | 1000               | 4,5                    | 0,5                                  | 79,02 | 4,88 | 21,00 | 46,0     |
| Referenz-E        | 0                  | 4,5                    | 0,5                                  | 81,24 | 4,32 | 21,91 | 46,2     |
| L-E               | 1000               | 4,5                    | 0,5                                  | 81,57 | 4,20 | 21,51 | 45,3     |
| Referenz-P        | 0                  | 4,5                    | 0,5                                  | 87,39 | 2,43 | 19,46 | 38,2     |
| L-P               | 1000               | 4,5                    | 0,5                                  | 88,92 | 1,84 | 18,36 | 35,4     |
| Referenz          | 0                  | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 80,67 | 4,37 | 21,58 | 45,9     |
| L                 | 1000               | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 79,16 | 4,76 | 21,28 | 46,4     |
| Referenz-E        | 0                  | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 81,72 | 4,21 | 21,72 | 45,5     |
| L-E               | 1000               | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 82,08 | 4,06 | 21,08 | 44,2     |
| Referenz-P        | 0                  | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 87,86 | 2,34 | 19,62 | 38,2     |
| L-P               | 1000               | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 88,78 | 2,01 | 18,98 | 36,6     |
| Referenz          | 0                  | 7                      | 0,5                                  | 81,05 | 4,10 | 21,32 | 45,0     |
| L                 | 1000               | 7                      | 0,5                                  | 80,22 | 4,44 | 20,66 | 44,6     |
| Referenz-E        | 0                  | 7                      | 0,5                                  | 81,45 | 4,20 | 21,94 | 46,0     |
| L-E               | 1000               | 7                      | 0,5                                  | 81,78 | 4,18 | 21,74 | 45,5     |
| Referenz-P        | 0                  | 7                      | 0,5                                  | 87,57 | 2,20 | 19,04 | 37,2     |
| L-P               | 1000               | 7                      | 0,5                                  | 89,11 | 1,77 | 18,24 | 35,1     |
| Referenz          | 0                  | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 80,67 | 4,41 | 21,99 | 46,6     |
| L                 | 1000               | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 79,54 | 4,62 | 21,23 | 46,0     |
| Referenz-E        | 0                  | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 81,44 | 4,22 | 21,98 | 46,1     |
| L-E               | 1000               | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 81,70 | 4,28 | 21,88 | 45,9     |
| Referenz-P        | 0                  | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 88,25 | 2,13 | 19,16 | 37,1     |
| L-P               | 1000               | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 89,17 | 1,75 | 18,36 | 35,2     |

<sup>a</sup> während der Inkubationsphase

<sup>b</sup> 0,1 MPa = Luftatmosphäre

#### 4.3.1.4 Unterschiede beim Einsatz von Laccase mit und ohne Mediator

Bisher wurden der Einsatz von Laccase und der Einsatz von Laccase und Mediator getrennt voneinander untersucht. Unterschiede zwischen diesen beiden Behandlungsvarianten wurden noch nicht gezielt herausgearbeitet.

In der Literatur zur Laccase-unterstützten Zellstoffbleiche wird in fast allen Arbeiten erst mit Anwesenheit des Mediators eine Delignifizierung beschrieben. Eigene Versuche mit AP und DIP zeigten bereits, dass auch der Effekt des Mediators messbar ist. Es wurde daher erwartet, dass die Versuche mit Laccase und dem Nadelholz-Sulfatzellstoff in Abhängigkeit vom Mediatoreinsatz zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Deutliche Differenzen sind jedoch bisher nicht vorhanden.

Ein direkter quantitativer Vergleich der vorhandenen Daten zum Nadelholz-Sulfatzellstoff ist problematisch, da die Zahlen aus den Versuchen ohne und mit Mediatorzugabe in verschiedenen Versuchsdurchläufen mit unterschiedlichen Zellstoffchargen gewonnen werden. Vor allem bei Benutzung des Bleichautoklaven ist dabei die Einhaltung exakter Reaktionszeiten schwierig. Zwar wird die Dauer, in der sich die vier Temperiergefäße im beheizten Ölbad befinden, genau eingehalten, doch unterscheiden sich vor allem die Rüstzeiten für den Einbau der Gefäße, wenn sie sich nach Aufbringen des Sauerstoffdrucks nicht als gasdicht erweisen. Dann werden schnell aus 35 Minuten Rüstzeit 50 Minuten. Da der Stoff Raumtemperatur besitzt, laufen bereits in dieser Zeit enzymatische Reaktionen ab. Die effektive Reaktionszeit zwischen den verschiedenen Versuchsreihen fällt damit trotz sorgfältigen Arbeitens unterschiedlich aus. Damit wird ein Informationsverlust denkbar, wenn die Ergebnisse von Proben aus verschiedenen Chargen verglichen werden. Es soll daher noch einmal versucht werden, in einer zusätzlichen Messreihe Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsweisen herauszuarbeiten.

Um exakt vergleichbare Ergebnisse nach einer Laccase- und einer Laccase-Mediator-Behandlung unter gleichen Rahmenbedingungen bezüglich Zellstoff, Reaktionszeit, pH-Wert, Temperatur und Sauerstoffversorgung zu erhalten, werden jeweils vier Proben (eine Probe ohne Laccase und ohne Mediator, eine Probe mit Laccase, eine Probe mit Mediator und eine Probe mit Laccase und Mediator) zeitgleich inkubiert und anschließend alkalisch extrahiert bzw. mit Peroxid gebleicht. Die Versuche werden unter den optimalen Bedingungen des LMS (pH 4,5 und 0,5 MPa Sauerstoffdruck) sowie unter den Bedingungen des Neutraldeinkings (pH 7 und Luftatmosphäre) durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Tab. 4.3.5 wiedergegeben. Hier sind nun abhängig von der Anwesenheit des Mediators gewisse Unterschiede vorhanden.

Für beide Vorgehensweisen werden Ergebnisse erzielt, die denen der vorhergegangenen Versuche entsprechen. Dabei zeigt sich unter optimalen Bedingungen (pH 4,5; 0,5 MPa O<sub>2</sub>) die Überlegenheit des LMS. So vermögen Laccase und Mediator die Kappazahl des Zellstoffs unter Optimalbedingungen bereits von Kappa 8 auf Kappa 6,4 zu reduzieren, während die Laccase alleine den Ligninanteil nahezu unverändert belässt. Nach erfolgter Extraktionsstufe, ebenso nach der Peroxidbleiche, wird deutlich, dass auch die Laccase alleine den Ligninanteil anzugreifen vermag, allerdings in abgeschwächtem Ausmaß. Die Differenzen im Ligningehalt liegen am höchsten, wenn mit Mediatorzusatz und unter Optimalbedingungen (pH 4,5) gearbeitet wird. Unter Deinking-Bedingungen (pH 7, Luftatmosphäre) gleichen sich die Kappazahlen der mit und ohne Mediatorzusatz inkubierten Proben an.

Die nach beiden Vorgehensweisen inkubierten Sulfatzellstoffe büßen im Vergleich zur Referenz wieder an Weißgrad ein. Sowohl unter optimalen Bedingungen (pH 4,5; 0,5 MPa O<sub>2</sub>) als auch bei pH 7 unter Atmosphärendruck ist das Ausmaß der Weißgradreduzierung um ca. 3 Punkte unabhängig vom Mediatorzusatz zunächst gleich hoch. Die Ergebnisse der vergleichenden Weißgradmessungen nach erfolgter Extraktion sind von den Bedingungen der Enzymbehandlung abhängig. Unter Optimalbedingungen wird mit und ohne Mediatorzusatz ein deutlicher Anstieg im Weißgrad erzielt, wobei die höchsten Werte das LMS verzeichnet. Nach Inkubation bei pH 7 tritt unabhängig vom Mediatorzusatz kein Bleicheffekt ein. Erst die Weißgradmessung nach erfolgter Peroxidstufe verdeutlicht, dass auch eine Laccasebehandlung ohne Mediatorzusatz den Weißgrad des Sulfatzellstoffs von 52% ISO auf 56% ISO (pH 4,5) oder 55% ISO (pH 7) ansteigen lässt. Unter Optimalbedingungen schnellte der Weißgrad bei Mediatorzugabe auf 66% ISO (pH 4,5), während er nach Inkubation bei pH 7 bei 55% ISO verbleibt. Auch dies belegt die Wirksamkeit des Mediators bei saurer Fahrweise.

Die Veränderungen der Farbkennzahlen L\*, a\*, b\*, die bei pH 4,5 und 0,5 MPa Sauerstoffdruck bzw. bei pH 7 und Luftatmosphäre beobachtet werden können, zeigen die gleichen Tendenzen. Je nach dem, ob Laccase mit oder ohne Mediator eingesetzt wird, unterscheiden sich jedoch die Messreihen bezüglich der Entwicklung des Farbwertes b\*.

Nach Abschluss der Inkubationsphase nehmen beim Einsatz von Laccase alleine ähnlich wie in Kap. 4.3.1.3 wieder die Helligkeit L\* und der Farbwert b\* ab, so dass beispielsweise bei pH 7 L\* von 80,50 auf 78,91 oder b\* von 21,66 auf 21,46 sinkt. Nur der Farbwert a\* wird tiefer in den roten Farbbereich verschoben und steigt von 4,31 auf 4,77 an. Diesmal sind die Farbortverschiebungen bei beiden pH-Werten ausreichend intensiv, um für die Laccase-behandelten Proben um 1,2 bzw. 0,7

Einheiten höhere Gelbwerte zu erzielen. Mit Mediatorzusatz sinken nach Inkubation entsprechend den vorhergegangenen Versuchen (Kap. 4.3.1.1 bis Kap. 4.3.1.2) zum LMS die Helligkeit  $L^*$  (z.B. bei pH 7 von 81,21 auf 80,20). Gleichzeitig steigen die Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  mit der LMS-Behandlung in Richtung Rot und Gelb an (z.B. bei pH 7  $a^*$  von 4,22 auf 4,54 und  $b^*$  von 21,26 auf 22,15). Der Gelbwert nimmt entsprechend zu (z.B. bei pH 7 von 45,0 auf 47,2).

Wie im Fall der Kappazahlen bzw. der Weißgrade schneiden mit der alkalischen Extraktion bzw. der Peroxidbleiche in allen Messreihen die enzymatisch behandelten Proben besser ab als die ohne Laccase bzw. ohne Laccase und Mediator behandelten Proben. Die Helligkeit  $L^*$  steigt,  $a^*$ ,  $b^*$  und entsprechend der Gelbwert gehen zurück. Bei pH 4,5 und 0,5 MPa Sauerstoffdruck werden dabei für die mit Laccase- und Mediator behandelten Proben im Vergleich zu den nur mit Laccase behandelten Proben die besten Ergebnisse erzielt. So beträgt die Helligkeit  $L^*$  der LMS-behandelten Proben nach alkalischer Extraktion 83,65;  $a^*$  3,60;  $b^*$  19,27 und der Gelbwert 40,2. Die entsprechenden Werte für die nur mit Laccase behandelten Proben schneiden mit  $L^*$  81,73;  $a^*$  4,12;  $b^*$  20,99 und Gelbwert 44,5 ungünstiger ab. Keine wesentlichen Unterschiede besitzen die Helligkeits- und Farbwerte bei pH 7. Die Werte der mit Laccase behandelten Proben ( $L^*=81,70$ ;  $a^*=4,25$ ;  $b^*=21,66$ ; Gelbwert=45,5) liegen auf vergleichbarem Niveau wie die Werte der mit Laccase und HBT behandelten Proben ( $L^*=81,71$ ;  $a^*=4,31$ ;  $b^*=21,89$ ; Gelbwert=46,0). Nach der Peroxidstufe werden Werte erzielt, die die Ergebnisse der alkalischen Extraktion übertreffen. Dabei erzielt der Einsatz von Laccase und HBT bei pH 4,5 die besten Ergebnisse ( $L^*=92,59$ ;  $a^*=0,54$ ;  $b^*=14,04$  und Gelbwert=26,2). Verglichen damit erzielen die nur mit Laccase behandelten Proben lediglich Werte von  $L^*=89,20$ ;  $a^*=1,67$ ;  $b^*=17,92$  und Gelbwert=34,5. Wie bei der alkalischen Extraktion liegen im neutralen Bereich die Werte der LMS- ( $L^*=88,98$ ;  $a^*=1,88$ ;  $b^*=18,30$ ; Gelbwert=35,3) und Laccase-behandelten Proben ( $L^*=88,89$ ;  $a^*=1,94$ ;  $b^*=18,40$ ; Gelbwert=35,6) wieder nahe beieinander.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das LMS unter optimalen Reaktionsbedingungen einen intensiveren Effekt als Laccase alleine bewirkt. So nimmt bei pH 4,5 und 0,5 MPa Sauerstoff die Kappazahl bereits nach Abschluss der Inkubationsphase ab. Laccase alleine bewirkt erst nach Durchführung der alkalischen Extraktion bzw. der Peroxidbleiche einen Kappazahlensenkung, die niedriger ausfällt als beim LMS. Unter Deinkingbedingungen (pH 7, Luftatmosphäre) erzielen LMS und Laccase alleine vergleichbare Kappazahlen.

Die Weißgrade der enzymatisch behandelten Proben fallen nach Inkubation bei optimalen und Deinking-Bedingungen in vergleichbarem Umfang ab. Nach Durchfüh-

rung der alkalischen Extraktion bzw. der Peroxidbleiche übertreffen dann die Weißgrade der enzymatischen Varianten die Weißgrade der inkubierten Proben. Dabei erzielt jedoch die Laccase-Behandlung bei Deinking-Bedingungen nur bei Durchführung der Peroxidbleiche einen Weißbeanstieg. Bei Durchführung der alkalischen Extraktion unterscheiden sich die Weißgrade nicht von den Referenzwerten. Bei Optimalbedingungen übertreffen die enzymatischen Varianten die Weißgrade der enzymfreien Proben. Die besten Ergebnisse liefert dabei das LMS.

Mit den Weißgraden ändern sich die Werte des CIELab-Systems. Sinkt der Weißgrad, sinken  $L^*$ ;  $a^*$ ,  $b^*$  und der Gelbwert steigt an. Nur nach Inkubation gibt es zwischen der Behandlung mit Laccase und der Behandlung mit dem LMS eine abweichende Entwicklung. Im ersten Fall nimmt der Farbwert  $b^*$  ab, im zweiten zu.

Die Ergebnisse belegen, dass eine erfolgreiche Delignifizierung eine Voraussetzung für die Anwendung von Laccase bzw. des LMS im Sinne der Zellstoffbleiche ist. Nur im sauren Milieu ist der Einsatz von HBT gegenüber der Fahrweise ohne Mediator vorteilhaft. Unter den Bedingungen des Neutraldeinkings hingegen nivellieren sich die Unterschiede zwischen Laccase- und Laccase-Mediator-Behandlung.

**Tab. 4.3.5:** Kappazahlen, Weißgrade,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ - und Gelbwerte nach simultan durchgeführter Laccase- bzw. LMS-Behandlung

| Behandlung<br>[-]          | Aktivität<br>[U/g otro Stoff] | HBT<br>[%] | Kappazahl<br>[-]            | Weißgrad<br>[% ISO]         | $L^*$<br>[-]                | $a^*$<br>[-]                | $b^*$<br>[-]                | Gelbwert<br>[-]             |
|----------------------------|-------------------------------|------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                            |                               |            | pH 4,5   pH7                | pH 4,5   pH7                | pH 4,5   pH7                | pH 4,5   pH7                | pH 4,5   pH7                | pH 4,5   pH7                |
|                            |                               |            | 0,5 MPa O <sub>2</sub> Luft | 0,5 MPa O <sub>2</sub> Luft | 0,5 MPa O <sub>2</sub> Luft | 0,5 MPa O <sub>2</sub> Luft | 0,5 MPa O <sub>2</sub> Luft | 0,5 MPa O <sub>2</sub> Luft |
| Referenz                   | -                             | -          | 8,0   8,1                   | 38,3   39,0                 | 79,99   80,50               | 4,48   4,31                 | 21,58   21,66               | 46,3   46,1                 |
| L                          | 1000                          | -          | 7,9   7,8                   | 35,5   37,0                 | 77,80   78,91               | 5,14   4,77                 | 21,35   21,46               | 47,5   46,8                 |
| Referenz <sub>HBT</sub>    | -                             | 1          | 7,9   8,0                   | 38,6   40,3                 | 80,06   81,21               | 4,45   4,22                 | 21,33   21,26               | 45,8   45,0                 |
| LM <sub>HBT</sub>          | 1000                          | 1          | 6,4   7,6                   | 35,9   38,2                 | 78,64   80,20               | 5,21   4,54                 | 22,38   22,15               | 48,9   47,2                 |
| Referenz-E                 | -                             | -          | 7,5   7,7                   | 39,9   39,9                 | 81,15   81,27               | 4,23   4,33                 | 21,72   21,93               | 45,8   46,2                 |
| L-E                        | 1000                          | -          | 7,0   7,3                   | 41,2   40,7                 | 81,73   81,70               | 4,12   4,25                 | 20,99   21,66               | 44,5   45,5                 |
| Referenz <sub>HBT</sub> -E | -                             | 1          | 7,4   7,7                   | 40,0   40,5                 | 81,20   81,62               | 4,21   4,29                 | 21,64   22,11               | 45,7   46,4                 |
| LM <sub>HBT</sub> -E       | 1000                          | 1          | 5,1   7,3                   | 45,5   40,5                 | 83,65   81,71               | 3,60   4,31                 | 19,27   21,89               | 40,2   46,0                 |
| Referenz-P                 | -                             | -          | 6,4   5,8                   | 52,1   51,2                 | 87,56   87,21               | 2,38   2,52                 | 19,04   19,41               | 37,4   38,3                 |
| L-P                        | 1000                          | -          | 5,7   5,6                   | 56,0   55,0                 | 89,20   88,89               | 1,67   1,94                 | 17,92   18,40               | 34,5   35,6                 |
| Referenz <sub>HBT</sub> -P | -                             | 1          | 6,2   6,0                   | 52,8   51,5                 | 87,84   87,34               | 2,23   2,45                 | 18,78   19,26               | 36,8   37,9                 |
| LM <sub>HBT</sub> -P       | 1000                          | 1          | 4,1   5,5                   | 66,3   55,3                 | 92,59   88,98               | 0,54   1,88                 | 14,04   18,30               | 26,2   35,3                 |

### **4.3.2 Untersuchungen zur LMS- und Laccase-unterstützten Bleiche von Holzschliff und TMP**

Mit dem relativ ligninarmen, sauerstoffvorgebleichten Nadelholzsulfatzellstoff konnten unter suboptimalen Bedingungen mit Hilfe von Laccase bzw. des LMS zumindest nach Durchführung der Peroxidbleiche sowohl Bleich- als auch Delignifizierungseffekte erzielt werden. Diese Versuche zeigen zwar, dass während der Inkubationsphase eine enzymatische Modifizierung des Lignins zu Verfärbungsreaktionen führt und dass eine an die Laccase- bzw. LMS-Behandlung anschließende Delignifizierungsstufe wesentlich für einen Bleicheffekt ist. Diese Resultate erklären jedoch nicht, warum die Ergebnisse zur Peroxidbleiche von DIP (Kap. 4.2.4.2) unbefriedigend ausfallen. Allerdings besitzen vorgebleichte Sulfatzellstoffe in der Altpapier- bzw. DIP-Qualität, die Gegenstand der Untersuchung ist, keine Bedeutung. Wichtige Bestandteile in Altpapier auf Basis von Haushaltssammelware sind dagegen (neben hochweißen und intensiv delignifizierten Zellstoffen) ligninreiche Primärfaserstoffe wie Holzschliff und TMP, die einer ligninerhaltenden Bleiche unterzogen wurden. Für die folgenden Untersuchungen wird daher der Nadelholzsulfatzellstoff gegen diese Substrate ausgetauscht.

#### **4.3.2.1 Behandlung von Holzschliff mit Laccase und Mediator**

Zunächst werden die Effekte des LMS auf Holzschliff untersucht. Dazu werden die Bedingungen der Inkubationsphasen variiert. Sie werden unter den optimalen Bedingungen des LMS bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck und pH 4,5, bei suboptimalen Bedingungen bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck und pH 7 sowie unter Deinkingbedingungen (Atmosphärendruck, pH 7) als ungünstigste Variante vollzogen. Aus Zeitgründen kann pro Laccasepräparat nur eine Aktivitätsdosierung (1000 U/g otro Stoff; 1% HBT) angewendet werden.

Tab. 4.3.6 zeigt die Ligningehalte von Holzschliffproben (bestimmt als Hydrolyserückstand), die mit Hilfe des LMS unter optimalen Bedingungen inkubiert und anschließend alkalisch extrahiert bzw. einer Peroxidbleichstufe unterzogen werden. Den Referenzproben werden während der Inkubationsphase weder Laccase noch Mediator zugefügt.

Die LMS-Behandlung hat keinen Effekt auf die Ligningehalte. Sie schwanken im Rahmen der Messgenauigkeit mit minimal 29,2% und maximal 31,4% vernachlässigbar um den Wert der Referenz von 30,4% (Tab. 4.3.6). Im Gegensatz zum chemisch aufgeschlossenen Zellstoff ist der Holzschliff auch gegenüber dem delignifizierenden

Effekt der alkalischen Extraktion bzw. der Peroxidbleiche resistent. Da das LMS bereits unter optimalen Bedingungen keinen Einfluss auf den Ligningehalt der Proben nimmt, wird auf die Ligningehaltsbestimmung der unter Deinking- und suboptimalen Bedingungen inkubierten Proben verzichtet.

**Tab. 4.3.6:** *Ligningehalte (als Hydrolyserückstand) [%] eines ligninerhaltend gebleichten Holzschliffs nach LMS-Behandlung bei Einsatz verschiedener Laccase-Präparate. Inkubiert wurde bei pH 4,5 und 0,5 MPa Sauerstoffdruck. LM = nach Inkubation mit Laccase und Mediator; LM-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; LM-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase und Mediator*

| Behandlung<br>[-] | Laccase<br>[U/g] | HBT<br>[%] | Laccase von       |                       |                      |
|-------------------|------------------|------------|-------------------|-----------------------|----------------------|
|                   |                  |            | <i>T. villosa</i> | <i>M. thermophila</i> | <i>T. versicolor</i> |
| Referenz          | 0                | 0          | 30,4              | 30,4                  | 30,4                 |
| LM                | 1000             | 1          | 31,2              | 30,6                  | 30,7                 |
| Referenz-E        | 0                | 0          | 31,4              | 31,4                  | 31,4                 |
| LM-E              | 1000             | 1          | 30,9              | 30,7                  | 30,4                 |
| Referenz-P        | 1                | 0          | 30,9              | 30,9                  | 30,9                 |
| LM-P              | 1000             | 1          | 29,2              | 31,3                  | 30,6                 |

Die Veränderung des Weißgrades nach Inkubation, alkalischer Extraktion und Peroxidbleiche zeigt unabhängig von den Inkubationsbedingungen und des verwendeten Laccase-Präparates das gleiche Muster. Ausgehend vom Weißgrad nach Inkubation führt die alkalische Extraktion zu einer deutlichen Weißgradabnahme. Die Peroxidbleiche erzielt Weißgrade, die etwas über dem Referenzweißgrad liegen (Abb. 4.3.9). So nimmt z.B. der Weißgrad der bei pH 7 und Luftatmosphäre inkubierten Referenzprobe von 68,5% ISO bei Durchführung der alkalischen Referenz auf 57,1% ISO ab, was auf den Effekt der alkaliinduzierten Vergilbung zurückzuführen ist. Die Peroxidbleiche erzielt dagegen Weißgrade, die mit 71,1% ISO etwas über dem Ausgangsweißgrad liegen. (Ein wesentlicher Bleicheffekt ist auch nicht zu erwarten, da es sich beim Ausgangsmaterial ja um einen bereits ligninerhaltend gebleichten Holzschliff handelt.)

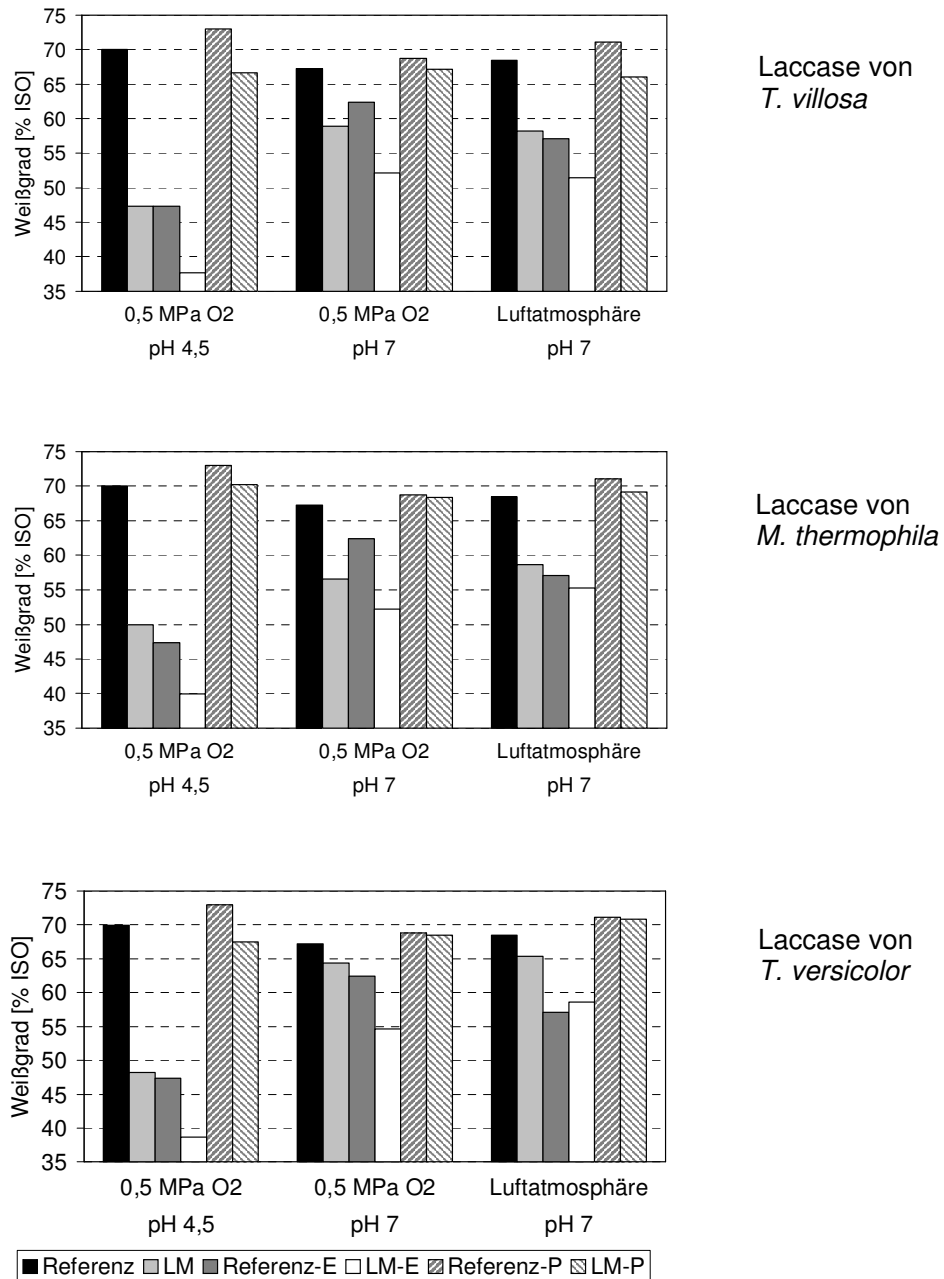
Die Laccase-Mediator-Behandlung führt nach Abschluss der Inkubationsphase zu einem deutlichen Weißgradabfall. Beispielsweise sinkt bei Verwendung von *T. villosa*-Laccase und HBT der Weißgrad bei Optimalbedingungen von 70% ISO auf 47,3% ISO, bei suboptimalen Bedingungen von 67,2% ISO auf 58,9% ISO und bei Deinkingbedingungen von 68,5% ISO auf 58,2% ISO. Nach Durchführung der alkalischen Extraktion liegen die Weißgrade der enzymatisch behandelten Proben ebenfalls deutlich unter den Referenzwerten. So liegt bei Einsatz von *T. villosa*-Laccase der Weißgrad der LMS-behandelten Probe bei Optimalbedingungen mit 37,7% ISO um 9,7% ISO, bei suboptimalen Bedingungen mit 52,2% ISO um 10,2% ISO und bei

Deinkingbedingungen mit 51,4% ISO um 5,7% ISO niedriger als der entsprechende Referenzwert. Auch mit Hilfe der Peroxidbleiche ist kein Weißegewinn für die mit Laccase und Mediator behandelten Proben erzielbar. Die Weißgradeinbußen fallen im Vergleich zur enzym- und mediatorfreien Referenz lediglich am niedrigsten aus. Entsprechend sind im Fall von *T. villosa*-Laccase die Weißgrade bei Optimalbedingungen mit 66,6% ISO um 6,4% ISO, bei suboptimalen Bedingungen mit 67,2 % ISO um 1,6% ISO und mit 66,0% ISO bei Deinkingbedingungen um 5,1% ISO niedriger als der entsprechende Referenzwert. Diese Weißgradeinbußen infolge der Behandlung mit Laccase und Mediator können auch bei Verwendung von *M. thermophila*- und *T. versicolor*-Laccase beobachtet werden. Lediglich im Fall der *T. versicolor*-Laccase kommt es bei pH 7 und Luftatmosphäre zu einer Abweichung dieses Trends. Hier übertrifft der Weißgrad der enzymatischen Variante nach Durchführung der alkalischen Extraktion den Wert der enzymfreien Probe geringfügig um 1,5% ISO. Jedoch dreht sich dieser Trend bei den peroxidgebleichten Proben wieder um, so dass es sich beim Ergebnis nach alkalischer Extraktion vermutlich um einen Ausreißer handelt.

Die Farbkennzahlen  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  und der Gelbwert zeigen wieder eine dem Weißgrad entsprechende Entwicklung. Nimmt der Weißgrad ab, so sinkt die Helligkeit  $L^*$  ebenfalls, die Farbkennzahlen steigen in Richtung Rot und Gelb und die Vergilbung nimmt zu (Tab 4.3.7). Wie bei den Versuchen zuvor, kommt es daher mit dem Laccase- und Mediator-bedingten Weißgradabfall zur Intensivierung der Vergilbung, die auch bei Deinkingbedingungen deutlich ausgeprägt ist. Zum Beispiel liegen bei Verwendung von *T. villosa*-Laccase bei pH 7 und Luftatmosphäre die Gelbwerte der enzymatischen Varianten nach Inkubation immer noch um 4,3, nach alkalischer Extraktion um 3,2 und nach Peroxidbleiche um 3,9 Einheiten höher als der entsprechende Referenzwert. Noch größere Unterschiede liegen bei Durchführung der Inkubationsphase unter Optimalbedingungen vor. Die Intensität des Vergilbungseffektes geht also mit steigendem pH-Wert zurück. Ein vergleichbares Ergebnis wird bei Einsatz von *M. thermophila*-Laccase erzielt. Auch die Ergebnisse mit *T. versicolor* stimmen mit diesem Ergebnis überein, jedoch ist der Vergilbungstrend bei Durchführung der Inkubationsphase bei Deinkingbedingungen schwächer ausgeprägt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Laccase-Mediator-System bei ligninreichen Stoffen auch bei neutralem pH-Wert zu intensiven Beeinträchtigungen der optischen Eigenschaften führen kann. Diese können selbst nach einer Peroxidbleiche bestehen bleiben. Vergleicht man dieses Resultat mit den Ergebnissen, die mit dem Nadelholz-Sulfatzellstoff erzielt werden, kommt man zum Schluss, dass eine LMS-Anwendung erst dann zu einem erfolgreichen Bleichergebnis führt, wenn an die Inkubationsphase

eine ausreichend intensive Delignifizierung folgt, die das enzymatisch modifizierte Lignin aus dem Faserverbund lösen kann.



**Abb. 4.3.9:** Einfluss verschiedener pH-Werte während der Inkubationsphase einer Laccase-Mediator-Behandlung auf die Weißgradentwicklung eines ligninerhaltend gebleichten Holzschliffs. Inkubationsbedingungen: pH 4,5 und 7; Sauerstoffdruck: 0,5 MPa und Luftatmosphäre; HBT: 1%; Aktivität: 1000 U/g (*T. villosa*- und *M. thermophila*-Laccase) bzw. 15 U/g (*T. versicolor*-Laccase). LM = nach Inkubation mit Laccase und Mediator; LM-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; LM-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase und Mediator

**Tab. 4.3.7:**  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ - und Gelbwerte eines ligninerhaltend gebleichten Holzschliffs nach LMS-Behandlung. Variiert werden in der Inkubationsphase die eingesetzten Laccase-Präparate, die pH-Werte und die Sauerstoffversorgung. LM = nach Inkubation mit Laccase und Mediator; LM-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; LM-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase und Mediator

| Behandlung<br>[-]                                 | Aktivität<br>[U/g] | HBT<br>[%] | pH <sup>a</sup><br>[-] | O <sub>2</sub> <sup>a</sup><br>[MPa] | L*<br>[-] | a*<br>[-] | b*<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|---------------------------------------------------|--------------------|------------|------------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| bei Verwendung von <i>T. villosa</i> -Laccase     |                    |            |                        |                                      |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 93,11     | -0,32     | 12,08     | 22,0            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 82,92     | 4,30      | 16,04     | 35,5            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 88,13     | -1,20     | 26,01     | 45,3            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 81,71     | 1,77      | 26,06     | 50,4            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 94,12     | -1,30     | 11,40     | 20,0            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 92,61     | -0,99     | 14,40     | 25,6            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 91,97     | 0,07      | 12,49     | 23,3            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7                      | 0,5                                  | 88,52     | 1,44      | 14,03     | 27,8            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 88,90     | 0,13      | 16,78     | 31,4            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7                      | 0,5                                  | 86,59     | 1,19      | 17,68     | 34,4            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 93,07     | -0,69     | 13,20     | 23,7            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 7                      | 0,5                                  | 92,84     | -0,58     | 14,21     | 25,6            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,54     | -0,38     | 12,44     | 22,7            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 87,77     | 1,65      | 13,38     | 27,0            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 88,86     | -0,01     | 16,77     | 31,3            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 86,12     | 1,17      | 17,66     | 34,5            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 93,51     | -1,34     | 11,99     | 21,0            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,11     | -1,24     | 14,05     | 24,9            |
| bei Verwendung von <i>M. thermophila</i> -Laccase |                    |            |                        |                                      |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 93,11     | -0,32     | 12,08     | 22,0            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 84,36     | 3,35      | 15,75     | 33,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 88,13     | -1,20     | 26,01     | 45,3            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 83,27     | 1,25      | 26,02     | 49,2            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 94,12     | -1,30     | 11,40     | 20,0            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 93,70     | -1,23     | 13,14     | 23,0            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 91,97     | 0,07      | 12,49     | 23,3            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7                      | 0,5                                  | 87,51     | 1,94      | 14,52     | 29,3            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 88,90     | 0,13      | 16,78     | 31,4            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7                      | 0,5                                  | 86,57     | 1,51      | 17,53     | 34,5            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 93,07     | -0,69     | 13,20     | 23,7            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 7                      | 0,5                                  | 93,43     | -0,80     | 14,27     | 25,3            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,54     | -0,38     | 12,44     | 22,7            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 88,04     | 1,64      | 13,45     | 27,1            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 88,86     | -0,01     | 16,77     | 31,3            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 87,87     | 0,81      | 16,76     | 32,2            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 93,51     | -1,34     | 11,99     | 21,0            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 93,17     | -1,25     | 13,09     | 23,0            |
| bei Verwendung von <i>T. versicolor</i> -Laccase  |                    |            |                        |                                      |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 93,11     | -0,32     | 12,08     | 22,0            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 4,5                    | 0,5                                  | 83,40     | 3,84      | 15,92     | 34,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 88,13     | -1,20     | 26,01     | 45,3            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 4,5                    | 0,5                                  | 82,38     | 1,44      | 26,09     | 49,9            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 94,12     | -1,30     | 11,40     | 20,0            |
| LM-P                                              | 15                 | 2          | 4,5                    | 0,5                                  | 92,88     | -1,09     | 14,15     | 25,0            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 91,97     | 0,07      | 12,49     | 23,3            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 7                      | 0,5                                  | 90,74     | 0,51      | 12,83     | 24,5            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 88,90     | 0,13      | 16,78     | 31,4            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 7                      | 0,5                                  | 87,85     | 0,52      | 17,40     | 33,1            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,5                                  | 93,07     | -0,69     | 13,20     | 23,7            |
| LM-P                                              | 15                 | 2          | 7                      | 0,5                                  | 93,10     | -0,67     | 13,51     | 24,2            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,54     | -0,38     | 12,44     | 22,7            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 90,94     | 0,32      | 12,29     | 23,4            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 88,86     | -0,01     | 16,77     | 31,3            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 89,29     | 0,05      | 16,04     | 30,0            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 93,51     | -1,34     | 11,99     | 21,0            |
| LM-P                                              | 15                 | 2          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 93,46     | -1,28     | 12,15     | 21,4            |

<sup>a</sup> während der Inkubationsphase

<sup>b</sup> 0,1 MPa = Luftatmosphäre

#### 4.3.2.2 Behandlung von TMP mit Laccase und Mediator

Zur Kontrolle der mit Holzschliff erzielten Ergebnisse wird TMP als Substrat gewählt und mit Laccase und HBT behandelt (vergl. Kap 4.3.2.1). Diese Testreihe bestätigt die Resultate, die mit Holzschliff beobachtet wurden.

Auch bei TMP bleiben die Ligningehalte (bestimmt als Hydrolyserückstand) unabhängig von der enzymatischen und chemischen Behandlung konstant (Tab. 4.3.8). Mit maximal 28,3% und minimal 26,2% weichen sie im Rahmen der Messgenauigkeit der Methode nur unwesentlich vom Referenzwert von 27,3% ab.

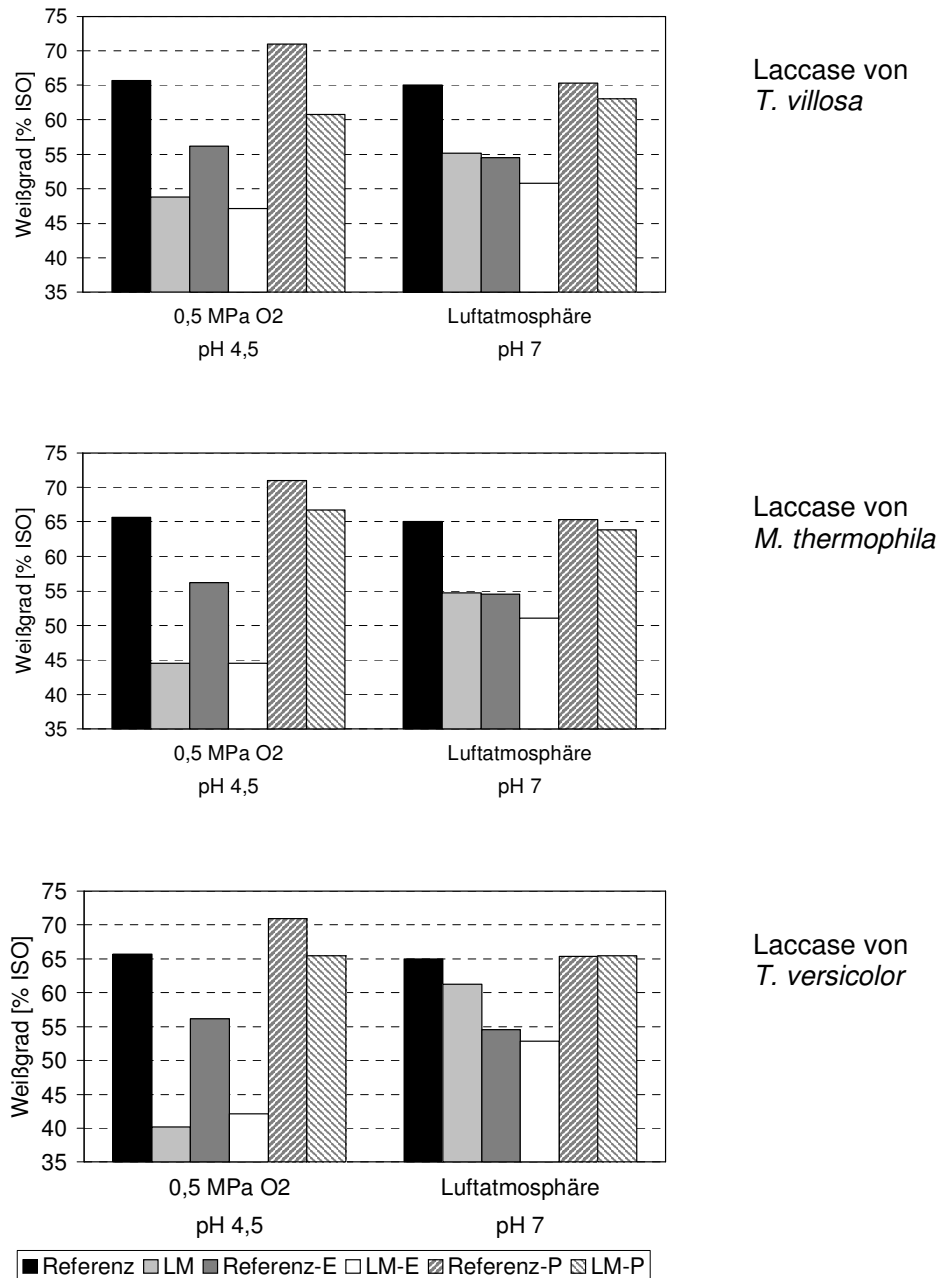
**Tab. 4.3.8:** Ligningehalte (als Hydrolyserückstand) [%] eines ligninerhaltend gebleichten TMP nach LMS-Behandlung bei Einsatz verschiedener Laccase-Präparate. Inkubiert wurde bei pH 4,5 und 0,5 MPa Sauerstoffdruck. LM = nach Inkubation mit Laccase und Mediator; LM-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; LM-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase

| Behandlung<br>[-] | Laccase<br>[U/g] | HBT<br>[%] | Laccase von       |                       |                      |
|-------------------|------------------|------------|-------------------|-----------------------|----------------------|
|                   |                  |            | <i>T. villosa</i> | <i>M. thermophila</i> | <i>T. versicolor</i> |
| Referenz          | 0                | 0          | 27,3              | 27,3                  | 27,3                 |
| LM                | 1000             | 1          | 28,1              | 28,3                  | 28,0                 |
| Referenz-E        | 0                | 0          | 27,7              | 27,7                  | 27,7                 |
| LM-E              | 1000             | 1          | 28,0              | 27,8                  | 26,9                 |
| Referenz-P        | 1                | 0          | 27,0              | 27,0                  | 27,0                 |
| LM-P              | 1000             | 1          | 27,4              | 27,6                  | 26,2                 |

Die Weißgrade nach Inkubation, alkalischer Extraktion und Peroxidbleiche (Abb. 4.3.10, Tab. 4.3.9) spiegeln die Ergebnisse des Versuchs mit Holzschliff wider. Infolge der Inkubation mit Laccase und Mediator fällt der Weißgrad verglichen mit den entsprechenden Referenzwerten bei Optimalbedingungen (pH 4,5 und 0,5 MPa O<sub>2</sub>) je nach Laccasepräparat um 17% ISO bis 25,5% ISO niedriger aus. Unter Deinkingbedingungen liegt der Weißgradabfall immer noch um 3,7% ISO bis 10,4% ISO unter dem Referenzwert. Auch nach Durchführung der alkalischen Extraktion erreichen die Weißgrade der inkubierten Proben bei Optimalbedingungen mit 14,1% ISO bis 9% ISO ein niedrigeres Niveau. Bei Deinkingbedingungen sind die Unterschiede mit 1,7% ISO bis 3,8% ISO geringer, was auf eine verminderte Wirksamkeit des LMS unter diesen Bedingungen zurückzuführen ist. Auch nach der Peroxidbleiche liegen die Weißgrade der bei pH 4,5 und 0,5 MPa O<sub>2</sub> enzymatisch inkubierten Proben deutlich um 4,2% ISO bis 10,1% ISO, bei Deinkingbedingungen noch um 1,5% ISO bzw. 2,2% ISO unter dem entsprechenden Referenzwert. Eine Ausnahme bildet der Bleichversuch der mit *T. versicolor* bei neutralem pH-Wert und Luftatmosphäre inkubierten Probe. Sie erreicht mit 65,4% ISO das Weißgradniveau der Referenz. Mit

dem Laccase- und Mediator-bedingten Weißgradabfall sinkt wieder die Helligkeit  $L^*$ . Gleichzeitig verschieben sich die Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  in den roten und gelben Bereich (Tab. 4.3.9).

Bei keiner mit Laccase und Mediator behandelten Probe werden also Werte gemessen, die besser abschneiden als die Werte der Laccase- und Mediator-freien Referenz. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten, die mit Holzschliff erzielt werden, überein. Wesentlich ist, dass die Primärfaserstoffe Holzschliff und TMP auch nach Durchführung der Peroxidbleiche eine Weißgrad- und Verfärbungsentwicklung vorweisen, die den negativen Ergebnissen gleicht, die mit dem DIP-Stoff nach Peroxidbleiche (Kap. 4.2.4) erzielt werden.



**Abb. 4.3.10:** Einfluss verschiedener Inkubationsbedingungen einer Laccase-Mediator-Behandlung auf die Weißgradentwicklung eines ligninerhaltend gebleichten TMP. Inkubationsbedingungen: pH 4,5 und 7; Sauerstoffdruck: 0,5 MPa und Luftatmosphäre; HBT: 1%; Aktivität: 1000 U/g (*T. villosa*- und *M. thermophila*-Laccase) bzw. 15 U/g (*T. versicolor*-Laccase). LM = nach Inkubation mit Laccase und Mediator; LM-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; LM-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase

**Tab. 4.3.9:**  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ - und Gelbwerte eines ligninerhaltend gebleichten TMP nach LMS-Be-handlung. Variiert wurden in der Inkubationsphase die eingesetzten Laccase-Präparate, die pH-Werte und die Sauerstoffversorgung. LM = nach Inkubation mit Laccase und Mediator; LM-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; LM-P = nach Inkubation und Peroxid-bleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase

| Behandlung<br>[-]                                 | Aktivität<br>[U/g] | HBT<br>[%] | pH <sup>a</sup><br>[-] | O <sub>2</sub> <sup>a</sup><br>[MPa] | L*<br>[-] | a*<br>[-] | b*<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|---------------------------------------------------|--------------------|------------|------------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| bei Verwendung von <i>T. villosa</i> -Laccase     |                    |            |                        |                                      |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 92,31     | -0,14     | 14,64     | 26,7            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 83,72     | 3,50      | 15,94     | 34,3            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 89,11     | 0,18      | 18,22     | 33,8            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 84,44     | 1,78      | 19,31     | 38,4            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 94,35     | -1,26     | 13,75     | 23,9            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 91,67     | -0,61     | 18,28     | 32,5            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,13     | -0,12     | 14,89     | 27,2            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 86,88     | 1,69      | 14,89     | 30,0            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 89,07     | -0,18     | 19,87     | 36,2            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 86,77     | 1,05      | 19,53     | 37,3            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,69     | -1,06     | 15,83     | 27,9            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 91,96     | -0,82     | 16,61     | 29,5            |
| bei Verwendung von <i>M. thermophila</i> -Laccase |                    |            |                        |                                      |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 92,31     | -0,14     | 14,64     | 26,7            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 81,74     | 4,04      | 17,34     | 37,9            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 89,11     | 0,18      | 18,22     | 33,8            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 82,99     | 2,38      | 19,78     | 40,2            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 94,35     | -1,26     | 13,75     | 23,9            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 4,5                    | 0,5                                  | 93,47     | -1,11     | 15,94     | 27,8            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,13     | -0,12     | 14,89     | 27,2            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 86,80     | 1,79      | 15,18     | 30,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 89,07     | -0,18     | 19,87     | 36,2            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 86,90     | 1,07      | 19,49     | 37,3            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,69     | -1,06     | 15,83     | 27,9            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,29     | -0,96     | 16,50     | 29,2            |
| bei Verwendung von <i>T. versicolor</i> -Laccase  |                    |            |                        |                                      |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 92,31     | -0,14     | 14,64     | 26,7            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 4,5                    | 0,5                                  | 79,31     | 5,11      | 18,16     | 41,3            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 89,11     | 0,18      | 18,22     | 33,8            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 4,5                    | 0,5                                  | 81,75     | 2,82      | 20,36     | 42,0            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 4,5                    | 0,5                                  | 94,35     | -1,26     | 13,75     | 23,9            |
| LM-P                                              | 15                 | 2          | 4,5                    | 0,5                                  | 93,12     | -1,03     | 16,46     | 28,9            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 91,99     | -0,08     | 14,68     | 26,9            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 89,92     | 0,53      | 14,41     | 27,4            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 89,07     | -0,18     | 19,87     | 36,2            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 88,06     | 0,26      | 19,76     | 36,7            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,69     | -1,06     | 15,83     | 27,9            |
| LM-P                                              | 15                 | 2          | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,72     | -1,01     | 15,77     | 27,8            |

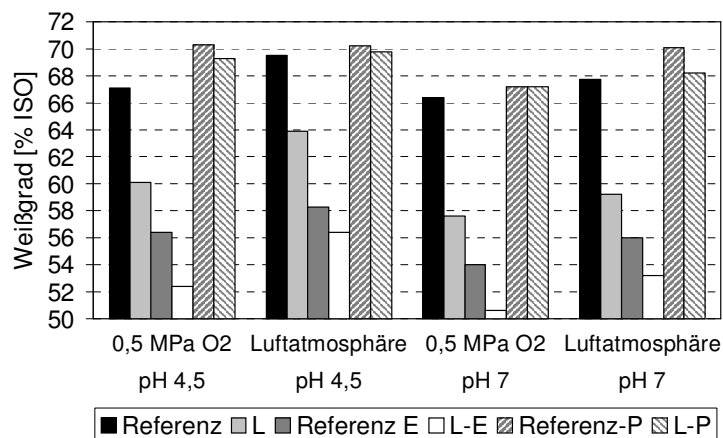
<sup>a</sup> während der Inkubationsphase

<sup>b</sup> 0,1 MPa = Luftatmosphäre

#### 4.3.2.3 Behandlung von Holzschliff mit Laccase ohne Mediator

In einer weiteren Versuchsreihe wird der Effekt einer Inkubation des Holzschliffs mit Laccase ohne Mediator auf Weißgrad, Farbort und Gelbwert untersucht. Auf die aufwendige Ligningehaltsbestimmung wird verzichtet, da bereits bei den LMS-behandelten Proben (Kap. 4.3.2.1) keine Änderung im Ligningehalt beobachtet werden kann.

Unabhängig von pH-Wert und Sauerstoffversorgung erzielt die Behandlung mit Laccase nach Inkubation, alkalischer Extraktion und Peroxidbleiche wie bei den Versuchen mit dem LMS keinen Vorteil (Abb. 4.3.11). Die Weißgrade der enzymfreien Varianten liegen über dem Weißgrad der laccasebehandelten Proben. Beispielsweise fällt bei Deinkingbedingungen (pH 7 und Luftatmosphäre) der Weißgrad der enzymatisch behandelten Probe auf 59,2% ISO ab und liegt damit um 8,5% ISO niedriger als der Referenzwert von 67,7% ISO. Nach Durchführung der alkalischen Extraktion ist der Weißgrad der enzymatisch behandelten Variante immer noch um 2,8% ISO niedriger als der entsprechende Referenzwert von 56% ISO. Und auch nach Durchführung der Peroxidbleiche büßt der Weißgrad der mit Laccase behandelten Probe im Vergleich zum Referenzwert von 70,1% ISO noch 1,9% ISO Weiße ein.



**Abb. 4.3.11:** Einfluss unterschiedlicher Inkubationsbedingungen bei einer Behandlung von gebleichtem Holzschliff mit *T. villosa*-Laccase auf die Entwicklung der Weißgrade. L = nach Inkubation mit Laccase; L-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; L-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase und Mediator

Die Helligkeiten  $L^*$ , die Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  sowie die Gelbwerte fallen wie bei den Versuchen mit dem LMS in Kap. 4.3.2.1 für die mit Laccase behandelten Proben im Vergleich zu den enzymfreien Referenzwerten wieder ungünstiger aus (Tab. 4.3.10).

So liegt beispielsweise die Helligkeit  $L^*$  der bei Deinkingbedingungen (pH 7 und Luftatmosphäre) mit Laccase behandelten Probe nach Abschluss der Inkubationsphase verglichen mit dem  $L^*$  des Referenzwertes von 92,35 nur bei 88,21. Genauso ergeben sich nach alkalischer Extraktion für die Laccase-behandelte Probe mit  $L^* = 86,95$  und nach Peroxidbleiche mit  $L^* = 92,76$  niedrigere Werte. Die entsprechenden Referenzwerte betragen 88,42 bzw. 93,36.

Die Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  zeigen wieder eine Verschiebung in den roten und gelben Farbbereich, so dass der Gelbwert entsprechend ansteigt. Beispielsweise steigt der Farbwert  $a^*$  nach Abschluss der Inkubationsphase bei Deinking-Bedingungen ausgehend von -0,39 der enzymfreien Referenz auf 1,76. Nach Durchführung der alkalischen Extraktion übertrifft die laccasebehandelte Variante mit  $a^* = 0,85$  den Referenzwert von 0,07 und auch im Fall der Peroxidbleiche nimmt der Farbwert  $a^*$  von -1,37 auf -1,21 zu. Parallel dazu steigen auch die Farbwerte  $b^*$  an. Sie betragen nach Inkubation mit Laccase 13,11, nach alkalischer Extraktion 17,26, nach Peroxidbleiche 13,19 und übertreffen die entsprechenden Referenzwerte von 12,80, 17,05 sowie 12,61. Als Konsequenz übertreffen die Gelbwerte der enzymatisch behandelten Proben die Werte der laccasefreien Referenzen. So liegt nach der Inkubation der Gelbwert mit 26,5 um 3,1, nach der alkalischen Extraktion mit 33,3 um 1,4 und nach der Peroxidbleiche mit 23,3 um 1,2 Einheiten über dem entsprechenden Vergleichswert.

**Tab. 4.3.10:** Ligninerhaltend gebleichter Holzschliff nach *T. villosa*-Laccase-Behandlung (L) im Bleichautoklaven bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck bzw. im offenen Temperiergefäß bei Luftatmosphäre bei pH-Werten von 4,5 und 7 sowie nach anschließender alkalischer Extraktion (E) bzw. Peroxidbleiche (P). L = nach Inkubation mit Laccase; L-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; L-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase

| Behandlung<br>[-] | Aktivität<br>[U/g] | pH <sup>a</sup><br>[-] | O <sub>2</sub> <sup>a</sup><br>[MPa] | L*<br>[-] | a*<br>[-] | b*<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|-------------------|--------------------|------------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| Referenz          | 0                  | 4,5                    | 0,5                                  | 92,11     | -0,13     | 12,85     | 23,7            |
| L                 | 1000               | 4,5                    | 0,5                                  | 88,77     | 1,86      | 13,20     | 26,7            |
| Referenz-E        | 0                  | 4,5                    | 0,5                                  | 88,25     | 0,43      | 16,32     | 31,0            |
| L-E               | 1000               | 4,5                    | 0,5                                  | 86,31     | 1,27      | 16,98     | 33,4            |
| Referenz-P        | 0                  | 4,5                    | 0,5                                  | 93,34     | -1,58     | 12,43     | 21,6            |
| L-P               | 1000               | 4,5                    | 0,5                                  | 93,19     | -1,51     | 13,04     | 22,7            |
| Referenz          | 0                  | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,98     | -0,36     | 12,30     | 22,4            |
| L                 | 1000               | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 90,43     | 1,29      | 12,60     | 24,8            |
| Referenz-E        | 0                  | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 89,23     | -0,06     | 16,26     | 30,3            |
| L-E               | 1000               | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 88,26     | 0,46      | 16,39     | 31,2            |
| Referenz-P        | 0                  | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 93,24     | -1,27     | 12,31     | 21,7            |
| L-P               | 1000               | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 93,31     | -1,22     | 12,74     | 22,4            |
| Referenz          | 0                  | 7                      | 0,5                                  | 91,63     | 0,13      | 12,63     | 23,6            |
| L                 | 1000               | 7                      | 0,5                                  | 87,41     | 2,18      | 13,25     | 27,3            |
| Referenz-E        | 0                  | 7                      | 0,5                                  | 87,44     | 0,59      | 17,38     | 33,2            |
| L-E               | 1000               | 7                      | 0,5                                  | 85,52     | 1,75      | 17,41     | 34,8            |
| Referenz-P        | 0                  | 7                      | 0,5                                  | 92,30     | -1,31     | 13,36     | 23,6            |
| L-P               | 1000               | 7                      | 0,5                                  | 92,49     | -1,27     | 13,65     | 24,1            |
| Referenz          | 0                  | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,35     | -0,39     | 12,80     | 23,4            |
| L                 | 1000               | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 88,21     | 1,76      | 13,11     | 26,5            |
| Referenz-E        | 0                  | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 88,42     | 0,07      | 17,05     | 31,9            |
| L-E               | 1000               | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 86,95     | 0,85      | 17,26     | 33,3            |
| Referenz-P        | 0                  | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 93,36     | -1,37     | 12,61     | 22,1            |
| L-P               | 1000               | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,76     | -1,21     | 13,19     | 23,3            |

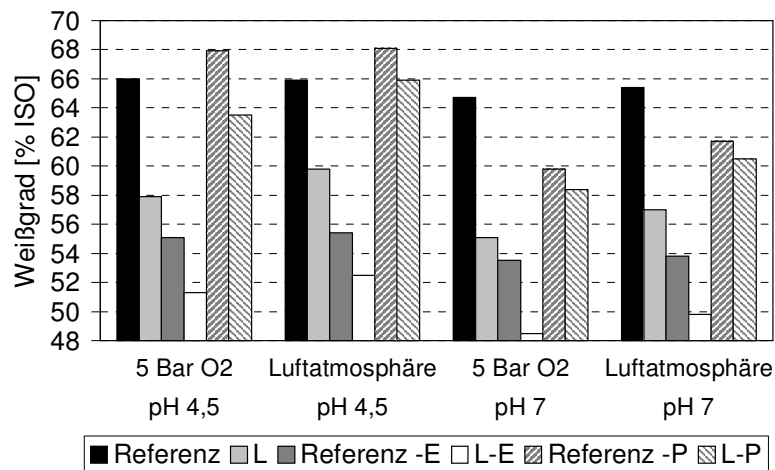
<sup>a</sup> während der Inkubationsphase

<sup>b</sup> 0,1 MPa = Luftatmosphäre

#### 4.3.2.4 Behandlung von TMP mit Laccase ohne Mediator

Die mit TMP durchgeführten Versuche mit Laccase ohne Mediator bestätigen die nachteiligen Ergebnisse, die in Kap. 4.3.2.3 mit Holzschliff und Laccase erzielt werden.

Auch hier wird der Weißgrad mit dem Einsatz von Laccase abgesenkt (Abb. 4.3.12). Nach alkalischer Extraktion bzw. nach Peroxidbleiche schneiden die Weißgrade der enzymatisch behandelten Proben weiterhin schlechter ab als die entsprechenden Referenzwerte. Beispielsweise beträgt der Weißgrad der mit Laccase bei Deinkingbedingungen behandelten Probe nach Inkubation im Vergleich zum Weißgrad der enzymfreien Referenz von 65,4% ISO nur 57,0% ISO. Nach Durchführung der alkalischen Extraktion liegt der Weißgrad mit 49,8% ISO um 4% ISO unter dem entsprechenden Referenzwert. Auch nach der Peroxidbleiche ist der Weißgrad des mit Laccase behandelten Stoffes mit 60,5% ISO noch um 1,2% ISO niedriger.



**Abb. 4.3.12:** Einfluss unterschiedlicher Inkubationsbedingungen bei einer Behandlung von gebleichtem TMP mit *T. villosa*-Laccase auf die Entwicklung der Weißgrade. L = nach Inkubation mit Laccase; L-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; L-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase

Unabhängig von pH-Wert, Sauerstoffversorgung und der Behandlungsstufe (Inkubation, alkalische Extraktion bzw. Peroxidbleiche) wird die Helligkeit  $L^*$  durch den Laccase-Einsatz wieder unter das Niveau der Referenz abgesenkt (Tab 4.3.11). So beträgt z.B. bei Vorliegen von Deinkingbedingungen  $L^*$  nach Inkubation mit

Laccase 87,70 statt 92,26, nach alkalischer Extraktion 86,33 statt 88,65 und nach Peroxidbleiche 91,10 statt 91,34.

Gleichzeitig kommt es wieder mit der Zugabe von Laccase zu einem Anstieg der Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  und damit zu einer Intensivierung des Gelbwertes, die wiederum nach alkalischer Extraktion bzw. Peroxidbleiche erhalten bleiben.

Beispielsweise übertrifft bei Vorliegen von Deinkingbedingungen während der Inkubationsphase der Farbwert  $a^*$  der Laccase-behandelten Probe von 1,51 den Referenzwert von -0,11. Nach Durchführung der alkalischen Extraktion liegt er mit 1,28 in vergleichbarem Maße über dem Wert der enzymfreien Fahrweise von 0,08. Nach Durchführung der Peroxidbleiche sind zwar die Unterschiede geringer, trotzdem wird der Farbwert  $a^*$  der Referenz (-0,78) von der Laccase-behandelten Probe mit -0,57 immer noch übertroffen.

Auch die Farbwerte  $b^*$  für die Laccase-behandelten Proben liegen weitgehend über den Werten der entsprechenden Referenzen. In drei Fällen ist dies in Tab. 4.3.11 jedoch umgekehrt. Und zwar nach Abschluss der Inkubationsphase bei Deinking-Bedingungen, hier liegt der Farbwert  $b^*$  mit 14,47 niedriger als der Referenzwert von 14,79 und nach Abschluss der alkalischen Extraktion bei suboptimalen und Deinkingbedingungen. Bei pH 4,5 und Luftatmosphäre beträgt der Farbwert  $b^*$  nur 18,72 und der Referenzwert 18,92. Bei pH 7 und Luftatmosphäre liegt er mit 19,86 nur knapp unterhalb des Referenzwertes von 19,94. In allen anderen Fällen liegt der Farbwert  $b^*$  der Laccase-behandelten Proben über dem Wert der enzymfreien Behandlungen.

Auf Grund der bei Anwendung von Laccase alleine im Vergleich zum LMS viel deutlicher hervortretenden Verschiebung des Farbwertes  $a^*$  in den roten Bereich (vergl. auch Kap. 4.3.1.3 und 4.3.1.4) führt die enzymatische Behandlung in allen Fällen zu einem Anstieg des Gelbwertes. Bei pH 7 und Luftatmosphäre übertrifft beispielsweise der Gelbwert der Laccase-behandelten Probe mit 28,9 nach Inkubation den Gelbwert der Referenz um 1,9, nach alkalischer Extraktion mit 38,2 um 1,6 und nach Peroxidbleiche mit 31,5 um 1,5 Einheiten.

**Tab. 4.3.11:** Ligninerhaltend gebleichter TMP nach *T. villosa*-Laccase-Behandlung (L) im Bleichautoklaven bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck bzw. im offenen Temperiergefäß bei Luftatmosphäre bei pH-Werten von 4,5 und 7 sowie nach anschließender alkalischer Extraktion (E) bzw. Peroxidbleiche (P). L = nach Inkubation mit Laccase; L-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; L-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase

| Behandlung<br>[-] | Aktivität<br>[U/g] | pH <sup>a</sup><br>[-] | O <sub>2</sub> <sup>a</sup><br>[MPa] | L*<br>[-] | a*<br>[-] | b*<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|-------------------|--------------------|------------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| Referenz          | 0                  | 4,5                    | 0,5                                  | 92,49     | -0,14     | 14,63     | 26,6            |
| L                 | 1000               | 4,5                    | 0,5                                  | 88,44     | 1,83      | 14,97     | 29,8            |
| Referenz -E       | 0                  | 4,5                    | 0,5                                  | 88,94     | 0,13      | 18,99     | 35,0            |
| L-E               | 1000               | 4,5                    | 0,5                                  | 86,73     | 1,17      | 19,00     | 36,6            |
| Referenz -P       | 0                  | 4,5                    | 0,5                                  | 93,64     | -1,25     | 15,24     | 26,6            |
| L-P               | 1000               | 4,5                    | 0,5                                  | 92,14     | -0,83     | 16,58     | 29,5            |
| Referenz          | 0                  | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,45     | -0,11     | 14,65     | 26,7            |
| L                 | 1000               | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 89,42     | 1,41      | 14,87     | 29,1            |
| Referenz -E       | 0                  | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 89,02     | 0,17      | 18,92     | 34,9            |
| L-E               | 1000               | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 87,31     | 0,95      | 18,72     | 35,8            |
| Referenz -P       | 0                  | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 93,70     | -1,18     | 15,11     | 26,4            |
| L-P               | 1000               | 4,5                    | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,97     | -0,98     | 15,83     | 27,9            |
| Referenz          | 0                  | 7                      | 0,5                                  | 91,79     | 0,05      | 14,61     | 26,9            |
| L                 | 1000               | 7                      | 0,5                                  | 86,88     | 2,18      | 14,99     | 30,6            |
| Referenz -E       | 0                  | 7                      | 0,5                                  | 88,29     | 0,33      | 19,52     | 36,3            |
| L-E               | 1000               | 7                      | 0,5                                  | 85,40     | 1,81      | 19,62     | 38,6            |
| Referenz -P       | 0                  | 7                      | 0,5                                  | 90,62     | -0,37     | 17,32     | 31,4            |
| L-P               | 1000               | 7                      | 0,5                                  | 90,18     | -0,08     | 17,91     | 32,7            |
| Referenz          | 0                  | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 92,26     | -0,11     | 14,79     | 27,0            |
| L                 | 1000               | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 87,70     | 1,51      | 14,47     | 28,9            |
| Referenz -E       | 0                  | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 88,65     | 0,08      | 19,94     | 36,6            |
| L-E               | 1000               | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 86,33     | 1,28      | 19,86     | 38,2            |
| Referenz -P       | 0                  | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 91,34     | -0,78     | 16,79     | 30,0            |
| L-P               | 1000               | 7                      | 0,1 <sup>b</sup>                     | 91,10     | -0,57     | 17,52     | 31,5            |

#### 4.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen mit Primärfaserstoffen

Die Versuchsreihen mit den Primärfaserstoffen zeigen, dass der ligninarme, sauerstoffvorgebleichte Nadelholzsulfatzellstoff erfolgreich enzymatisch delignifiziert und gebleicht werden kann, dass aber die ligninreichen Stoffe Holzschiff und TMP im Ligningehalt konstant bleiben, verdunkeln, vergrauen und diese Verfärbungen auch nach einer Peroxidbleiche nicht ausgleichbar sind. Vergleicht man dieses Resultat mit den Ergebnissen, die mit dem Nadelholzsulfatzellstoff erzielt werden, kommt man zum Schluss, dass eine Laccase- bzw. LMS-Anwendung erst dann zu höheren Weißgraden und Farbortverbesserungen führt, wenn an die Inkubationsphase eine ausreichend intensive Delignifizierung folgt, die das enzymatisch modifizierte Lignin aus dem Faserverbund lösen kann.

<sup>a</sup> während der Inkubationsphase

<sup>b</sup> 0,1 MPa = Luftatmosphäre

#### 4.4 Abschließende Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob das oxidative Potenzial des Enzyms Laccase - alleine oder in Verbindung mit einem Mediator - nutzbringend für das Flotationsdeinking deutscher Haushaltssammelware unter den praxisnahen Bedingungen eines neutralen Deinkingverfahrens eingesetzt werden kann.

Für eine positive Beantwortung dieser Frage ist es notwendig, nach der Inkubation des Deinkstoffes mit Laccase oder Laccase und Mediator eine Reduktion der Schmutzpunktflecken nach Flotation nachweisen zu können.

Die Interpretation der mit der Modellmischung für Haushaltssammelware (AP) erhaltenen Ergebnisse zur Entwicklung der Schmutzpunktflecken nach Flotation erweist sich dabei als schwierig (vergl. Kap. 4.2.1 ff.). Es zeigt sich nämlich, dass zwar mit steigendem Einsatz von Laccase und Mediator eine Reduktion der Schmutzpunktflecken möglich scheint, doch geht gleichzeitig mit diesem Ergebnis ein deutlicher Abfall des Weißgrades einher. Da die Schmutzpunktauswertung mit Hilfe eines DOT-Counters durchgeführt wird, kann die Abnahme der Schmutzpunktflecken nicht als signifikant gewertet werden. Der Grund dafür liegt in der Messtechnik des DOT-Counters. Das Gerät arbeitet abhängig vom Kontrast. Deswegen können Schmutzpunkte nur dann detektiert werden, wenn der Unterschied zwischen hellem Hintergrund und dunkler Schmutzpunktfarbe groß genug ist. Mit Absinken des Weißgrades der Prüfpapiere vermindert sich jedoch der Kontrast, so dass zwangsläufig weniger Schmutzpunkte erkannt werden können.

Um dieses Problem zu umgehen, wird in weiteren Versuchsreihen mit DIP gearbeitet (vergl. Kap. 4.2.2 ff.). Vorzüge und Nachteile dieses Stoffes werden bereits in Kapitel 4.2.2 diskutiert und sollen deshalb hier nicht mehr Gegenstand der Überlegungen sein. Der bereits vorflotierte DIP ist deutlich heller, so dass auch aus den mit Laccase und Mediator HBT behandelten Proben nach erfolgter Flotation hellere Prüfpapiere erzeugt werden können. Zwar fallen bei steigender Laccase- und Mediator-Dosierung auch hier die Weißgrade ab, doch bleiben die Schmutzpunktflecken auf gleichem Niveau bzw. zeigen keinen signifikanten Abfall, aus dem auf eine Reduzierung der Schmutzpunktflecken rückgeschlossen werden könnte. Als „signifikant“ wird in der Praxis dann ein Unterschied zwischen den Messwerten eines DOT-Counters angesehen, wenn der Unterschied zwischen zwei Messwerten mehr als 20 Prozent beträgt (GEHR, V. (2001): Mdl. Mitt.). Das Verfahren ist also relativ ungenau.

Auf Grund des sehr engen zeitlichen Rahmens des Projektes, innerhalb dessen diese Arbeit entstand, war es nicht möglich, für die Werte der meisten Messreihen Mehrfachbestimmungen anzufertigen, weshalb die Messreihen zwischen den Einzelwerten zum Teil eine größere Schwankungsbreite besitzen. Trotz dieser Schwierigkeiten kann gezeigt werden, dass die Laccasen bzw. das Laccase-Mediator-System zu keiner signifikanten Schmutzpunkterniedrigung führen. Damit ist dieses System für die Verbesserung des Flotationsverfahrens in Hinblick auf eine verbesserte Druckfarbenentfernung für holzhaltige Sammelware, wie sie in Deutschland vorgefunden wird, uninteressant.

Nicht erwartet wurde der starke Abfall des Weißgrades, der mit dem steigenden Laccase- und Mediatoreinsatz einhergeht, da dieses Problem bei der LMS-unterstützten Bleiche von Zellstoffen kaum thematisiert wird (z.B. bei POPPIUS-LEVLIN et al., 1997 b, vergl. Kap. 2.4.3.1).

Zunächst wurde daran gedacht, dass der Weißgradabfall mit einem Aufziehen feindispersierter Druckfarbenteilchen in Zusammenhang stehen könnte. Der Prozess der Druckfarbenentfernung besteht bekanntlich aus den Prozessschritten Druckfarbenablösung, also der Abtrennung von Druckfarbenpartikeln von der Papierfaser, sowie aus dem Prozessschritt Druckfarbenaustrag. Der Austrag mit Hilfe des Flotationsverfahrens kann nur gelingen, wenn während der Druckfarbenablösung Druckfarbenpartikel entstehen, deren Größe sich im Wesentlichen im flotierbaren Bereich von ca. 5 bis 250  $\mu\text{m}$  Durchmesser befindet (vergl. Kap. 2.1.2.1). Diese Frage führt zur Einführung der Hyperwäsche (vergl. Kap. 2.1.3). Mit Hilfe dieser Methode können feindispersierte, nicht flotierbare Druckfarbenpartikel von der Stoffsuspension abgetrennt werden. Die Ergebnisse zeigen aber, dass feindispersierte Druckfarbenpartikel nicht als Ursache für den Weißgradabfall in Frage kommen. Würden diese vorliegen, müssten die Kurven für die um den Aschegehalt korrigierten Weißgrade nach Hyperwäsche infolge des erhöhten Austrags von Druckfarben mit steigender Laccase- und Mediatordosierung eine steigende Tendenz besitzen. Tatsächlich sind aber nach Hyperwäsche die Werte der enzymatisch behandelten Proben niedriger als die der enzymfreien Referenzwerte und die Kurven der um den Aschegehalt bereinigten Weißgrade nach Hyperwäsche besitzen eine mit steigendem Laccase- und Mediatoreinsatz fallende Tendenz (vergl. Kap. 4.2.2.1 bis 4.2.2.3).

Vor allem die Farbortanalyse der helleren Prüfpapiere aus DIP-Stoff (die Prüfpapiere aus Altpapier sind zu dunkel, um deutliche Farbortunterschiede zu erkennen) zeigt, dass es in Folge der Behandlung mit Laccase und Mediator zu einem Abfall der Helligkeit  $L^*$ , zu einem Anstieg der Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  sowie einer Erhöhung des Gelbwertes kommt. Dieser enzymatisch bedingte Effekt weist Parallelen zur licht-

induzierten Vergilbung von ligninhaltigen Faserstoffen auf (vergl. Kap. 2.2). So beobachten ROBERT und DANEAULT (1995) Änderungen der optischen Eigenschaften von TMP-Proben nach Bestrahlung mit Licht im Wellenbereich von 300 bis 420 nm. Weißgrad und Helligkeit  $L^*$  der Faserstoffe sinken. Gleichzeitig steigen die Farbwerte  $a^*$  und  $b^*$  an. Durch die Lichtexposition entstehen am Ligninanteil der Faserstoffe Phenoxylradikale (HEITNER und SCHMIDT, 1991), aus denen sich farbige Chinone bilden (LEARY, 1994; HEITNER und SCHMIDT, 1991). Aus diesen können in anschließenden Reaktionen komplexere Chromophore entstehen (ARGYROPOULOS et al., 1995). Aromatische  $\alpha$ -Carbonylgruppen beschleunigen dabei auf Grund ihrer photosensibilisierenden Wirkung die Bildung von Phenoxylradikalen und das Ausmaß der Vergilbung (HEITNER und SCHMIDT, 1991). Beim Angriff von Laccase (ISHIHARA, 1980; LUNDQUIST und KRISTERSSON, 1985; vergl. Kap. 2.4.1) bzw. des LMS (POPPIUS-LEVLIN et al., 1997 a; CRESTINI et al., 2001; vergl. Kap. 2.4.2.3 & Kap. 2.4.2.4) entstehen am Lignin ebenfalls Phenoxylradikale und aromatische  $\alpha$ -Carbonylgruppen, die in der Folge für die Bildung farbiger, chinoider Strukturen verantwortlich sind. Dieses Phänomen ist auch aus der Lebensmittelchemie bekannt. So wird die Braunfärbung fermentierter Sojaprodukte auf die Entstehung brauner Pigmente zurückgeführt, deren Vorstufen Chinone sind, die aus der Reaktion laccaseähnlicher Enzyme mit Phenolen entstehen (LERTSIRI et al., 2003). Damit können die beobachtete Vergrauung und Vergilbung der Altpapier- und DIP-Proben nach Inkubation mit Laccase bzw. mit dem LMS auf die Ausbildung farbiger Strukturen aus dem Ligninanteil der Sekundärfaserstoffe zurückgeführt werden. Die Versuche zur Inkubation unbedruckten Zeitungsdruckpapiers mit Laccase und HBT (vergl. Kap. 4.2.3) bestätigen dabei, dass der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Effekt von der Anwesenheit von Druckfarben unabhängig ist und untermauern diese Hypothese.

In der anwendungsorientierten Literatur zur Bleiche von Zellstoffen mit Hilfe des LMS werden fast immer nur die Ergebnisse nach einer oder mehreren abschließenden Delignifizierungsstufen diskutiert, wobei es sich bei den Delignifizierungsstufen im Einzelnen um eine alkalische Extraktion, Peroxidbleiche, sauerstoffunterstützte Peroxidbleiche oder Chlordioxidbleiche handeln kann (vergl. Kap. 2.4.3.1 und darin zitierte Literatur). Untersuchungen, die auf die Ergebnisse einer Behandlung von Zellstoffen mit Laccase und Mediator ohne anschließende Delignifizierungsstufe eingehen, kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. So können POPPIUS-LEVLIN et al. (1997 b) nach einer Behandlung mit Laccase und Mediator bei einem Teil der Zellstoffe bereits einen Weißegewinn erzielen, bei den ligninreicheren ist dagegen die zusätzliche Durchführung einer alkalischen Extraktion notwendig. Um Klarheit über den bei den eigenen Versuchen beobachteten Weißeverlust zu erlangen, ist es

daher unerlässlich, in Anschluss an die Flotation des mit Laccase und Mediator inkubierten Sekundärfaserstoffes eine Bleichstufe anzuschließen. Diese wird - orientiert an die Praxis des Deinkings - als ligninerhaltende Bleichstufe durchgeführt. Dabei zeigt sich, dass die durch Laccase bzw. durch Laccase und Mediator verursachte Vergrauung und Vergilbung des DIP nicht vollständig rückgängig zu machen ist.

Um die Ursachen der auch nach einer Peroxidbleichstufe bleibenden Verfärbungen bei der Inkubation von Altpapier mit Laccase und dem LMS genauer charakterisieren zu können, schließen sich Versuche mit definierten Zellstoffen an. Durch die Wahl eines vorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes, einem typischen Substrat für das LMS und durch die Wahl von ligninerhaltend gebleichtem Holzschliff und TMP als typischem Bestandteil von Altpapier, soll untersucht werden, wie diese Stoffe auf die enzymatische Behandlung reagieren und ob es dabei Unterschiede gibt. Dabei werden die Reaktionsbedingungen während der Behandlung mit Laccase und Mediator variiert. Da die typischen Reaktionsbedingungen des LMS (pH-Wert im sauren Bereich, Inkubationsphase unter erhöhtem Sauerstoffdruck) deutlich von den Praxisbedingungen des Neutraldeinkings (pH neutral bis schwach alkalisch, Inkubationsphase bei Luftatmosphäre) abweichen, ist es denkbar, dass das Abweichen von den Optimalbedingungen für ein Versagen des enzymatischen Systems verantwortlich sein könnte. POTTHAST (1998) und KRUUS und VIIKARI (2001) zeigen jedoch in ihren Untersuchungen auch, dass es deutliche Unterschiede bezüglich des Reaktionsspektrums von Laccasen verschiedener Bezugsquellen gibt, was unter anderem mit der Anwesenheit oder dem Fehlen verschiedener Isozyme zusammenhängt. Da es daher auch denkbar ist, dass die in dieser Arbeit für die Deinking-Versuche verwendeten Laccasen von *M. thermophila* und *T. villosa* ungeeignet sind, wird ein weiteres Laccase-Präparat eingesetzt (Laccase von *Trametes versicolor*), von dem bekannt ist, dass mit ihm Zellstoffe erfolgreich delignifiziert und gebleicht werden können (FREUDENREICH et al, 1998). Es werden jedoch mit allen drei Laccasepräparaten nahezu identische Ergebnisse erhalten (vergl. Kap. 4.3.1.1 und Kap. 4.3.1.2), so dass die Frage der Laccasequelle für die Erklärung der unbefriedigenden Ergebnisse bei Deinking und DIP-Stoffbleiche ausscheidet.

Zur Untersuchung der Reaktionsbedingungen werden die Parameter der LMS-Behandlung des zunächst untersuchten Nadelholz-Sulfatzellstoffs schrittweise von den Bedingungen des LMS (pH 4,5; 5 bar Sauerstoffdruck; alkalische Extraktion) an die üblichen Konditionen des Neutraldeinkings angepasst (pH 8, Atmosphärendruck, keine Extraktion).

Bei der schrittweisen Erhöhung des pH-Wertes während der Inkubation zeigt sich, dass die unter sauren Bedingungen nach Extraktion erhaltenen Kappazahlreduzierungen, Weißgradgewinne und Farbortverbesserungen mit steigendem pH-Wert nur noch in abgeschwächter Form zu realisieren sind. Die negative Entwicklung des Weißgrades und der Farbeigenschaften nach der Inkubation mit Laccase und Mediator und deren positive Entwicklung nach Durchführung einer anschließenden Extraktionsstufe machen deutlich, dass ein delignifizierender Schritt nach der enzymatischen Behandlung prinzipiell unverzichtbar ist (vergl. Kap. 4.3.1.1 – 4.3.1.2.1).

Das LMS-System erweist sich auch bei Anwendung unter Luftatmosphäre als funktionstüchtig (vergl. Kap. 4.3.1.2.2). Erst durch eine nachgeschaltete Extraktion können Stoffe erhalten werden, deren Ligninanteile reduziert und bezüglich der Farbeigenschaften und Weißgrade verbessert werden. Die Sauerstoffversorgung hat bei pH 4,5 einen deutlichen Einfluss auf das zu erreichende Ergebnis, was offensichtlich an der höheren Aktivität der Laccasen im sauren Milieu liegt. Hier wird, wie in Kapitel 4.1.2 demonstriert, mit erhöhter Substratumsetzung deutlich mehr Sauerstoff als Cosubstrat verbraucht. Bei neutralem pH-Wert sind dagegen Substrat- und Sauerstoffverbrauch deutlich geringer, so dass kein Stadium erreicht wird, bei dem es zur Einschränkung der Substratumsetzung in Folge von Sauerstoffmangel kommen würde. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich zeigen, dass unter den Bedingungen des Neutraldeinkings die Bedeutung der Sauerstoffversorgung für das resultierende Ergebnis unerheblich ist.

Die Inkubation des Zellstoffes mit Laccase ohne Mediator führt zu Ergebnissen, die weitestgehend mit den Ergebnissen der Versuche übereinstimmen, die mit dem LMS durchgeführt werden (vergl. Kap. 4.3.1.3). Dass der Einsatz von Laccase alleine zu vergleichbaren Ergebnissen wie beim Einsatz des LMS führen kann, erscheint zunächst ungewöhnlich, da in der Literatur in der Regel nur von der delignifizierenden Wirkung des LMS berichtet wird. Doch können auch ALEKSANDROVA et al. (2001) und DE CARVALHO et al. (1999) zeigen, dass der Einsatz von Laccase ohne Mediator zu einer verbesserten Delignifizierung und einer Erhöhung des Weißgrades führen kann. Um erkennen zu können, ob und wo es Unterschiede zwischen dem Einsatz von Laccase und dem Einsatz von Laccase und Mediator gibt, werden Zellstoffproben parallel mit beiden enzymatischen Systemen inkubiert und anschließend eine Probe alkalisch extrahiert und eine weitere einer Peroxidbleiche unterzogen (Kap. 4.3.1.4). Dabei zeigt sich, dass der Einsatz von Laccase und Mediator HBT nur bei saurer Fahrweise nach alkalischer Extraktion bzw. Peroxidbleiche in Verbindung mit einer intensivierten Delignifizierung zu einem Weißegewinn, günstigeren  $L^*$ -,  $a^*$ -,  $b^*$ -Werten und niedrigeren Gelbwerten führt. Unter den Bedingungen des Neutraldeinkings werden dagegen mit Laccase und dem LMS übereinstimmende Ergebnis-

se erzielt. Das heißt, dass der Mediator HBT mit steigendem pH-Wert an Wirksamkeit einbüßt.

Angesprochen werden muss die Frage, warum in dieser Arbeit ausgerechnet HBT als Mediator verwendet wird. Von ABTS und Violursäure ist bekannt, dass sie zu sehr starken Verfärbungen neigen (PAICE et al., 1995 a; BOURBONNAIS und PAICE, 1996; BOURBONNAIS et al., 1998; NELSON et al., 1998; POTTHAST, 1998; RÖMPP, 1995). Außerdem hat Violursäure ein stärkeres Potenzial, die Laccase zu inaktivieren (KRUUS und VIKARI, 2001; LI et al., 1999). Phenothiazine und NHAA besitzen kein reversibles Redoxverhalten, sondern reagieren in stöchiometrischen, stets unwirtschaftlichen Mengen (POTTHAST, 1998). Des Weiteren sind erstere nur bedingt wasserlöslich und bilden letztere toxische Abbauprodukte (FISCHBACH et al., 1984). Erfahrungen über die Anwendung von TEMPO und anderen Mediatoren waren zudem sehr spärlich vorhanden, dagegen ist HBT einer der am intensivsten untersuchten Mediatoren, zu dem zahlreiche Veröffentlichungen vorhanden sind. Im Vergleich zu den anderen Mediatoren scheint er die wenigsten negativen Nachteile zu besitzen. Schließlich erlaubt der zeitliche Rahmen der Arbeit keine weiteren Versuche mit anderen Mediatoren mehr.

Entscheidend für die Untersuchungen über die Anwendbarkeit des LMS-Systems für die Behandlung des sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffs ist, dass das Potential des Systems in Bezug auf Delignifizierung und Weißgradverbesserung nur ausgeschöpft werden kann, wenn die Inkubation unter Sauerstoffdruck im schwach sauren pH-Bereich erfolgt und eine nachfolgende Extraktion durchgeführt wird. Dieser Verfahrensschritt führt zu einer Entfernung des angegriffenen Restlignins und vermag die durch die Ligninmodifizierung erfolgten Weißgradreduzierungen mehr als zu kompensieren.

Vergleicht man die mit dem Zellstoff erzielten Ergebnisse mit den Ergebnissen der Versuche zur Bleichbarkeit des DIP, so scheint es zunächst widersprüchlich, dass es bei Verwendung des Zellstoffes bei Einsatz von Laccase und HBT zu einer Verbesserung der Farbeigenschaften kommt, nicht aber beim DIP. Dabei muss man jedoch bedenken, dass sich der hier verwendete vorgebleichte Nadelholz-Sulfatzellstoff und der holzhaltige DIP deutlich im Ligningehalt unterscheiden.

Die in Anschluss an die Versuche mit dem sauerstoffgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoff durchgeführten Versuche mit Holzschliff und TMP führen schließlich zu Ergebnissen, die mit den Versuchen zum Deinking und Bleichen der Sekundärfaserstoffe übereinstimmen. Bei keinem der Versuche mit Holzschliff oder TMP führen die Inkubationsversuche mit Laccase oder dem LMS nach alkalischer Extraktion oder

Peroxidbleiche zu einer Verbesserung des Weißgrades oder einer Verbesserung der Vergilbung. Vielmehr das Gegenteil ist der Fall. Gleichzeitig ist es nicht möglich, mit Laccase oder dem LMS eine Reduzierung des Ligningehalts zu erzielen.

Dies lässt vermuten, dass die Anwendung von Laccase und Mediator in Kombination mit einer Extraktions- bzw. Bleichstufe nur dann einen Bleicheffekt bewirken kann, wenn eine ausreichend hohe Delignifizierung erzielt wird oder dass ein ausreichend delignifizierter Stoff Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung des LMS mit geringem bleichtechnischem Folgeaufwand ist.

Diese Vermutung belegen Arbeiten anderer Autoren. POTTHAST (1998) behandelte Kiefern-Sulfatzellstoffe mit Hilfe des LMS. Bei bis zu zwei Stunden Inkubationszeit muss das Verfahren, das aus Inkubation mit Laccase und Mediator HBT sowie anschließender Extraktion bestand, dreimal wiederholt werden, um einen Weißgrad zu erzielen, der über dem Ausgangsweißgrad liegt. Die Ausgangskappazahl von 19,3 wird bereits mit der ersten Behandlung reduziert und beträgt nach der dritten Behandlungsrunde 60 Prozent. CHAKAR und RAGAUSKAS (1999 und 2000) untersuchen die Wirkung einer einstufigen LMS-Behandlung ligninreicher Nadelholz-Sulfatzellstoffe (Ausgangskappazahlen 34 bzw. 75) bezüglich Delignifizierung und Weiße. Dabei vergleichen sie die Wirkung einer alkalischen Extraktionsstufe (E) mit durch die Zugabe von Sauerstoff (EO), Wasserstoffperoxid (EP) oder Sauerstoff und Wasserstoffperoxid (EOP) modifizierten Extraktionsstufen. Während beim mit Laccase und HBT behandelten Stoff nach Durchführung der E und EO-Stufe kein Weißegewinn gegenüber dem Ausgangszellstoff erzielt werden kann, wird mit den peroxidunterstützten Bleichstufen ein Weißgradgewinn erzielt. Neben dem Bleicheffekt des Peroxids ist dieser auf die intensivierte Delignifizierung zurückzuführen. DE CARVALHO et al. (1999) behandeln ungebleichten Eukalyptus-Sulfatzellstoff (Ausgangskappazahl 15,5) mit Laccase alleine und unterziehen den Zellstoff anschließend einer Chlordioxidbleichsequenz (EDEDED). Nach Abschluss dieser Behandlung besitzen die Laccase-behandelten Proben im Vergleich zur Referenz die höheren Weißgrade, die wiederum mit niedrigeren Kappazahlen einhergehen.

Die im Ergebnisteil dargestellten Resultate fügen sich in dieses Bild ein. Die Versuche zur Bleiche des sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes führen einhergehend mit der erfolgreichen Delignifizierung ebenfalls zu Weißgraden, die über der enzymfreien Referenz liegen. Die enzymunterstützten Versuche mit den ligninreichen Primärfaserstoffen Holzschliff und TMP führen dagegen zur Vergrauung und Vergilbung, weil eine erfolgreiche Delignifizierung nicht stattfindet.

Das heißt für die Versuche mit AP und DIP: Unter den praxisnahen Bedingungen des Neutraldeinkings kommt es durch die Behandlung mit Laccase und HBT zu einer unmittelbaren Modifizierung und Verfärbung des Lignins. Die ligninerhaltende Peroxidbleiche führt nicht zu einer Reduzierung des Ligningehaltes der holzhaltigen Faserbestandteile, so dass diese Verfärbungen fortbestehen bleiben. Die im Altpapier enthaltenen ligninfreien bzw. ligninarmen hochgebleichten Zellstofffaseranteile sind für den Gesamtbleicheffekt einer an eine Laccase- bzw. Laccase-Mediator-Behandlung anschließende Peroxidbleichstufe nicht relevant. Sie besitzen nur wenig Lignin, so dass durch eine Laccase- bzw. Laccase und Mediator unterstützte Behandlung nur ein geringer Bleicheffekt erzielt werden kann. Eine Verschärfung der Bleichbedingungen in einem Altpapier aufbereitenden Werk zur Delignifizierung der holzhaltigen Fasern verbietet sich, weil dies zu unakzeptablen Ausbeuteverlusten und einer Überlastung der Abwasserreinigungsanlagen führen würde.

Abgesehen davon, dass mit Laccase und Mediator HBT keine Schmutzpunktreduzierung erzielt werden kann, ist damit dieses System, für dessen erfolgreiche Bleiche eine Delignifizierung die Voraussetzung ist, für die Behandlung holzhaltiger Altpapierware keine geeignete Methode.

Es ist damit aber nicht gesagt, dass Laccase bzw. das LMS grundsätzlich für Altpapier ein ungeeignetes System darstellt. Streng sortenreine, holzfreie Altpapierqualitäten und mit Laccase- bzw. dem LMS angreifbare Farbsysteme vorausgesetzt, könnte dieses System im Sinne von FRANKS (2001) immer noch erfolgversprechend sein.

## 5 Zusammenfassung

Laccasen - in Verbindung mit oder ohne Mediator (einem speziellen Katalysator) - besitzen im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen ein weit gefasstes Substratspektrum und können auf Grund des radikalischen Reaktionscharakters eine Vielzahl von Reaktionen katalysieren, die zu verschiedenen Reaktionsprodukten führen. Aus Sicht des Deinkings ist interessant, dass insbesondere veretherte (oxidierte) Strukturen sowie Fette und Harze abgebaut werden können. Fette, Harze und oxidativ ausgehärtete Strukturen sind auch Bestandteile von Druckfarben. Diese könnten Substrate für Laccase bzw. das LMS darstellen. Im Großteil der Publikationen wird belegt, dass Zellstoffe unter Verwendung des Laccase-Mediator-Systems (LMS) im Bereich zwischen pH 4 und pH 6 unter Sauerstoffdruck und nach anschließender alkalischer Extraktion effektiv delignifiziert werden können. Vereinzelt wird auch über Laccase-Applikationen im neutralen bis schwach-alkalischen Bereich ohne Zugabe von Mediatoren berichtet. Bei der Altpapier-Aufbereitung jedoch sind Bleichbehandlungen unter Druck sowie alkalische Extraktionen unüblich. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit die oxidierende Wirkung des LMS unter den abschwächenden Bedingungen des Neutral-Deinkings Verwendung finden könnte, um das Deinking-Ergebnis von holzhaltiger Altpapierware mit Blick auf Druckfarbenablösung und Schmutzpunktreduzierung zu verbessern.

Zunächst wird der pH-Einfluss auf die Aktivierung der Mediatoren ABTS, HBT und Violursäure unter Atmosphärendruck durch Laccasen von *Trametes villosa* L. und *Myceliophthora thermophila* L. untersucht. Der mit Hilfe einer CLARK-Elektrode im neutralen bis schwach alkalischen Bereich gemessene Sauerstoffverbrauch deutete auf eine Aktivierung der Mediatoren durch Laccase hin, wenn auch die Reaktion milder verlief als z.B. bei pH 4,5.

Tatsächlich führen Laccase- bzw. LMS-Behandlungen von künstlich gealterten Drucken zu einer Absenkung des Weißgrades nach Flotation. Dieser Befund gilt auch für Weißgrade von ebenso behandeltem DIP und unbedrucktem Recycling-Papier. Eine signifikante Reduzierung der Schmutzpunktflächen kann nicht nachgewiesen werden. Die Entwicklung der Farbkennzahlen  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  deutet bei diesen Stoffen auf eine Vergilbung des Lignins hin. Weißgradverluste und Vergilbung sind auch durch eine der Flotation nachgeschaltete alkalische Extraktion, Peroxid- oder FAS-Bleiche im Vergleich zur enzymfreien Referenz nicht auszugleichen.

Anschließende Bleichversuche von Primärfasern unter identischen LMS-Bedingungen ergeben ein differenziertes Bild: Sauerstoff-delignifizierter Kiefern-Sulfatzellstoff kann erfolgreich delignifiziert und im Weißgrad verbessert werden,

während Holzschliff und TMP im Ligningehalt konstant bleiben, jedoch an Weißgrad einbüßen und vergilben. Diese Verfärbungen bleiben auch nach einer alkalischen Extraktion bzw. einer Peroxidbleiche bestehen.

Auch wenn das oxidative Potential von Laccase bzw. des LMS-Systems im schwach alkalischen Bereich und unter Atmosphärendruck eingeschränkt ist, reicht es doch noch aus, den Ligninanteil in holzhaltigen Fasern zu modifizieren. Dadurch wird die Grundweiße von Sekundärfaserstoffen abgesenkt und ihre Bleichbarkeit unter ligninerhaltenden Bedingungen erschwert. Neben dem fehlenden Effekt auf die Druckfarbenentfernung ist ein Einsatz von Laccasen infolge der Ligninmodifizierung für die Behandlung holzhaltiger Altpapierware nicht geeignet.

## 6 Literatur

- ABADULLA, E.; TZANOV, T.; COSTA, S.; ROBRA, K.H.; CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G.M. (2000): Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Appl. Environm. Microbiology 66 (8): 3357-3362.
- ACKERMANN, C.; PUTZ, H.-J.; GÖTTSCHING, L. (1997): Effect of alkaline, alkali reduced and neutral pulping conditions on deinking of woodcontaining waste paper grades. 4<sup>th</sup> Research Forum on Recycling (Quebec): 59-66.
- ACKERMANN, C.; PUTZ, H.-J.; GÖTTSCHING, L. (1999 a): Effect of pulping conditions on deinking of wood-containing recovered paper grades: Mechanical and chemical conditions affect the results. Pulp and Paper Canada 100 (4): 37-41.
- ACKERMANN, C.; PUTZ, H.-J.; DOCKAL-BAUR, J.; SELDER, H. (1999 b): Neutraldeinking - Möglichkeiten der Optimierung. Wochenblatt für Papierfabrikation 127 (11/12): 754-764.
- AGEMATU, H.; NAKASHIMA, T.; SHIBAMOTO, N.; SHIN, T.; MURAO, S. (1994): Colorimetric measurement of total activity of leucine aminopeptidase and arylamidase in serum using laccase-catalyzed oxidative decarboxylation. J. Ferment. Bioeng. 77 (5): 479-482.
- ALEKSANDROVA, G.; MEDVEDEVA, S.; RUDYKH, N. (2001): Enzymatic preparation with laccase activity obtained from *Trametes villosus* for use in pulp bleaching. Proc. 11<sup>th</sup>. Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. (Nice), Vol. 3: 435-438.
- ALLISON, R.W.; GRAHAM, K.L. (1990): Kinetics of alkali darkening of TMP from radiata pine. Journal of Pulp and Paper Science 16 (1): J28-J35.
- AMANN, M. (1997): The lignozym® process coming closer to the mill. Proc. 9<sup>th</sup> Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. (Montreal): F4-1 - F4-5.
- AMANN, M. (1999): Mehrkomponentensystem zum Verändern, Abbau oder Bleichen von Lignin, ligninhaltigen Materialien sowie Verfahren zu seiner Anwendung. Europäische Patentanmeldung EP 0905306A1.
- AMITAI, G.; ADANI, R.; SOD-MORIAH, G.; RABINOVITZ, I.; VINCE, A.; LEADER, H.; CHEFETZ, B.; LEIBOVITZ-PERSKY, L.; FRIESEM, D.; HADAR, Y. (1998): Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by laccase. FEBS Lett. 438: 195-200.
- ANDER, P.; ERIKSSON, K.E. (1976): The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Arch. Microbiol. 109 (1-2): 1-8.
- ANDERSEN, S.O. (1985): Sclerotization and tanning cuticle. In: KERKUT, G.A.; GILLERT, L.I. (Hrsg.): Comparative insect physiology, biochemistry and pharmacology, Vol. 3. Oxford: Pergamon Press: 59-64.
- ARGYROPOULOS, D.S.; HEITNER, C.; SCHMIDT, J.A. (1995): Observation of quinoid groups during the light-induced yellowing of softwood mechanical pulp. Res. Chem. Intermed. 9 (3-5): 263-274.
- ARIAS, M.E.; ARENAS, M.; RODRÍGUEZ, J.; SOLIVERI, J.; BALL, A.S.; HERNÁNDEZ, M. (2003): Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. Appl. Environm. Microbiol. 69 (4): 1953-1958.

ASPLER, J. S.; SUI, O.; ZANG, J.-H. (1995): Bonding between vegetable oil inks and cellulose. *Proc. Tech. Assoc. Graphic Arts*. Vol. 2: 894-914.

AURICH, H.G.; WEISS, W. (1973): Aminyloxide, XII: Nachweis und Reaktionen des Benzotriazolyl-1-oxid-Radikals. *Chem. Ber.* 106: 2408-2414.

AURICH, H.G.; BACH, G.; HAHN, K.; KÜTTNER, G.; WEISS, W. (1977 a): Aminyloxides (Nitroxides): Part XXV: Reactions of benzotriazolyl oxide radicals with aromatic compounds. *J. Chem. Research (S)*: 122-123.

AURICH, H.G.; BACH, G.; HAHN, K.; KÜTTNER, G.; WEISS, W. (1977 b): Aminyloxide (Nitroxide) XXV: Reaktionen von Benzotriazolyl-oxid-Radikalen mit Aromaten. *J. Chem. Research (M)*: 1544-1566.

BAKER, W.L.; SBAPATHY, K.; VIBAT, M.; LONERGAN, G. (1996): Laccase catalyzes formation of an indamine dye between 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-dimethylaminobenzoic acid. *Enz. Microbiol. Technol.* 18 (2): 90-94.

BALAKSHIN, M.Y.; CHEN, C.-L.; GRATZL, J.S.; KIRKMAN, A.G.; JAKOB, H. (2000): Biobleaching of pulp with dioxygen in the laccase-mediator system: Part 1. Kinetics of delignification. *Holzforschung* 54: 390-396.

BALAKSHIN, M.; CAPANEMA, E.; CHEN, C.-L.; GRATZL, J.; KIRKMAN, A.; GRACZ, H. (2001): Biobleaching of pulp with dioxygen in the laccase-mediator system - reaction mechanism for degradation of residual lignin. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 13: 1-16.

BAO, W.; O'MALLEY, D.M.; WHETTEN, R.; SEDEROFF, R.R. (1993): A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* 260: 672-674.

BEATSON, R.P.; ZHANG, X.; STEBBING, D.; SADDLER, N.J.; KRUUS, K. (1999): The dissolved and colloidal fractions of white water: Impact on paper quality and degradation by enzymes. *Proc. 10<sup>th</sup> Biennial Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. Mainsymposium (Yokohama)*, Vol. I: 200-203.

BEN, B.; RIVALS, P.; FINGERHUT, U. (1999): Qualitätsverbesserung bei Faserstoffen aus recyclingfähigen Haushaltspapieren durch optimierten Einsatz von Wasserstoffperoxid. *Wochenblatt für Papierfabrikation* 127 (17): 1085-1091.

BERGER, K. (1998): Über den Einsatz von Enzymen zur Entfernung von pflanzenölhaltigen Offsetdruckfarben aus dem Altpapierstoff für Druckpapiere. Dissertation an der Universität Dresden, Fakultät für Maschinenwesen. 203 S.

BEYER, M.; BÄURICH, C.; FISCHER, K. (1995): Mechanismen der licht- und wärme-induzierten Vergilbung von Faserstoffen. *Das Papier* 49 (10A): V8-V14.

BLECHSCHMIDT, J.; ACKERMANN, C. (1991): Chemisch-physikalische Grundlagen des Deinking-Prozesses. *Wochenblatt für Papierfabrikation* 119 (17): 659-661.

BOLLAG, J.M. (1992). Decontaminating soil with enzymes: An in situ method using phenolic and anilinic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 26 (10): 1876-1881.

BOS, J.H.; VEENSTRA, P.; VERHOEVEN, H.; DE VOS, P.D. (1999): *Das Papierbuch. Handbuch der Papierherstellung*. Übersetzt, überarbeitet und ergänzt von Dipl. Ing. M. Staberock. DB Houten: EPN. 608 S.

- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G. (1990): Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267: 99-102.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G. (1992): Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 823-827.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G.; REID, I.D.; LANTHIER, P.; YAGUCHI, M. (1995): Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in Kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (5): 1876-1880.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G. (1996): Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *TAPPI J.* 79 (6): 199-204.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G.; FREIERMUTH, B.; BODIE, E.; BORNEMAN, S. (1997): Reactivities of various mediators and laccase with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (12): 4627-4632.
- BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M.G. (1998): Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochim. Biophys. Acta* 1379: 381-390.
- BRAUN-LÜLLEMAN, A.; MAJCHERCZYK, A.; MAI, C.; NOETZOLD, S.; FASTENRATH, M.; HÜTTERMANN, A. (1998): Intermediate product for manufacturing lignin polymers and its use in manufacturing reagents for making composite materials from plant fibers, waterproof papers and cardboards, and thermosetting plastics from derivatives. Patent WO 9831728.
- BROEREN, L.A. (1989): New technology, economic benefits give boost to secondary fiber use. *Pulp and Paper* 11: 69-74.
- BROWN, D.H.; HITZ, H.R.; SHAFER, L. (1981): The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic wastewater bacteria. Experience with a screening test. *Chemosphere* 10: 245-261.
- BUCHERT, J.; MUSTARANTA, A.; KOTKANEN, H.; KARLSSON, S.; TENKANEN, M.; HOLMBOM, B. (2001): Enzymatic control of wood extractives. *Proc. 11<sup>th</sup> Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. (Nice), Vol. I:* 375-378.
- BÜLOW, C.; HOLZHEY, G.; KIBAT, K.-D. (2002): Anforderungen an die Altpapierqualität. *Wochenblatt für Papierfabrikation* 130 (3): 109-114.
- CAI, W.; MARTIN, R.; LEMAURE, B.; LEUBA, J.-L.; PETIARD, V. (1993): Hydroxyindoles: A new class of laccase substrates. *Plant Physiol. Biochem.* 31 (3): 441-445.
- CALL, H.P. (1990): Europäische Patentanmeldung 0447672A1.
- CALL, H.P.; RAVEN, A.V.; LEYERER, H. (1990): Einsatz von lignolytischen Enzymen bei der Zellstoff- und Papierherstellung (Biopulping, Biobleaching). *Das Papier* 44 (10A): V33-V41.
- CALL, H.-P.; STRITTMATTER, G. (1992): Einsatz von lignolytischen Enzymen in der Papier- und Zellstoffindustrie: Neuere Ergebnisse. *Das Papier* 10 A: V32-V37.
- CALL, H.P. (1994): Verfahren zur Veränderung, Abbau oder Bleiche von Lignin, ligninhaltigen Materialien oder ähnlichen Stoffen. Patent WO94/29510.

CALL, H.P.; MÜCKE, I. (1994): Die enzymatische Bleiche mit dem Laccase-Mediator System (LMS): Labor- und Pilotversuche. In: MILETZKY, F.; BORCHERS, B.; BAUMGARTEN, H. L. (Hrsg.): Enzymtechnik in der Papierindustrie. München: PTS. 5.1-5.9.

CALL, H.-P. (1996): Mehrkomponentensystem zum Verändern, Abbau oder Bleichen von Lignin, ligninhaltigen Materialien oder ähnlichen Stoffen sowie Verfahren zu seiner Anwendung. WO 96/18770.

CALL, H.P.; MÜCKE, I. (1996): The laccase-mediator-system (LMS) – a new concept. In: SREBOTNIK, E.; MESSNER, K.: Proc. 6<sup>th</sup>. Int. Conf. on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Recent Advances in Applied and Fundamental Research. Wien: Facultas-Universitätsverlag: 27-31.

CAMPOS, R.; KANDELBAUER, A.; ROBRA, K.-H.; CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G.M. (2001 a): Indigo degradation with purified laccase from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. J. Biotechnol. 89: 131-139.

CAMPOS, R.; CAVACO-PAULO, A.; ROBRA, K.-H.; SCHNEIDER, M.; GÜBITZ, G. (2001 b): Indigo degradation with laccases from *Polyporus sp.* and *Sclerotium rolfsii*. Textile Res. J. 71 (5): 420-424.

CHAKAR, F.S.; RAGAUSKAS, A.J. (1999): Fundamental investigation of laccase-mediator delignification on high lignin content kraft pulps. Proc. 10<sup>th</sup> Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. Main Symposium (Yokohama), Vol. 1: 566-570.

CHAKAR, F.S.; RAGAUSKAS, A.J. (2000): The kismet of residual lignins during LMS delignification of high-kappa kraft pulps. Holzforschung 54 (6): 647-653.

CHEFETZ, B.; CHEN, Y.; HADAR, Y. (1998): Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. Appl. Environm. Microbiol. 63: 3444-3450.

CHEN, C.-L.; POTTHAST, A.; ROSENAU, T.; GRATZL, J.S.; KIRKMAN, A.G.; NAGAI, D.; MIYAKOSHI, T. (2000): Laccase-catalyzed oxidation of 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-propene using ABTS as mediator. J. Mol. Cat. B: Enzymatic 8: 213-219.

CRESTINI, C.; ARGYROPOULOS, D.S. (1997): The early biodegradation pathways of residual kraft lignin model compounds with laccase. Proc. 9th Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. (Montreal): 20-1 – 20-5.

CRESTINI, C.; ARGYROPOULOS, D.S.; VIIKARI, L. (2001): Oxidation of lignin by the laccase-mediator system: The role of 1-hydroxy benzotriazole. Proc. 11<sup>th</sup> Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. (Nice): 317-320.

CRISS, D.L.; FISCHER, T.H.; SCHULTZ, T.P. (1998): Alkaline hydrolysis of nonphenolic  $\alpha$ -carbonyl  $\beta$ -O-4 lignin dimers substituted on the leaving phenoxide ring: Comparison with benzylic hydroxyl analogues. Holzforschung 52: 57-60.

D'ANNIBALE, A.; STAZI, S.R.; VINCIGUERRA, V.; DI MATTIA, E.; GIOVANNONZI SERMANI, G. (1999): Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. Process Biochem. 34 (6-7): 697-706.

D'ANNIBALE, A.; STAZI, S.R.; VINCIGUERRA, V.; GIOVANNONZI SERMANI, G. (2000): Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. J. Biotechnol. 77 (2-3): 265-273.

- DEC, J.; BOLLAG, J.M. (1990): Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 543-550.
- DE CARVALHO, M.E.A.; MONTEIRO, M.C.; SANT'ANNA, G.L.Jr. (1999): Laccase from *Trametes versicolor*: Stability at temperature and alkaline conditions and its effect on biobleaching of hardwood kraft pulp. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77-79: 723-733.
- DE LA RUBIA, T.; RUIZ, E.; PÉREZ, J.; MARTÍNEZ, J. (2002): Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavidio-alba* induced by vanillin. *Arch. Microbiol.* 179: 70-73.
- DELLWEG, H.; SCHMID, D.; TROMMER, W.E. (Hrsg.) (1992): Römpp Lexikon Biotechnologie. Stuttgart, New York: Thieme. 882 S.
- DIXON, M.; WEBB, E.C. (1965): Enzymes. London und Colchester: Spottiswoode, Ballantyne and Co. Ltd.: 888 S.
- DRIOUICH, A.; LAINÉ, A.-C.; VIAN, B.; FAYE, L. (1992): Characterization and localization of laccase forms in stem and cell cultures of sycamore. *Plant J.* 2 (1): 13-24.
- DUHE, N.V.; HENDRIX, D.L. (1981): Poison ivy relief composition. US Patent 4259318.
- EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K.-E.L. (1996): The lignolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterisation of the laccase. *Appl. Environm. Microbiol.* 62 (4): 1151-1158.
- EGGERT, C. (1997): Laccase-catalyzed formation of cinnabarinic acid responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Microbiol. Res.* 152: 315-318.
- EPA (US Environmental Protection Agency (1996): Best management practices for pollution prevention in the textile industry, EPA, Office of Research and Development. U.S. EPA/625/R-96/004.
- FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P.; Macchitella, D. (2001): An oxidation of alcohols by oxygen with the enzyme laccase and mediation by TEMPO. *Tetrahedron Letters* 42: 7551-7553.
- FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. (2002): Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 16: 231-240.
- FAGERSTRÖM, R.; TENKANEN, M.; KRUUS, K.; BUCHERT, J. (2001): Removal of hexenuronic acid side groups from kraft pulp by laccase/mediator treatment. In: VAHALA, P.; LANTTO, R. (Hrsg.): *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Conf. on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*. Helsinki: VTT Biotechnology: 225-227.
- FAURÉ, D.; BOULLANT, M.L.; BALLY, R. (1994): Isolation of *Azospirillum lipoferum* 4T Tn5 mutants affected in melanization and laccase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3412-3415.
- FELBY, C.; NIELSEN, B.R.; OLESEN, P.O.; SKIBSTED, L.H. (1997): Identification and quantification of radical reaction intermediates by electron spin resonance spectrometry of laccase-catalyzed oxidation of wood fibers from beech (*Fagus sylvatica*). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 459-464.
- FISCHBACH, T.; HERTLE, H.; KIESE, M.; LENK, W.; STERTZL, H.; MEISTER, P. (1984): N-Hydroxy-N-arylacetamides: I. Toxicity of certain polycyclic and monocyclic N-hydroxy-N-arylacetamides in rats. *Arch. Toxicol.* 56: 96-105.

FITZHENRY, J.W.; HOEKSTRA, P.M.; GLOVER, D.E. (2000): Enzymatic stickies control in MOW, OCC, and ONP furnishes. Proc. Tappi Pulping Conf.:

FLINK, J.; EK, M. (1997): The effects on lignin structure from treatment of pulp with activated 1-hydroxybenzotriazole. Proc. 9<sup>th</sup> Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. (Montreal): G2-1 – G2-4.

FRANK, E. (1993): Untersuchungen zur Deinkbarkeit von Heatsetdrucken. Wochenblatt für Papierfabrikation 22: 949-951.

FRANKE, W. (Hrsg.) (1993): Prüfung von Papier, Pappe, Zellstoff und Holzstoff. Band 2: Mikroskopische und photometrische Verfahren. Berlin: Springer. 431 S.

FRANKS, N.E.; MUNK, N. (1995): Alkaline cellulases and the enzymatic deinking of mixed office waste. Proc. Tappi Pulping Conf.: 343-347.

FRANKS, N.E. (2001): Methods for deinking and decolorizing printed paper. United States Patent US6241849B1.

FREUDENREICH, J.; AMANN, M.; FRITZ-LANGHALS, E.; STOHRER, J.: (1998): Understanding the Lignozym<sup>®</sup> prozess. Proc. International Pulp Bleaching Conf. (Helsinki): 71-76.

FRITZ-LANGHALS, E.; KUNATH, B. (1998): Synthesis of aromatic aldehydes by laccase-mediator assisted oxidation. Tetrahedron Lett. 39: 5955-5956.

FU, S.; ZHAN, H.; YU, H. (1999): Biobleaching of eucalyptus urophilla kraft pulp by laccase and mediator. Proc. 10<sup>th</sup> Biennial Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. Main Symposium (Yokohama): 76-78.

FUENTES, J.L.; ROBERT, M.; MULLER, R. (1988): Procédé de traitement d'une pâte papetière par une solution enzymatique. Französisches Patent FR 0262040.

FUKUDA, T.; UCHIDA, H.; TAKASHIMA, Y.; UWAJIMA, T. (2001): Degradation of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. Biochem. Biophys. Research Communications 284: 704-706.

GEIGER, J.P.; RIO, B.; NANDRIS, D.; NICOLE, M. (1986 a): Laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*: 1. Purification and some physiochemical properties. Appl. Biochem. Biotechnol. 12: 121-133.

GEIGER, J.P.; HUGUENIN, B.; NICOLE, M.; NANDRIS, D. (1986 b): Laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*: II. Effect of *Rigidoporus lignosus* laccase L1 on thioglycolic lignin of *Hevea*. Appl. Biochem. Biotechnol. 13: 97-110.

GHINDILIS, A.L.; GAVRILOVA, V.P.; YAROPOLOV, A.I. (1992): Laccase-based biosensors for determination of polyphenols: Determination of catechols in tea. Biosensors & Bioelectronics 7: 127-131.

GIERER, J.; LIN, S.Y. (1972): Photodegradation of lignin. A contribution to the mechanism of chromophore formation. Svensk Papperstidn. 75 (7): 233-239.

GIGI, O.; MARBACH, I.; MAYER, A.M. (1981): Properties of gallic acid-induced extracellular laccase of *Botrytis cinerea*. Phytochemistry 20: 1211-1213.

GÖTTSCHING, L.; PAKARINEN, H. (2000): Recycled fiber and deinking. Helsinki: Fapet Oy. 649 S.

- GÖTTSCHING, L. (2001): Altpapier als unentbehrlicher Rohstoff für graphische Papiere, Verpackungspapiere und Karton sowie Tissue-Papier. Wochenblatt für Papierfabrikation 129 (9): 584-589.
- GRATZL, J. (1985): Lichtinduzierte Vergilbung von Zellstoffen – Ursachen und Verhütung. Das Papier 113 (10A): V14-V23.
- HANECKER, E.; WELT, T. (1995): Über den Einfluß der Zerkleinerungsbedingungen auf das Deinkingergebnis. Wochenblatt für Papierfabrikation 123 (6): 234-241.
- HANECKER, E. (1996): Wirkungsweise von Deinking-Chemikalien. In: BAUMGARTEN, H.L. (Hrsg.): Altpapierstofftechnik. Dresden: Selbstverlag für Papiertechnik: 5-1 - 5-18.
- HATAKKA, A. (1994): Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation. FEMS Microbiology Reviews 13: 125-135.
- HEISE, O.U.; UNWIN, J.P.; KLUNGNESS, J.H.; FINERAN, W.G.; SYKES, M.; ABUBAKR, S. (1996): Industrial scaleup of enzyme-enhanced deinking of nonimpact printed toners. Tappi J. 79 (3): 207-212.
- HEITNER, C.; SCHMIDT, J.A. (1991): Light-induced yellowing of wood-containing papers: A review of fifty years of research. Proc. 6<sup>th</sup> Int. Symp. on Wood and Pulping Chem.: 131-149.
- HERRMANN, H. (1999): Die enzymatisch unterstützte Druckfarbenablösung in einem neutralen Verfahren. Dissertation an der Technischen Universität Dresden, Fakultät Maschinenwesen. 180 S.
- HIGUCHI, T. (1990): Lignin biochemistry – biosynthesis and biodegradation. Wood Sci. Technol. 24: 23-63.
- HÜNIG, S.; BALLI, H.; CONRAD, H.; SCHOTT, A. (1964): Über zweistufige Redoxsysteme, III: Polarographie von 2.2'-Azinen aromatischer Heterozyklen. Liebigs Ann. Chem. 676: 52-65.
- HÜTTERMANN, A.; HERCHE, C.; HAARS, A. (1980): Polymerization of water-insoluble lignins by *Fomes annosus*. Holzforschung 34 (2): 64-66.
- HÜTTERMANN, A.; CLAUS, G.; HÖPPNER, M.; MAJCHERCZYK, A.; BRAUN-LÜLLEMANN, A. (1998): Zwischenprodukt für die Herstellung von Ligninpolymerisaten und dessen Verwendung für die Herstellung von Dämmstoffen aus Ligninderivaten und Stroh. Patent DE 19700905 A1.
- ISHIHARA, T.; MIYAZAKI, M. (1972): Oxidation of milled wood lignin by fungal laccase. Mokuzai Gakkaishi 18 (8): 415-419.
- ISHIHARA, T.; ISHIHARA, M. (1976): Oxidation of syringic acid by fungal laccase. Mokuzai Gakkaishi 22 (6): 371-375.
- ISHIHARA, T. (1980): The role of laccase in lignin biodegradation. In: Kirk, K.T.; HIGUCHI, T.; CHANG, H.-M (Hrsg.): Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry, and potential applications. Boca Raton: CRC Press: 17-31.
- JACKSON, L.S.; HEITMANN, J.A.; JOYCE, T.W. (1993): Enzymatic modification of secondary fiber. Tappi J. 76 (3): 147-154.

JACKSON, L.S.; HEITMANN, J.A.; JOYCE, T.W. (1994): Visualization of enzyme bindings to secondary fiber silver-enhanced colloidal gold. Progress Pap. Rec. 3 (2): 32-41.

JAKOB, H.; DEL GROSSO, M.; KÜVER, A.; NIMMERFROH, N.; SÜSS, H.U. (1999): Delignifizierung von Zellstoff mit Laccase und Mediator - ein Konzept der Zukunft? Das Papier 2: 85-95.

JANSON, J. (1993): Kann die Vergilbung von Papier vermieden werden? Das Papier 118 (10A): V47-V52.

JEFFRIES, T.W.; KLUNGNESS, J.H.; SYKES, M.S.; RUTLEDGE-CROPEY, K.R. (1994): Comparison of enzyme-enhanced with conventional deinking of xerographic and laser-printed paper. Tappi J. 77 (4): 173-179.

JEFFRIES, T.W.; SYKES, M.S.; RUTLEDGE-CROPEY, K.; KLUNGNESS, J.H.; ABUBAKR, S. (1996): Enhanced removal of toners from office waste papers by microbial cellulases. In: SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. (Hrsg.): Proc. 6<sup>th</sup> Int. Conf. on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Recent Advances in Applied and Fundamental Research. Wien: Facultas-Universitätsverlag: 141-144.

JETTEN, J.M.; VAN DEN DOOL, R.; VAN HARTINGSVELDT, W.; BESEMER, A.C. (2000): Process for selective oxidation of cellulose. Patent WO 00/50463.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A.; HÜTTERMANN, A. (1996): Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46 (3): 313-317.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A.; HÜTTERMANN, A. (1998): Oxidation of acenaphthene and acenaphthylene by the laccase of *Trametes versicolor* in a laccase-mediator system. J. Biotechnol. 61: 151-156.

KANDIOLLER, G.; CHRISTOV, L. (2001 a): Efficiency of *Trametes versicolor* laccase-mediator systems in pulp delignification and bleaching. IN: VAHALA, P.; LANTTO, R. (Hrsg.): 8<sup>th</sup> ICBPPI, Helsinki, Finland, June 4-8, 2001: 223-224.

KANDIOLLER, G.; CHRISTOV, L. (2001 b): Evaluation of the delignification and bleaching abilities of selected laccases with HBT on different pulps. ACS Symp. Ser. 785 (Oxidative Delignification Chemistry): 427-443.

KARLSON, P.; DOENECKE, D.; KOOLMAN, J. (1994): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Stuttgart, New York: Thieme. 580 S.

KARLSSON, ST.; HOLMBOM, B.; SPETZ, P.; MÜSTRANTA, A.; BUCHERT, J. (2001): Reactivity of *Trametes laccases* with fatty and resin acids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: 317-320.

KAWAI, S.; UMEZAWA, T.; SHIMADA, M.; HIGUSHI, T.; MOROHOSHI, N.; HARAGUSHI, T.; KOIDE, T.; NISHIDA, T. (1987): C $\alpha$ -C $\beta$  cleavage of phenolic  $\beta$ -1 lignin substructure model compound by laccase of *Coriolus versicolor*. Mokuzai Gakkaishi 33 (10): 792-797.

KAWAI, S.; UMEZAWA, T.; SHIMADA, M.; HIGUSHI, T. (1988 a): Aromatic ring cleavage of 4,6-di(tert-butyl)guaiacol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Coriolus versicolor*. FEBS Lett. 236 (2): 309-311.

- KAWAI, S.; UMEZAWA, T.; HIGUCHI, T. (1988 b): Degradation mechanism of phenolic  $\beta$ -1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. Arch. Biochem. Biophys. 262: 99-110.
- KAWAI S.T.; UMEZAWA, T.; HIGUCHI T. (1989): Oxidation of methoxylated benzyl alcohol by *Coriolus versicolor* in the presence of syringaldehyde. Wood Res. 76: 10-16.
- KAWAI, S.; ASUKAI, M.; OHYA, N.; OKITA, K.; ITO, T., OHASHI, H. (1999 a): Degradation of a non-phenolic  $\beta$ -O-4 substructure and of polymeric lignin model compounds by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. FEMS Microbiology Letters 170: 51-57.
- KAWAI, S.; NAKAGAWA, M.; OHASHI, H. (1999 b): Aromatic ring cleavage of a non-phenolic  $\beta$ -O-4 lignin model dimer by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. FEBS Letters 446: 355-358.
- KEITH W.; WALKER, J. (Hrsg.) (2000): Principles and techniques of practical biochemistry. Cambridge: Cambridge University Press.
- KHARAZIPOUR, A.; HÜTTERMANN, A.; PLUM, K.-H. (1993): Verfahren zum Verkleben von anorganischen Materialien. Patent DE 4204793 C1.
- KHARAZIPOUR A.; HÜTTERMANN, A.; LÜDEMANN, H.D. (1997): Enzymatic activation of wood fibers as a means for the production of wood composites. J. Adhesion Sci. Technol. Vol. 11 (3): 419-427.
- KHARAZIPOUR, A.; MAI, C.; HÜTTERMANN, A. (1998): Polyphenols for compounded materials. Polym. Degrad. Stabil. 59: 237-243.
- KIBAT, K.-D. (2000): Herausforderungen und Chancen für den Altpapiereinsatz im neuen Jahrzehnt. Wochenblatt für Papierfabrikation 128 (14/15): 965-974.
- KIBAT, K.-D. (2002): Der Altpapiereinsatz der europäischen Papierindustrie – Entwicklung und veränderte politische Rahmenbedingungen. In: MURR, J.; GALLAND, G.; HANECKER, E. (Hrsg.): 10. PTS-CTP – Deinking-Symposium. Vortragsband: 1-1 – 1-16.
- KIM, T.-J.; OW, S. S.-K.; EOM, T.-J. (1991): Enzymatic deinking method of wastepaper. Proc. Tappi Pulping Conf.: 1023-1030.
- KIRK, T.K.; FARRELL, R.L. (1987): Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. Ann. Rev. Microbiol. 41: 465-505.
- KRASTANOV, A. (2000): Removal of phenols from mixtures by co-immobilized laccase/tyrosinase and polyclar adsorption. J. Industrial Microbiol. Biotechnol. 24: 383-388.
- KRAUTHAUF, E.; WIESE, H. (1998): Die Entwicklung der Rezyklierbarkeit von graphischen Altpapieren. PTS-CTP – Deinking-Symposium. Vortragstexte: 2/1-2/8.
- KRUUS, K.; VIKARI, L. (2001): Comparison of various mediators and fungal laccases (Posterpresentation). In: VAHALA, P.; LANTTO, R. (Hrsg.): Proc. 8th Int. Conf. on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Helsinki: VTT Biotechnology. 117-118.
- KURTZ, B.; CHAMPE, S.P. (1982): Purification and characterization of the conidial laccase of *Aspergillus nidulans*. J. Bacteriol. 151 (3): 1338-1345.

LEARY, G. (1994): Recent progress in understanding and inhibiting the light-induced yellowing of mechanical pulps. *Journal of Pulp and Paper Science* 20 (6): J154-J160.

LEATHAM, G.F.; STAHMANN, M.A. (1981): Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: Specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *J. Gen. Microbiol.* 125: 147-157.

LEONOWICZ, A.; EDGEHILL, R.U.; BOLLAG, J.-M. (1984): The effect of pH on the transformation of syringic acid and vanillic acid by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. *Arch. Microbiol.* 137: 89-96.

LEONOWICZ, A.; SZKLARZ, G.; WOJTASWASILEWSKA, M. (1985): The effect of fungal laccase on fractionated lignosulfonates (Peritan Na). *Phytochemistry* 24 (3): 393-396.

LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, D.; ZIEGENHAGEN, M.; WOJTASWASILEWSKA, M.; CHO, N.-S.; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. (1999): Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genet. Biol.* 27 (2-3): 175-185.

LEONTIEVSKY, A.A.; MYASOEDOVA, N.M.; BASKUNOV, B.P.; GOLOVLEVA, L.A.; BUCKE, C.; EVANS, C.S. (2001): Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal laccase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Published online: 26 July 2001.

LERTSIRI, S.; PHONTREE, K.; THEPSINGHA, W.; BHUMITATANA, A. (2003): Evidence of enzymatic browning due to laccase-like enzyme during mash fermentation in Thai soybean paste. *Food Chemistry* 80: 171-176.

LI, K.; XU, F.; ERIKSSON, K.-E.L. (1999): Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Appl. Environm. Microbiology* 65 (6): 2654-2660.

LITVINTSEVA, A.P.; HENSON, J.M. (2002): Cloning, Characterization, and Transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. *Appl. Environm. Microbiol.* 68 (3): 1305-1311.

LOPEZ, D.; VIDAL, T.; COLOM, J.F.; TORRES, A.L. (2001): Treatment with amylases before the disintegration for deinking operation. In: VAHALA, P.; LANTTO, R. (Hrsg.): *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Conf. on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* Helsinki: VTT Biotechnology: 271-272.

LUND, H.; KWEE, S. (1968): Electroörganic preparations: XXV. Polarography and reduction of benzotriazole and related compounds. *Acta Chem. Scand.* 22: 2879-2889.

LUND, M.; ERIKSSON, M.; FELBY, C. (2003): Reactivity of a fungal laccase towards lignin in softwood kraft pulp. *Holzforschung* 57 (1): 21-26.

LUNDQUIST, K.; KRISTERSSON, P. (1985): Exhaustive laccase-catalysed oxidation of a lignin model compound (vanillyl glycol) produces methanol and polymeric quinoid products. *Biochem. J.* 229: 227-279.

MAI, C.; HUETTERMANN, A. (1998): Peroxides are necessary for the enzymic synthesis of copolymers of lignin or phenols with acrylates. *Proc. 7<sup>th</sup> Int. Conf. on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* (Montreal), Vol. B: B233-B236.

MAJCHERCZYK, A.; JOHANNES, C.; HÜTTERMANN, A. (1998): Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 22: 335-341.

- MATHIASSEN, T.E. (1995): Laccase and beer storage. Patent WO 9521240 A2.
- MESSERSCHMIDT, A.; HUBER, R. (1990): The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. Eur. J. Biochem. 187: 341-352.
- McCOOL, M.A. (1993): Flotation Deinking. Chapter 15. In: SPANGENBERG, R.J. (Hrsg.): Secondary Fiber Recycling. Atlanta: Tappi: 141-162.
- MINUSSI, R.C.; CORDI, L.; PASTORE, G.; DURAN, N. (2001): Laccase-mediators acting on E<sub>1</sub> bleaching effluent. Proc. 6th. Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and other Wood Components: Vol. III: 315-318.
- MOROHOSHI, N.; WARIISHI, H.; MURAI, S.; NAGAI, T.; HARAGUCHI, T. (1987): Degradation of lignin by the extracellular enzymes of *Coriolus versicolor* IV: Properties of three laccase fractions fractionated from the extracellular enzymes. Mokuzai Gakkaishi 33 (3): 218-225.
- MUHEIM, A.; FIECHTER, A.; HARVEY, P.J.; SCHOEMAKER, H.E. (1992): On the mechanism of oxidation of non-phenolic lignin model compounds by the laccase-ABTS couple. Holzforschung 46 (2): 121-123.
- NC-IUBMB (1992): Enzyme nomenclature 1992: Recommendations of the nomenclature. Committee of the international union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzymes. Prepared for NC-IUBMB by Edwin Clifford Webb. San Diego: Academic Press: 862 S.
- NELSON, P.J.; CHIN, C.W.J.; VIKARI, L.; TENKANEN, M. (1998): The use of a laccase mediator stage in bleaching eucalypt kraft pulp. Appita J. 51: 451-455.
- N.N. (1979): Meyers Enzyklopädisches Lexikon: Band 8: Enz – Fiz. Mannheim, Wien Zürich: Bibliographisches Institut, Lexikonverlag. S. 14-17.
- N.N. (2000): Europäische Erklärung zur Wiederverwertung von Papier. Confederation of European Paper Industries (CEPI) & European Recovered Paper Association (ERPA), November 2000. Aus dem Internet: <http://www.vdp-online.de/Presse/Presse.html>.
- NOVO NORDISK (o.J. a): Product Information Sheet B 1022a-GB.
- NOVO NORDISK (o.J. b): Product Information Sheet B 1024a-GB.
- NOVO NORDISK (1996): Annual Report, S.19.
- NOVO NORDISK (1997): A revolutionary red way to bleach blue denim. Novo Nordisk Quarterly Biotimes Magazine 1: 4-6.
- NUTSUBIZDE, N.N.; SARKANEN, S.; SCHMIDT, E.L.; SHASHIKANTH, S. (1998): Consecutive polymerization and depolymerization of kraft lignin by *Trametes cingulata*. Phytochemistry 49 (5): 1203-1212.
- O'MALLEY, D.M.; WHETTEN, R.; BAO, W.; CHEN, C.-L.; SEDEROFF, R. (1993): The role of laccase in lignification. Plant J. 4: 751-757.
- OSIADACZ, J.; AL-ADHAMI, A.J.H.; BAJRASZEWSKA, D.; FISCHER, P.; PECZYŃSKA-CZOCH, W. (1999): On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. J. Biotechnol. 72: 141-149.

OW, S.S.-K.; EOM, T.J. (1990): Biological deinking method of newsprint wastepaper. Proc. EUCEPA Symp. Additives, Pigments and Fillers in Pulp and Paper Industries: 85-94.

OW, S.K.; PARK, J.-M.; HAN, S.-H. (1996): Effects of enzyme on ink size and distribution during the enzymatic deinking process of old newsprint. In: SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. (Hrsg.): Proc. 6<sup>th</sup> Int. Conf. on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Recent Advances in Applied and Fundamental Research. Wien: Facultas-Universitätsverlag. 163-168.

PAICE, M.G.; BOURBONNAIS, R.; REID, I.D.; ARCHIBALD, F.S.; JURASEK, L. (1995 a): Oxidative bleaching of enzymes: A review. Journal of Pulp and Paper Science 21 (8): J280-J284.

PAICE, M.G. ; BOURBONNAIS, R.; REID, ID. (1995 b): Bleaching kraft pulps with oxidative enzymes and alkaline hydrogen peroxide. Tappi J. 78 (9): 161-169.

PAICE, M.G.; BOURBONNAIS, R.; REID, I.D.; ARCHIBALD, F.S. (1997): Kraft pulp bleaching by redox enzymes. Proc. 9<sup>th</sup> Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. (Montreal): PL1-1 - PL1-4.

PAICE, M.G.; BOURBONNAIS, R.; ARCHIBALD, F.S.; REID, I.D.; RENAUD, S.; ROCHEFORT, D. (1999): Delignification mechanisms for the bleaching of Kraft pulps with the enzymes laccase and manganese peroxidase. Proc. 10<sup>th</sup> Biennial Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. (Yokohama): Vol. 1: 578-582.

PAULSSON, M.; RAGAUSKAS, A.J. (1998): Chemical modification of lignin-rich paper. Part 9. Effect of dry heat and moist heat on the accelerated yellowing of untreated and acetylated high-yield pulps. Nordic Pulp Pap. Res. J. 13 (3): 191-197.

PEGELOW, U.; NELLESSEN, B. (1998): Teilmechanismen des Deinkens - Weißgradiententwicklung bei neutraler und alkalischer Fahrweise. Wochenblatt für Papierfabrikation 126 (11/12): 508-510.

PETER, M.G.; WOLLENBERGER, U. (1997): Phenol-oxidizing enzymes: Mechanisms and applications in biosensors. In: SCHELLER, F.W.; SCHUBERT, F.; FEDROWITZ, J. (Hrsg.): Frontiers in biosensorics: 1. Fundamental aspects. Basel: Birkhäuser: 63-82.

PETERSEN, B.R.; MATHIASSEN, T.E. (1996): Deoxygenation of a food item using a laccase. Patent WO 9631133.

PIACQUADIO, P.; DE STEFANO, G.; SAMMARTINO, M.; SCIANCALEPORE, V. (1997): Phenols removal from apple juice by laccase immobilized on Cu<sup>2+</sup>-chelate regenerable carrier. Biotechnology Techniques 11 (7): 515-517.

POMMIER, J.-C.; FUENTES, J.-L.; GOMA, G. (1989): Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry. Part I: The basic laboratory work. Tappi J. 72 (6): 187-191.

POMMIER, J.C.; GOMA, G.; FUENTES, J.L.; ROUSSET, C.; JOKINEN, O. (1990): Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry: Part 2: Industrial application. Tappi J. 73 (12): 197-201.

POPPIUS-LEVLIN, K.; WANG, W.; TAMMINEN, T.; HORTLING, B.; VIKARI, L.; NIKU-PAAVOLA, M.-L. (1997 a): Effects of laccase/HBT treatment on pulp and lignin structures. Proc. 9<sup>th</sup> Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. (Montreal): F3-1 - F3-5.

POPPIUS-LEVLIN, K.; WANG, W.; RANUA, M.; NIKU-PAAVOLA, M.-L.; VIIKARI, L. (1997 b): Biobleaching of chemical pulps by laccase/mediator systems. Proc. Tappi Biological Sciences Symposium: 327-333.

POTTHAST, A.; ROSENAU, T.; CHEN, C.L.; GRATZL, J.S. (1995): Selective enzymatic oxidation of aromatic methyl groups to aldehydes. J. Org. Chem. 60: 4320-4321.

POTTHAST, A.; ROSENAU, T.; CHEN, C.L.; GRATZL, J.S. (1996): A novel method for the conversion of benzyl alcohols to benzaldehydes by laccase-catalyzed oxidation. J. Mol. Cat. A 108: 5-9.

POTTHAST, A.; KOCH, H. (1997): The laccase-mediator-system - Reaction with model compounds and pulp. Proc. 9<sup>th</sup> Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. (Montreal): F2-1 – F2-4.

POTTHAST, A. (1998): Untersuchungen zum Laccase-Mediator-System. Dissertation an der Universität Dresden, Fakultät Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften. 212 S.

POTTHAST, A.; ROSENAU, T.; FISCHER, K. (2001): Oxidation of benzyl alcohols by the laccase-mediator system (LMS) – a comprehensive kinetic description. Holzforschung 55: 47-56.

PRASAD, D.Y.; HEITMANN, J.A.; JOYCE, T.W. (1992): Enzyme deinking of black and white letterpress printed newsprint waste. Progress Pap. Rec. 1 (3): 21-30.

PRASAD, D.Y.; HEITMANN, J.A.; JOYCE, T.W. (1993): Enzymatic deinking of colored offset newsprint. Nordik Pulp Paper Res. J. 8 (2): 284-286.

PUTZ, H.J.; WU, S.; GÖTTSCHING, L. (1990): Enzymatische Behandlung von Altpapier. Das Papier 44 (10A): V42-V48.

PUTZ, H.-J.; GÖTTSCHING, L.; RENNER, K.; JOKINEN, O. (1994): Enzymatic deinking in comparison with conventional deinking of offset news. In: Proc. Tappi Pulping Conference: 877-884.

PUTZ, H.-J. (1996): Steigende Altpapiererfassung und ihre Konsequenzen für die Qualitätseigenschaften verschiedener Altpapiersorten. Wochenblatt für Papierfabrikation 124 (3): 74-79.

REINHAMMAR, B.; MALMSTRÖM, B.G. (1981): "Blue" copper-containing oxidases. In: SPIRO, T.G. (Hrsg.): Copper proteins: Metall ions in biology. New York: John Wiley and Sons: 109-149.

REINHARD, E.; KREIS, W.; RIMPLER, H. (1995): Pharmazeutische Biologie 1: Cytologie, Genetik, Physiologie, Viren, Bakterien, Pilze, Algen, Morphologie, Histologie und Anatomie des Kormus, Samenpflanzen. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: 603 S.

RENNER, K.; PUTZ, H.-J.; GÖTTSCHING, L. (1996): Zusammensetzung und Qualität holzhaltiger und holzfreier Deinkingware. Wochenblatt für Papierfabrikation 124 (14/15): 662-666.

RENNER, K.; PUTZ, H.-J.; GÖTTSCHING, L.; BILITEWSKI, B. (2002): Verbesserung der Qualität von Deinkstoffen durch getrennte Erfassung von grafischem Altpapier. Wochenblatt für Papierfabrikation 130 (7): 440-447.

REYES, P.; PICKARD, M.A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. (1999): Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. *Biotechnol. Lett.* 21: 875-880.

ROBERT, S.; DANEALU, C. (1995): Yellowing mechanism and kinetics of thick handsheets of softwood thermomechanical pulp. *J. Wood Chem. Technol.* 15 (1): 113-133.

RÖMPP (1995): CD RÖMPP - Chemielexikon - Version 1.0. Stuttgart: Thieme.

RØRING, A.; HAYNES, R.D. (1998): What are the benefits and barriers of neutral deinking? *Progress in Paper Recycling* (5): 73-79.

ROSA, M.A.; DURAN, N. (2001): Covalent immobilized laccase on activated montmorillonite acting on kraft E1 bleaching effluent. 7<sup>th</sup> Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and other Wood Composites (Brazil): Poster presentation: 331-335.

ROSATZIN, T.; KÜNZI, W.; SANER, M.; HANECKER, E. (2000): Druckfarbenablösung und Entfernung durch Kombination geeigneter Tenside. *Wochenblatt für Papierfabrikation* 128 (18): 1210-1214.

ROY, B.P.; ARCHIBALD, F. (1994): An indirect free radical-based assay for the enzyme cellobiose-quinone oxidoreductase. *Anal. Biochem.* 216 (2): 291-298.

SALAS, S.D.; BENNETT, J.E.; KWONG-CHUN, K.J.; PERFECT, J.R.; WILLIAMSON, P.R. (1996): Effect of the laccase gene, CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J. Exp. Med.* 184: 377-386.

SANCIOLO, P.; WARNOCK, H.; HARDING, I.; FORBES, L.; LONERGAN, G. (2000): Microscopy study: Liberation of ink from fibers during enzymatic deinking of mixed office papers. *Progress Pap. Rec.* 9 (3): 22-30.

SANNIA, G.; GIARDINA, P.; LUNA, M.; ROSSI, M.; BUONOCORE, V. (1986): Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol. Lett.* 8 (11): 797-800.

SAPARRAT, M.C.N.; GUILLÉN, F.; ARAMBARRI, A.M.; MARTÍNEZ, A.T.; MARTÍNEZ, M.J. (2002): Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Appl. Environm. Microbiol.* 68 (4): 1534-1540.

SARIASLANI, F.S.; BEALE, J.M. Jr.; ROSAZZA, P. (1984): Oxidation of rotenone by *Polyporus anceps* laccase. *J. Nat. Prod.* 47: 692-697.

SBAGHI, M.; JEANDET, P.; BESSIS, R.; LEROUX, P. (1996): Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. *Plant Pathol.* 45: 139-144.

SCHEEL, T.; HOLKER, U.; LUDWIG, S.; HOFER, M. (1999): Evidence for and expression of a laccase gene in three basidiomycetes degrading humic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 66-69.

SCHLIEPHAKE, K.; MAINWARING, D.E.; LONERGAN, G.T.; JONES, I.K.; BAKER, W.L. (2000): Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme Microbial. Technol.* 27: 100-107.

SCHMID, H.; SCHWINGER, K. (1994): Erste Betriebserfahrungen mit dem Flotationsdeinking von gemischter Sammelware im neutralen pH-Bereich. *Wochenblatt für Papierfabrikation* 122 (5): 170-177.

SCHMID, H. (1995): 1. Deinkinganlage zur Aufbereitung von Haushaltssammelware im neutralen pH-Bereich. Wochenblatt für Papierfabrikation 123 (14/15): 621-626.

SCHMIDT, J.A.; HEITNER, C. (1993): Light-induced yellowing of mechanical and ultra-high yield pulps. Part 2. Radical-induced cleavage of etherified guaiacylglycerol- $\beta$ -arylether group is the main degradative pathway. J. Wood Chem. Technol. 13 (3): 309-325.

SCHNEIDER, P.; PEDERSEN, A. (1995): Enhancement of laccase reactions. Patent WO 95/01426.

SCHNEIDER, P.; CASPERSEN, M.B.; MONDORF, K.; HALKIER, T.; SKOV, L.K.; ØSTERGAARD, P.R.; BROWN, K.M.; BROWN, S.H.; XU, F. (1999): Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. Enzyme Microbial. Technol. 25: 502-508.

SCHWINGER K.; SCHMID, H. (1994): Neutropur: Neues Verfahren zur Aufbereitung von Haushaltssammelware im neutralen pH-Bereich. Deutsche Papierwirtschaft (1): T67-T68.

SCHWINGER, K. (1995): Neutropur – Grundlegendes über das neue Verfahren zur Aufbereitung von Haushaltssammelware im neutralen pH-Bereich. Wochenblatt für Papierfabrikation 123 (19): 856-859.

SCOTT, S.L.; CHEN, W.-J.; BAKAC, A.; ESPENSON, J.H. (1993): Spectroscopic Parameters, Electrode Potentials, Acid Ionization Constants and Electron Exchange Rates of the 2,2'-Azinobis(3ethyl-benzothiazoline-sulfonate) Radical and Ions. J. Phys. Chem. 97: 6710-6714.

SEALEY, J.; RAGAUSKAS, A.J. (1996): Residual lignin studies of laccase delignified Kraft pulps. Proc. 4<sup>th</sup> European Workshop on Lignocellulosis and Pulp (Stresa): 171-179.

SEALEY, J.; RAGAUSKAS, A. (1997): Fundamental investigations into the chemical mechanism involved in laccase mediator bleaching. Proc. 9<sup>th</sup> Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. (Montreal): F1-1 – F1-4.

SEALEY, J.; RAGAUSKAS, A.J. (1998): Residual lignin studies of laccase-delignified kraft pulps. Enzyme Microbial Technol. 23: 422-426.

SJÖHOLM, R.; HOLMBOM, B., ÅKERBACK, N. (1992): Studies of the photodegradation of spruce lignin by NMR spectroscopy. J. Wood Chem. Technol. 12 (1): 35-52.

SOARES, G.M.B.; DE AMORIM, M.T.P.; COSTA-FERREIRA, M. (2001 a): Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. J. Biotechnol. 89 (2-3): 123-129.

SOARES, G.M.B.; COSTA-FERREIRA, M.; DE AMORIM, M.T.P. (2001 b): Decolorization of an anthraquinone-type dye using a laccase formulation. Bioresource Technol. 79: 171-177.

SOARES, G.M.B.; DE AMORIM, M.T.P.; HRDINA, R. (2002): Studies on the biotransformation of novel disazo dyes by laccase. Process Biochemistry 37: 581-587.

SOLOMON, E.I.; LOWERY, M.D. (1993): Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. Science 259: 1575-1581.

SOLOMON, E.I.; SUNDARAM, U.M.; MACHONKIN, T.E. (1996): Multicopper oxidases and oxygenases. Chem. Rev. 96: 2563-2605.

SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. (1990): Enzymatic attack of wood is limited by the inaccessibility of the substrate. In: KIRK, T.K.; CHANG, H. (Hrsg.): Biotechnology in pulp and paper manufacture. London: Butterworth-Heinemann: 111-122.

SREBOTNIK, E.; JENSEN, K.A., JR.; HAMMEL, K.E. (1998): Cleavage of nonphenolic lignin structures by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. Proc. 7th Int. Conf. on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry (Vancouver): Vol. B: B195-B197.

SREBOTNIK, E.; HAMMEL, K.E. (2000): Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. J. Biotechnol. 81: 179-188.

SRINIVASAN, C.; D'SOUZA, T.M.; BOOMINATHAN, K., REDDY, C.A. (1995): Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. Appl. Environ. Microbiol. 61 (12): 4274-4277.

STAZI, R.S.; D'ANNIBALE, A.; GIOVANNONZI, SERMANI, G. (2001): Laccase-catalyzed removal of 2,4-Dichlorophenol in the presence of polyethylene glycol. Fresenius Environmental Bulletin 10 (2): 226-229.

STELLMACH, B. (1988): Bestimmungsmethoden Enzyme für Pharmazie, Lebensmittelchemie, Technik, Biochemie, Biologie, Medizin. Bruno Stellmach. Unter Mitarbeit von W. Gottschick, F. Battermann und K. Zabel. Darmstadt: Steinkopff. 271 S.

STETTLER, H. (1979): Spezielle Probleme beim Entfernen der Druckfarbe von Altpapier. Wochenblatt für Papierfabrikation 22: 866-875.

STORK, G. (1994): Untersuchungen über die Verbesserung der Entwässerungseigenschaften von Sekundärfaserstoffen durch Behandlung mit Cellulasen und Hemicellulasen. Dissertation an der Universität Hamburg, Fachbereich Biologie. 164 S.

STORK, G.; PULS, J. (1994): Untersuchung zur Verbesserung der Altpapierqualität durch enzymatische Behandlung. Das Papier 48: 310-323.

SÜSS, H.U.; NIMMERFROH, N.; HOPF, B. (1995): Die Wirtschaftlichkeit von alkalischen und neutralen Bedingungen beim Flotations-Deinking. Wochenblatt für Papierfabrikation 123 (20): 916-919.

SYKES, M.; JEFFRIES, T.; ABUBAKR, S.; KLUNGNESS, J.; CROPSEY, K. (1995): Enzymatic deinking of sorted mixed office waste: Recommendations for scale-up. Proc. Tappi Recycling Symposium: 61-64.

TAMMINEN, T.; ELDER, T.; WANG, W.; POPPIUS-LEVLIN, K. (1998): The action mechanism of laccase/1-hydroxybenzotriazole system on pulp residual lignin. Proc. 7<sup>th</sup> Int. Conf. on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry (Vancouver), Vol. A: A107-A110.

THURSTON, C.F. (1994): The structure and function of fungal laccase. Microbiology 140: 19-26.

VIKARI, L.; OKSANEN, T.; BUCHERT, J. (1999 a): Combined action of hemicellulases and oxidases in bleaching. Proc. 10<sup>th</sup> Biennial Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. Mainsymposium (Yokohama), Vol. I: 504-508.

VIKARI, L.; KRUUS, K.; BUCHERT, J. (1999 b): Method for modification of cellulose. Patent WO 99/23117.

- WARIISHI, H.; MOROHOSHI, N.; HARAGUCHI, T. (1987): Degradation of lignin by the extracellular enzymes of *Coriolus versicolor* VII: Effective degradation of syringyl type  $\beta$ -aryl ether lignin model compound by laccase III. *Mokuzai Gakkaishi* 33 (11): 892-898.
- WEN, X.; LAI, Y.Z.; XU, H.; BOLL, H.; NAKAS, J.P.; TANNENBAUM, S.W. (1999): Structural influence in laccase-assisted oxidation and delignification reactions. *Proc. 10th Biennal Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. Main Symposium (Yokohama)*, Vol. III: 80-83.
- WEN, X.; LAI, Y.-Z.; JOHSON, J.; NAKAS, J.P.; TANENBAUM, W. (2001): The significance of benzylic oxidation in laccase-assisted delignification reactions. *Proc. 11<sup>th</sup> Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. (Nice)*, Vol. III: 353-355.
- WONG, Y.; YU, J. (1999): Laccase catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research* 33 (16): 3512-3520.
- WOOD, A. (1980): Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *J. General Microbiol.* 117: 327-338.
- XU, F. (1996 a): Method of producing iodine by use of a copper containing oxidase enzyme. Patent WO 9616165.
- XU, F. (1996 b): Oxidation of phenols, anilines and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* 35 (23): 7608-7614.
- XU, F.; SHIN, W.; BROWN, S.H.; WAHLEITHNER, J.A.; SUNDARAM, U.M.; SOLOMON, E.I. (1996): A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1292: 303-311.
- XU, F. (1997): Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J. Biol. Chem.* 272 (2): 924-928.
- XU, F. (1999): Recent progress in laccase study: Properties, enzymology, production, and applications. In: FLICKINGER, M.C.; DREW, S.W. (Hrsg.): *Encyclopedia of bioprocessing technology: Fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: John Wiley & Sons. 1545-1554.
- XU, F. (2001): Dioxygen reactivity of laccase: Dependence on laccase source, pH, and anion inhibition. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 95: 125-133.
- YANG, J.L.; MA, J.; ERIKSSON, K.-E.L. (1996): Enzymatic deinking of recycled fibers - development of the ENZYNK process. In: SREBOTNIK, E.; MESSNER, K.: *Proc. 6<sup>th</sup> Int. Conf. on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Recent Advances in Applied and Fundamental Research*. Wien: Facultas-Universitätsverlag. 157-162.
- YAROLOPOV, A.I.; SKOROBOGAT'KO, O.V.; VARTANOV, S.S.; VARFOLOMEYEV, S.D. (1994): Laccase: Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 49: 257-280.
- YAYER, D.S.; GOLIGHTLY, E.J. (1996): Cloning and characterization of three laccase gens from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*: Genomic organization of the laccase gene family. *Gene* 181: 95-102.

YAYER, D.S.; XU, F.; GOLIGHTLY, E.J.; BROWN, K.M.; BROWN, S.H.; REY, M.W.; SCHNEIDER, P.; HALKIER, T.; MONDORF, K.; DALBØGE, H. (1996): Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. Appl. Environm. Microbiol. 62 (3): 834-841.

YOUN, H.-D.; KIM, K.-J.; MAENG, J.-S.; HAN, Y.-H.; JEONG, I.-B.; JEONG, G.; KANG, S.-O.; HAH, Y.C. (1995 a): Single electron transfer by an extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Microbiology 141: 393-398 .

YOUN, H.D.; YUNG, C.H.; KANG, A.O. (1995 b): Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. FEMS Microbiol. Lett. 132 (3): 183-188.

ZHANG, L.; GELLERSTEDT, G. (1994): Reactive structures in wood and high-yield pulps. IV. Day-light induced oxidation of stilbene structures in the solid state. Acta Chem. Scand. 48 (6): 490-497.

ZAMORANI, A.; SPETOLLI, P.; LANTE, A.; CRAPISI, A.; PASINI, G. (1995): Immobilized laccase and tyrosinase. An approach for wine stabilization. Ital. Food Sci. Special Issue: 195-200.

ZEYER, C.; JOYCE, T.W.; RUCKER, J.W.; HEITMANN, J.A. (1993): Enzymatic deinking of cellulosic fabric: A model study for enzymatic paper deinking. Progress Pap. Rec. 3 (4): 36-44.

ZOUARI, N.; ROMETTE, J.-L.; THOMAS, D. (1987): Purification and properties of two laccase isozymes produced by *Botrytis cinerea*. Appl. Biochem. Biotechnol. 15: 213-225.

## 7 Anhang

### Anhang 1

zu Kapitel 4.1 / Seiten 73-75

Aktivitätsbestimmung dreier Laccasen mit ABTS in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert

| pH-Wert | Aktivität von <i>T. villosa</i> -Laccase [U/ml Enzympräparatlösung] |         |         |         |
|---------|---------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|
|         | T=35 °C                                                             | T=45 °C | T=50 °C | T=55 °C |
| 4,5     | 18763                                                               | 20298   | 30308   | 50215   |
| 5,0     | 14704                                                               | 16316   | 24773   | 29207   |
| 5,5     | 8029                                                                | 12652   | 13867   | 25539   |
| 6,0     | 3378                                                                | 4899    | 7605    | 13194   |
| 6,5     | 600                                                                 | 1127    | 1751    | 3701    |
| 7,0     | 93                                                                  | 283     | 576     | 490     |
| 7,3     | 20                                                                  | 40      | 71      | 147     |
| 7,5     | 0                                                                   | 0       | 0       | 110     |
| 7,8     |                                                                     |         |         | 0       |
| 7,9     |                                                                     |         |         |         |

| pH-Wert | Aktivität von <i>M. thermophila</i> -Laccase [U/ml Enzympräparatlösung] |         |         |         |         |
|---------|-------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|         | T=35 °C                                                                 | T=50 °C | T=55 °C | T=60 °C | T=66 °C |
| 4,5     | 5100                                                                    | 6897    | 9846    | 10078   | 11700   |
| 5,0     | 4279                                                                    | 6354    | 8193    | 8418    | 9943    |
| 5,5     | 3873                                                                    | 5994    | 7267    | 7445    | 9119    |
| 6,0     | 3560                                                                    | 5342    | 6317    | 7149    | 7855    |
| 6,5     | 2838                                                                    | 4523    | 4992    | 5681    | 7178    |
| 7,0     | 1580                                                                    | 2159    | 2366    | 2847    | 3202    |
| 7,5     | 420                                                                     | 596     | 621     | 607     | 706     |
| 8,0     | 79                                                                      | 95      | 59      | 78      | 87      |
| 8,1     | 0                                                                       | 54      | 30      | 49      | 66      |
| 8,2     | 41                                                                      | 107     | 0       | 55      | 26      |
| 8,3     | 24                                                                      | 0       |         | 44      | 0       |
| 8,4     | 19                                                                      |         |         | 0       |         |
| 8,5     | 0                                                                       |         |         |         |         |

| pH-Wert | Aktivität von <i>T. versicolor</i> -Laccase [U/mg Lyophilisat] |         |         |
|---------|----------------------------------------------------------------|---------|---------|
|         | T=35 °C                                                        | T=50 °C | T=55 °C |
| 4,5     | 19,7                                                           | 24,7    | 26,4    |
| 5,5     | 9,1                                                            | 13,2    | 14,7    |
| 6,5     | 0,8                                                            | 1,4     | 1,9     |
| 7,0     | 0,1                                                            | 0,2     | 0,2     |
| 7,1     | 0,1                                                            | 0,1     |         |
| 7,2     | 0,1                                                            | 0,1     |         |
| 7,3     | 0,0                                                            | 0,1     | 0,1     |
| 7,4     |                                                                | 0,0     | 0,0     |

**Anhang 2**

zu Kapitel 4.2.1.1.1 / Seiten 79-82

*Deinking von AP nach Inkubation mit variablen Laccase- und HBT-Mengen im neutralen pH-Bereich. Laccase von M. thermophila*

|                                                                 |                                   |         |         |         |         |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Fahrweise [-]                                                   | alkalisch                         | neutral | neutral | neutral | neutral | neutral |
| Temperatur [°C]                                                 | 55                                | 55      | 55      | 55      | 55      | 55      |
| pH [-]                                                          | 9                                 | 7       | 7       | 7       | 7       | 7       |
| Inkubationszeit [min]                                           | 90                                | 90      | 90      | 90      | 90      | 90      |
| Stoff [-]                                                       | AP                                | AP      | AP      | AP      | AP      | AP      |
| Aktivität [U/g otro AP]                                         | 0                                 | 0       | 100     | 100     | 1000    | 1000    |
| HBT [%]                                                         | 0                                 | 0       | 0       | 2       | 0       | 2       |
| nach Flotation                                                  |                                   |         |         |         |         |         |
| Ausbeute [%]                                                    | 56                                | 48      | 53      | 54      | 58      | 58      |
|                                                                 | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                                               | 83,23                             | 80,64   | 79,63   | 78,86   | 77,56   | 75,48   |
| grün-rot a* [-]                                                 | -0,70                             | -0,40   | -0,53   | -0,52   | -0,45   | -0,62   |
| gelb-blau b* [-]                                                | 4,64                              | 4,48    | 4,67    | 4,63    | 4,75    | 4,58    |
| Weißgrad [% ISO]                                                | 58,5                              | 54,1    | 52,2    | 50,9    | 48,7    | 45,6    |
| Gelbwert [-]                                                    | 9,2                               | 9,3     | 9,7     | 9,8     | 10,2    | 9,9     |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> ] |                                   |         |         |         |         |         |
| Schmutzpunktgrößenklassen [µm]                                  |                                   |         |         |         |         |         |
| 50-100                                                          | 581                               | 743     | 673     | 636     | 597     | 559     |
| 100-150                                                         | 393                               | 554     | 429     | 430     | 378     | 341     |
| 150-200                                                         | 243                               | 370     | 353     | 312     | 264     | 241     |
| 200-250                                                         | 163                               | 337     | 237     | 236     | 207     | 136     |
| 250-300                                                         | 141                               | 283     | 208     | 223     | 142     | 108     |
| 300-350                                                         | 77                                | 221     | 153     | 151     | 127     | 120     |
| 350-400                                                         | 61                                | 179     | 131     | 117     | 94      | 115     |
| 400-450                                                         | 35                                | 201     | 92      | 130     | 25      | 50      |
| 450-500                                                         | 16                                | 92      | 137     | 81      | 69      | 32      |
| >500                                                            | 136                               | 845     | 549     | 605     | 303     | 301     |
| 50-150                                                          | 974                               | 1297    | 1102    | 1066    | 975     | 900     |
| >150                                                            | 872                               | 2528    | 1860    | 1855    | 1231    | 1103    |
| Summe                                                           | 1846                              | 3825    | 2962    | 2921    | 2206    | 2003    |

**Anhang 3**

zu Kapitel 4.2.1.1.1 / Seiten 79-82

*Deinking von AP nach Inkubation mit variablen Laccase- und HBT-Mengen im neutralen pH-Bereich. Laccase von T. villosa*

|                                       |                                   |         |         |         |         |         |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Fahrweise [-]                         | alkalisch                         | neutral | neutral | neutral | neutral | neutral |
| Temperatur [°C]                       | 55                                | 55      | 55      | 55      | 55      | 55      |
| pH [-]                                | 9                                 | 7       | 7       | 7       | 7       | 7       |
| Inkubationszeit [min]                 | 90                                | 90      | 90      | 90      | 90      | 90      |
| Stoff [-]                             | AP                                | AP      | AP      | AP      | AP      | AP      |
| Aktivität [U/g otro AP]               | 0                                 | 0       | 100     | 100     | 1000    | 1000    |
| HBT [%]                               | 0                                 | 0       | 0       | 2       | 0       | 2       |
| nach Flotation                        |                                   |         |         |         |         |         |
| Ausbeute [%]                          | 56                                | 48      | 44      | 41      | 54      | 51      |
|                                       | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                     | 83,23                             | 80,64   | 80,27   | 79,92   | 78,13   | 76,59   |
| grün-rot a* [-]                       | -0,70                             | -0,40   | -0,39   | -0,46   | -0,47   | -0,47   |
| gelb-blau b* [-]                      | 4,64                              | 4,48    | 4,46    | 4,53    | 4,53    | 5,10    |
| Weißgrad [% ISO]                      | 58,5                              | 54,1    | 53,5    | 52,8    | 49,8    | 46,9    |
| Gelbwert [-]                          | 9,2                               | 9,3     | 9,4     | 9,5     | 9,6     | 11,1    |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm²/m²] |                                   |         |         |         |         |         |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]   |                                   |         |         |         |         |         |
| 50-100                                | 581                               | 743     | 726     | 890     | 673     | 719     |
| 100-150                               | 393                               | 554     | 534     | 637     | 472     | 502     |
| 150-200                               | 243                               | 370     | 374     | 470     | 335     | 337     |
| 200-250                               | 163                               | 337     | 304     | 390     | 281     | 242     |
| 250-300                               | 141                               | 283     | 245     | 317     | 146     | 201     |
| 300-350                               | 77                                | 221     | 196     | 283     | 132     | 169     |
| 350-400                               | 61                                | 179     | 158     | 251     | 172     | 153     |
| 400-450                               | 35                                | 201     | 132     | 207     | 56      | 122     |
| 450-500                               | 16                                | 92      | 164     | 177     | 180     | 94      |
| >500                                  | 136                               | 845     | 762     | 1240    | 639     | 688     |
| 50-150                                | 974                               | 1297    | 1260    | 1527    | 1145    | 1221    |
| >150                                  | 872                               | 2528    | 2335    | 3335    | 1941    | 2006    |
| Summe                                 | 1846                              | 3825    | 3595    | 4862    | 3086    | 3227    |

**Anhang 4**

zu Kapitel 4.2.1.1.2 / Seiten 83-85

*Deinking von AP nach Inkubation mit Laccase und variabler HBT-Menge im neutralen pH-Bereich. Laccase von M. thermophila*

|                                                                 |           |         |         |         |         |         |         |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Fahrweise [-]                                                   | alkalisch | neutral | neutral | neutral | neutral | neutral | neutral | neutral |
| Temperatur [°C]                                                 | 55        | 55      | 55      | 55      | 55      | 55      | 55      | 55      |
| pH [-]                                                          | 9         | 7       | 7       | 7       | 7       | 7       | 7       | 7       |
| Inkubationszeit [min]                                           | 90        | 90      | 90      | 90      | 90      | 90      | 90      | 90      |
| Stoff [-]                                                       | AP        | AP      | AP      | AP      | AP      | AP      | AP      | AP      |
| Aktivität [U/g otro AP]                                         | 0         | 0       | 1000    | 1000    | 1000    | 1000    | 1000    | 1000    |
| HBT [%]                                                         | 0         | 0       | 0       | 0,1     | 0,25    | 0,5     | 1       | 2       |
| nach Flotation                                                  |           |         |         |         |         |         |         |         |
| Ausbeute [%]                                                    | 56        | 48      | 58      | 53      | 55      | 54      | 55      | 58      |
| Mittelwerte, Nutschblattoberseite                               |           |         |         |         |         |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                                               | 83,23     | 80,64   | 77,56   | 76,76   | 76,51   | 76,53   | 77,98   | 75,48   |
| grün-rot a* [-]                                                 | -0,70     | -0,40   | -0,45   | -0,70   | -0,68   | -0,66   | -0,61   | -0,62   |
| gelb-blau b* [-]                                                | 4,64      | 4,48    | 4,75    | 5,04    | 4,86    | 5,10    | 5,03    | 4,58    |
| Weißgrad [% ISO]                                                | 58,5      | 54,1    | 48,7    | 47,2    | 47,0    | 46,8    | 49,1    | 45,6    |
| Gelbwert [-]                                                    | 9,2       | 9,3     | 10,2    | 10,7    | 10,3    | 10,9    | 10,6    | 9,9     |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> ] |           |         |         |         |         |         |         |         |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]                             |           |         |         |         |         |         |         |         |
| 50-100                                                          | 581       | 743     | 597     | 698     | 743     | 636     | 602     | 559     |
| 100-150                                                         | 393       | 554     | 378     | 454     | 488     | 379     | 382     | 341     |
| 150-200                                                         | 243       | 370     | 264     | 291     | 345     | 249     | 257     | 241     |
| 200-250                                                         | 163       | 337     | 207     | 216     | 248     | 185     | 171     | 136     |
| 250-300                                                         | 141       | 283     | 142     | 190     | 183     | 163     | 161     | 108     |
| 300-350                                                         | 77        | 221     | 127     | 140     | 166     | 137     | 108     | 120     |
| 350-400                                                         | 61        | 179     | 94      | 143     | 105     | 71      | 101     | 115     |
| 400-450                                                         | 35        | 201     | 25      | 69      | 106     | 81      | 88      | 50      |
| 450-500                                                         | 16        | 92      | 69      | 81      | 80      | 63      | 64      | 32      |
| >500                                                            | 136       | 845     | 303     | 412     | 477     | 254     | 441     | 301     |
| 50-150                                                          | 974       | 1297    | 975     | 1152    | 1231    | 1015    | 984     | 900     |
| >150                                                            | 872       | 2528    | 1231    | 1542    | 1710    | 1203    | 1391    | 1103    |
| Summe                                                           | 1846      | 3825    | 2206    | 2694    | 2941    | 2218    | 2375    | 2003    |

**Anhang 5**

zu Kapitel 4.2.1.1.2 / Seiten 83-85

*Deinking von AP nach Inkubation mit Laccase und variabler HBT-Menge im neutralen pH-Bereich. Laccase von T. villosa*

|                                       |           |         |         |         |         |         |         |         |
|---------------------------------------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Fahrweise [-]                         | alkalisch | neutral | neutral | neutral | neutral | neutral | neutral | neutral |
| Temperatur [°C]                       | 55        | 55      | 55      | 55      | 55      | 55      | 55      | 55      |
| pH [-]                                | 9         | 7       | 7       | 7       | 7       | 7       | 7       | 7       |
| Inkubationszeit [min]                 | 90        | 90      | 90      | 90      | 90      | 90      | 90      | 90      |
| Stoff [-]                             | AP        | AP      | AP      | AP      | AP      | AP      | AP      | AP      |
| Aktivität [U/g otro AP]               | 0         | 0       | 1000    | 1000    | 1000    | 1000    | 1000    | 1000    |
| HBT [%]                               | 0         | 0       | 0       | 0,1     | 0,25    | 0,5     | 1       | 2       |
| nach Flotation                        |           |         |         |         |         |         |         |         |
| Ausbeute [%]                          | 56        | 48      | 54      | 45      | 48      | 42      | 58      | 51      |
| Mittelwerte, Nutschblattoberseite     |           |         |         |         |         |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                     | 83,23     | 80,64   | 78,13   | 79,03   | 78,82   | 77,57   | 75,75   | 76,59   |
| grün-rot a* [-]                       | -0,70     | -0,40   | -0,47   | -0,37   | -0,48   | -0,50   | -0,58   | -0,47   |
| gelb-blau b* [-]                      | 4,64      | 4,48    | 4,53    | 4,60    | 4,57    | 4,68    | 4,40    | 5,10    |
| Weißgrad [% ISO]                      | 58,5      | 54,1    | 49,8    | 51,2    | 50,9    | 48,8    | 46,1    | 46,9    |
| Gelbwert [-]                          | 9,2       | 9,3     | 9,6     | 9,8     | 9,7     | 10,0    | 9,5     | 11,1    |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm²7m²] |           |         |         |         |         |         |         |         |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]   |           |         |         |         |         |         |         |         |
| 50-100                                | 581       | 743     | 673     | 691     | 681     | 833     | 821     | 719     |
| 100-150                               | 393       | 554     | 472     | 480     | 443     | 546     | 562     | 502     |
| 150-200                               | 243       | 370     | 335     | 328     | 298     | 392     | 411     | 337     |
| 200-250                               | 163       | 337     | 281     | 233     | 229     | 313     | 330     | 242     |
| 250-300                               | 141       | 283     | 146     | 228     | 172     | 252     | 267     | 201     |
| 300-350                               | 77        | 221     | 132     | 150     | 129     | 158     | 218     | 169     |
| 350-400                               | 61        | 179     | 172     | 109     | 111     | 186     | 191     | 153     |
| 400-450                               | 35        | 201     | 56      | 88      | 75      | 152     | 178     | 122     |
| 450-500                               | 16        | 92      | 180     | 54      | 47      | 112     | 107     | 94      |
| >500                                  | 136       | 845     | 639     | 561     | 629     | 667     | 897     | 688     |
| 50-150                                | 974       | 1297    | 1145    | 1171    | 1124    | 1379    | 1383    | 1221    |
| >150                                  | 872       | 2528    | 1941    | 1751    | 1690    | 2232    | 2599    | 2006    |
| Summe                                 | 1846      | 3825    | 3086    | 2922    | 2814    | 3611    | 3982    | 3227    |

**Anhang 6**

zu Kapitel 4.2.1.2/ Seiten 86-88

*Deinking von AP nach Inkubation mit Laccase und variabler HBT-Menge bei pH 4,5. Laccase von M. thermophila*

|                                                                 |           |       |       |       |       |       |       |       |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Fahrweise [-]                                                   | alkalisch | sauer | sauer | sauer | sauer | sauer | sauer | sauer |
| Temperatur [°C]                                                 | 45        | 55    | 55    | 55    | 55    | 55    | 55    | 55    |
| pH [-]                                                          | 9         | 4,5   | 4,5   | 4,5   | 4,5   | 4,5   | 4,5   | 4,5   |
| Inkubationszeit [min]                                           | 90        | 90    | 90    | 90    | 90    | 90    | 90    | 90    |
| Stoff [-]                                                       | AP        | AP    | AP    | AP    | AP    | AP    | AP    | AP    |
| Aktivität [U/g otro AP]                                         | 0         | 0     | 1000  | 1000  | 1000  | 1000  | 1000  | 1000  |
| HBT [%]                                                         | 0         | 0     | 0     | 0,1   | 0,25  | 0,5   | 1     | 2     |
| nach Flotation                                                  |           |       |       |       |       |       |       |       |
| Ausbeute [%]                                                    | 52        | 50    | 52    | 48    | 52    | 46    | 57    | 53    |
| Mittelwerte, Nutschblattoberseite                               |           |       |       |       |       |       |       |       |
| Helligkeit L* [-]                                               | 79,79     | 78,45 | 75,82 | 75,07 | 74,14 | 76,35 | 73,37 | 73,80 |
| grün-rot a* [-]                                                 | -0,75     | -0,46 | -0,59 | -0,42 | -0,37 | -0,21 | -0,14 | -0,15 |
| gelb-blau b* [-]                                                | 4,66      | 4,27  | 4,24  | 4,93  | 5,17  | 5,95  | 6,04  | 6,42  |
| Weißgrad [% ISO]                                                | 52,4      | 50,6  | 46,4  | 44,7  | 43,1  | 45,9  | 41,3  | 41,6  |
| Gelbwert [-]                                                    | 9,5       | 9,1   | 9,1   | 10,9  | 11,6  | 13,2  | 13,8  | 14,6  |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> ] |           |       |       |       |       |       |       |       |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]                             |           |       |       |       |       |       |       |       |
| 50-100                                                          | 331       | 451   | 341   | 311   | 368   | 246   | 198   | 242   |
| 100-150                                                         | 163       | 221   | 195   | 163   | 224   | 127   | 95    | 130   |
| 150-200                                                         | 95        | 144   | 116   | 113   | 122   | 81    | 44    | 68    |
| 200-250                                                         | 33        | 57    | 62    | 61    | 74    | 46    | 42    | 56    |
| 250-300                                                         | 27        | 73    | 40    | 63    | 66    | 32    | 32    | 39    |
| 300-350                                                         | 18        | 74    | 55    | 29    | 63    | 25    | 23    | 41    |
| 350-400                                                         | 10        | 61    | 25    | 34    | 30    | 24    | 18    | 42    |
| 400-450                                                         | 31        | 62    | 19    | 7     | 19    | 0     | 0     | 31    |
| 450-500                                                         | 16        | 61    | 55    | 49    | 23    | 16    | 7     | 0     |
| >500                                                            | 68        | 197   | 94    | 182   | 98    | 73    | 68    | 45    |
| 50-150                                                          | 494       | 672   | 536   | 474   | 592   | 373   | 293   | 372   |
| >150                                                            | 298       | 729   | 466   | 538   | 495   | 297   | 234   | 322   |
| Summe                                                           | 792       | 1401  | 1002  | 1012  | 1087  | 670   | 527   | 694   |

**Anhang 7**

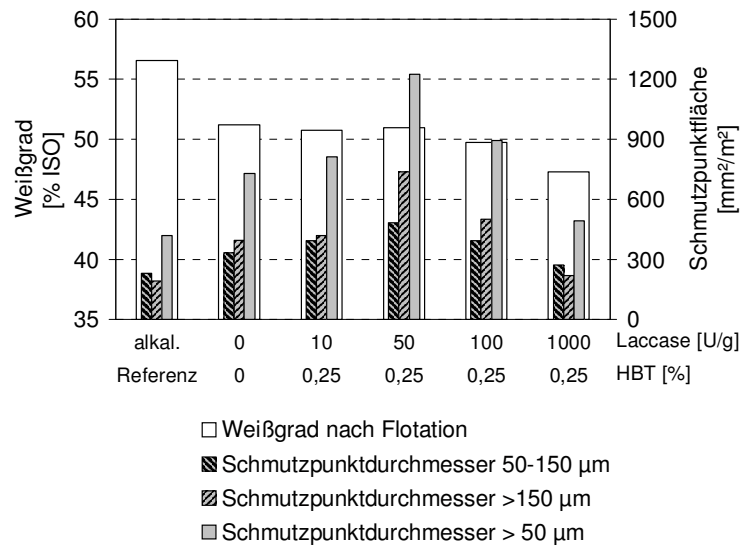
zu Kapitel 4.2.1.2 / Seiten 86-88

*Deinking von AP nach Inkubation mit Laccase und variabler HBT-Menge bei pH 4,5. Laccase von T. villosa*

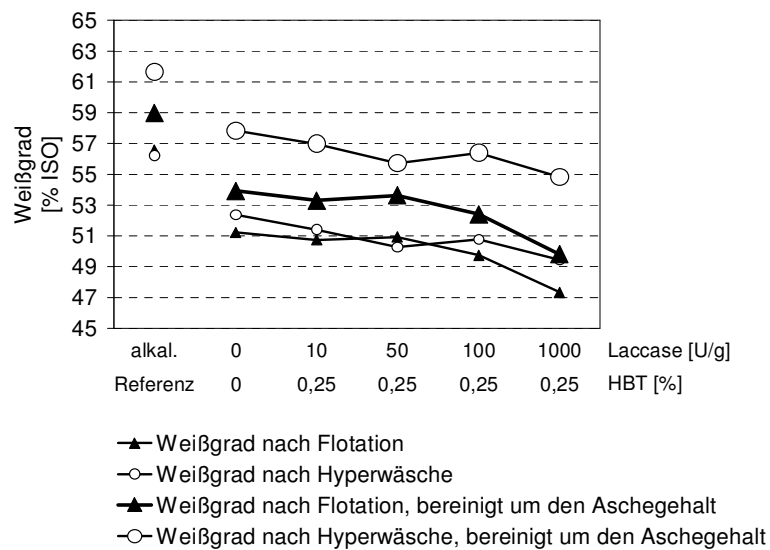
|                                                                 |                                   |       |       |       |       |       |       |       |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Fahrweise [-]                                                   | alkalisch                         | sauer | sauer | sauer | sauer | sauer | sauer | sauer |
| Temperatur [°C]                                                 | 45                                | 55    | 55    | 55    | 55    | 55    | 55    | 55    |
| pH [-]                                                          | 9                                 | 4,5   | 4,5   | 4,5   | 4,5   | 4,5   | 4,5   | 4,5   |
| Inkubationszeit [min]                                           | 90                                | 90    | 90    | 90    | 90    | 90    | 90    | 90    |
| Stoff [-]                                                       | AP                                | AP    | AP    | AP    | AP    | AP    | AP    | AP    |
| Aktivität [U/g otro AP]                                         | 0                                 | 0     | 1000  | 1000  | 1000  | 1000  | 1000  | 1000  |
| HBT [%]                                                         | 0                                 | 0     | 0     | 0,1   | 0,25  | 0,5   | 1     | 2     |
| nach Flotation                                                  |                                   |       |       |       |       |       |       |       |
| Ausbeute [%]                                                    | 52                                | 50    | 58    | 59    | 59    | 58    | 58    | 49    |
|                                                                 | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |       |       |       |       |       |       |       |
| Helligkeit L* [-]                                               | 79,79                             | 78,45 | 74,33 | 73,38 | 72,07 | 72,48 | 69,96 | 71,97 |
| grün-rot a* [-]                                                 | -0,75                             | -0,46 | -0,59 | -0,41 | -0,44 | -0,14 | -0,40 | -0,39 |
| gelb-blau b* [-]                                                | 4,66                              | 4,27  | 3,91  | 5,52  | 6,16  | 7,85  | 6,88  | 8,25  |
| Weißgrad [% ISO]                                                | 52,4                              | 50,6  | 44,4  | 41,7  | 39,4  | 38,7  | 36,0  | 37,7  |
| Gelbwert [-]                                                    | 9,5                               | 9,1   | 8,5   | 12,4  | 14,0  | 18,0  | 16,0  | 18,7  |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> ] |                                   |       |       |       |       |       |       |       |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]                             |                                   |       |       |       |       |       |       |       |
| 50-100                                                          | 331                               | 451   | 276   | 211   | 124   | 126   | 91    | 242   |
| 100-150                                                         | 163                               | 221   | 151   | 93    | 95    | 70    | 49    | 128   |
| 150-200                                                         | 95                                | 144   | 73    | 64    | 64    | 61    | 27    | 79    |
| 200-250                                                         | 33                                | 57    | 56    | 45    | 46    | 52    | 18    | 61    |
| 250-300                                                         | 27                                | 73    | 40    | 19    | 21    | 37    | 10    | 39    |
| 300-350                                                         | 18                                | 74    | 28    | 3     | 15    | 18    | 11    | 18    |
| 350-400                                                         | 10                                | 61    | 25    | 9     | 23    | 19    | 19    | 9     |
| 400-450                                                         | 31                                | 62    | 24    | 6     | 7     | 0     | 13    | 51    |
| 450-500                                                         | 16                                | 61    | 0     | 0     | 24    | 15    | 0     | 42    |
| >500                                                            | 68                                | 197   | 78    | 0     | 49    | 23    | 12    | 21    |
| 50-150                                                          | 494                               | 672   | 427   | 304   | 219   | 196   | 140   | 370   |
| >150                                                            | 298                               | 729   | 324   | 147   | 249   | 225   | 110   | 320   |
| Summe                                                           | 792                               | 1401  | 751   | 451   | 468   | 421   | 250   | 690   |

## Anhang 8

zu Kapitel 4.2.1.3 / Seite 89



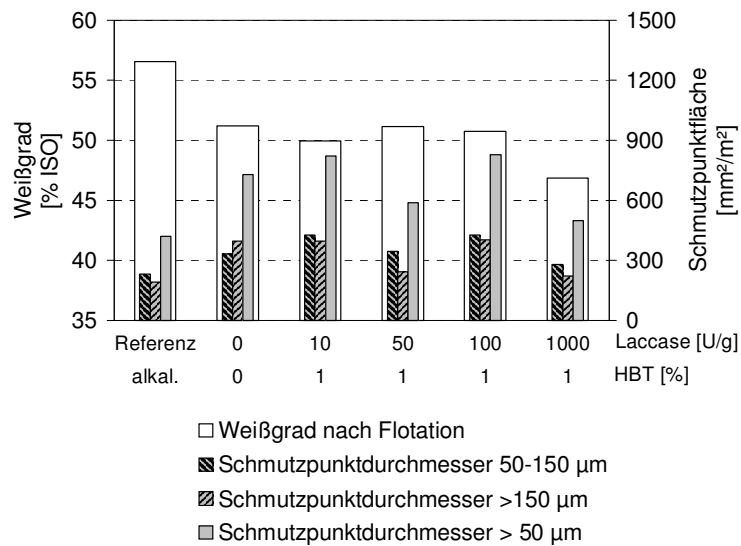
**Abb. 4.2.9:** Weißgrad- und Schmutzpunktentwicklung von AP nach Inkubation mit *T. villosa*-Laccase und 0,25 % HBT bei neutralem pH-Wert sowie nachfolgender Flotation. a = alkalische Referenz; n = neutrale Fahrweise



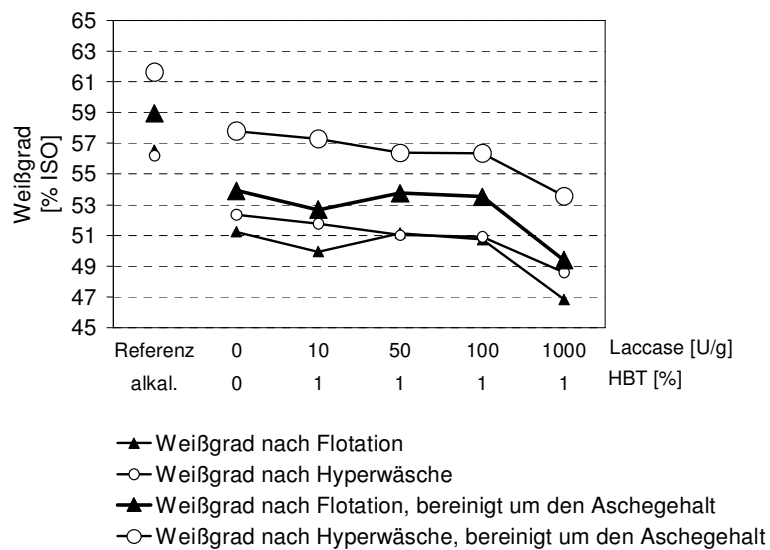
**Abb. 4.2.10:** Weißgrade von AP nach Inkubation mit *T. villosa*-Laccase und 0,25 % HBT bei neutralem pH-Wert sowie nachfolgender Flotation und Hyperwäsche. a = alkalische Referenz; n = neutrale Fahrweise

## Anhang 9

zu Kapitel 4.2.1.3 / Seite 89



**Abb. 4.2.11:** Weißgrad- und Schmutzpunktentwicklung von AP nach Inkubation mit *T. villosa*-Laccase und 1 % HBT bei neutralem pH-Wert sowie nachfolgender Flotation. a = alkalische Referenz; n = neutrale Fahrweise



**Abb. 4.2.12:** Weißgrade von AP nach Inkubation mit *T. villosa*-Laccase und 1 % HBT bei neutralem pH-Wert sowie nachfolgender Flotation und Hyperwäsche. a = alkalische Referenz; n = neutrale Fahrweise

**Anhang 10**

zu Kapitel 4.2.1.3 / Seite 89-94

**Tab. 4.2.2:** Weißgrade, Farborte und Gelbwerte von AP nach Inkubation mit *T. villosa*-Laccase und 0,25 % HBT bei neutralem pH-Wert sowie nachfolgender Flotation und Hyperwäsche (Daten zu den Abb. 4.2.9 & Abb. 4.2.10)

| Laccase [U/g]     | 0                | 10    | 50    | 100   | 1000  |
|-------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|
| HBT [%]           | 0                | 0,25  | 0,25  | 0,25  | 0,25  |
|                   | nach Flotation   |       |       |       |       |
| Weißgrad [% ISO]  | 51,2             | 50,7  | 50,9  | 49,7  | 47,3  |
| Helligkeit L* [-] | 79,33            | 78,84 | 79,15 | 78,44 | 76,79 |
| grün-rot a* [-]   | -0,63            | -0,54 | -0,53 | -0,54 | -0,48 |
| blau-gelb b* [-]  | 5,26             | 4,81  | 5,16  | 5,23  | 4,91  |
| Gelbwert [-]      | 11,0             | 10,1  | 10,9  | 11,1  | 10,6  |
|                   | nach Hyperwäsche |       |       |       |       |
| Weißgrad [% ISO]  | 52,4             | 51,4  | 50,3  | 50,8  | 49,4  |
| Helligkeit L* [-] | 80,34            | 79,70 | 79,13 | 79,49 | 78,79 |
| grün-rot a* [-]   | -0,90            | -0,82 | -0,80 | -0,77 | -0,60 |
| blau-gelb b* [-]  | 6,01             | 5,88  | 6,06  | 6,19  | 6,37  |
| Gelbwert [-]      | 12,1             | 12,0  | 12,5  | 12,7  | 13,3  |

**Tab. 4.2.3:** Weißgrade, Farborte und Gelbwerte von AP nach Inkubation mit *T. villosa*-Laccase und 1 % HBT bei neutralem pH-Wert sowie nachfolgender Flotation und Hyperwäsche (Daten zu den Abb. 4.2.11 und Abb. 4.2.12)

| Laccase [U/g]     | 0                | 10    | 50    | 100   | 1000  |
|-------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|
| HBT [%]           | 0                | 1     | 1     | 1     | 1     |
|                   | nach Flotation   |       |       |       |       |
| Weißgrad [% ISO]  | 51,2             | 49,9  | 51,1  | 50,7  | 46,8  |
| Helligkeit L* [-] | 79,33            | 78,52 | 79,26 | 79,15 | 76,60 |
| grün-rot a* [-]   | -0,63            | -0,61 | -0,54 | -0,55 | -0,47 |
| blau-gelb b* [-]  | 5,26             | 5,17  | 5,15  | 5,44  | 5,16  |
| Gelbwert [-]      | 11,0             | 10,9  | 10,8  | 11,4  | 11,2  |
|                   | nach Hyperwäsche |       |       |       |       |
| Weißgrad [% ISO]  | 52,4             | 51,8  | 51,0  | 50,9  | 48,6  |
| Helligkeit L* [-] | 80,34            | 80,00 | 79,65 | 79,60 | 78,37 |
| grün-rot a* [-]   | -0,90            | -0,86 | -0,80 | -0,78 | -0,60 |
| blau-gelb b* [-]  | 6,01             | 6,04  | 6,20  | 6,23  | 6,53  |
| Gelbwert [-]      | 12,1             | 12,3  | 12,7  | 12,8  | 13,7  |

**Anhang 11**

zu Kapitel 4.2.1.3 / Seiten 89-94

*Deinking von AP nach Inkubation mit niedrig dosierter T. villosa-Laccase im neutralen pH-Bereich ohne HBT-Zusatz*

|                                               |           |         |                                   |          |         |         |
|-----------------------------------------------|-----------|---------|-----------------------------------|----------|---------|---------|
| Fahrweise [-]                                 | alkalisch | neutral | neutral                           | neutral  | neutral | neutral |
| Temperatur [°C]                               | 55°C      | 55°C    | 55°C                              | 55°C     | 55°C    | 55°C    |
| pH [-]                                        | 9,5       | 7       | 7                                 | 7        | 7       | 7       |
| Inkubationszeit [min]                         | 90        | 90      | 90                                | 90       | 90      | 90      |
| Stoff [-]                                     | AP        | AP      | AP                                | gealtert | AP      | AP      |
| Aktivität [U/g otro AP]                       | 0         | 0       | 10                                | 50       | 100     | 1000    |
| nach Flotation                                |           |         |                                   |          |         |         |
| Ausbeute [%]                                  | 63        | 63      | 62                                | 62       | 60      | 66      |
|                                               |           |         | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |          |         |         |
| Helligkeit L* [-]                             | 82,74     | 78,87   | 78,76                             | 78,77    | 79,14   | 76,66   |
| grün-rot a* [-]                               | -0,54     | -0,78   | -0,57                             | -0,52    | -0,41   | -0,43   |
| gelb-blau b* [-]                              | 5,70      | 4,60    | 5,18                              | 5,19     | 5,74    | 5,14    |
| Weißgrad [% ISO]                              | 56,6      | 50,8    | 50,3                              | 50,3     | 50,5    | 46,9    |
| Gelbwert [-]                                  | 11,5      | 9,7     | 10,9                              | 10,9     | 12,2    | 11,1    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                 | 11,3      | 9,1     | 8,3                               | 8,4      | 6,9     | 9,0     |
| Ascheaustragsbedingter                        | 2,4       | 2,6     | 2,7                               | 2,8      | 3,0     | 2,6     |
| Remissionsverlust [% ISO]                     |           |         |                                   |          |         |         |
| Weißgrad bereinigt um den Aschegehalt [% ISO] | 59,0      | 53,4    | 53,0                              | 53,1     | 53,5    | 49,5    |
| nach Hyperwäsche                              |           |         |                                   |          |         |         |
|                                               |           |         | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |          |         |         |
| Helligkeit L* [-]                             | 82,82     | 80,53   | 80,00                             | 79,89    | 80,19   | 78,96   |
| grün-rot a* [-]                               | -0,74     | -1,12   | -0,80                             | -0,77    | -0,66   | -0,56   |
| gelb-blau b* [-]                              | 6,46      | 5,64    | 6,03                              | 6,05     | 6,30    | 6,32    |
| Weißgrad [% ISO]                              | 56,2      | 53,0    | 51,8                              | 51,5     | 51,8    | 49,7    |
| Gelbwert [-]                                  | 12,9      | 11,2    | 12,3                              | 12,4     | 12,9    | 13,3    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                 | 2,2       | 2,1     | 2,2                               | 2,4      | 2,4     | 2,8     |
| Ascheaustragsbedingter                        | 5,5       | 5,5     | 5,4                               | 5,3      | 5,3     | 5,0     |
| Remissionsverlust [% ISO]                     |           |         |                                   |          |         |         |
| Weißgrad bereinigt um den Aschegehalt [% ISO] | 61,6      | 58,5    | 57,2                              | 56,8     | 57,1    | 54,7    |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm²/m²]         |           |         |                                   |          |         |         |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]           |           |         |                                   |          |         |         |
| 50-100                                        | 154       | 211     | 320                               | 284      | 287     | 135     |
| 100-150                                       | 75        | 123     | 223                               | 174      | 150     | 77      |
| 150-200                                       | 37        | 76      | 133                               | 114      | 102     | 55      |
| 200-250                                       | 19        | 50      | 101                               | 86       | 54      | 35      |
| 250-300                                       | 12        | 49      | 71                                | 46       | 50      | 23      |
| 300-350                                       | 11        | 35      | 83                                | 54       | 18      | 28      |
| 350-400                                       | 0         | 20      | 48                                | 30       | 35      | 28      |
| 400-450                                       | 26        | 32      | 31                                | 40       | 13      | 20      |
| 450-500                                       | 23        | 57      | 32                                | 40       | 15      | 35      |
| >500                                          | 63        | 75      | 354                               | 273      | 194     | 150     |
| 50-150                                        | 229       | 334     | 543                               | 458      | 437     | 212     |
| >150                                          | 191       | 394     | 853                               | 681      | 481     | 375     |
| Summe                                         | 420       | 728     | 1396                              | 1139     | 918     | 587     |

**Anhang 12**

zu Kapitel 4.2.1.3 / Seiten 89-94

*Deinking von AP nach Inkubation mit 0,25 % HBT und niedrig dosierter T. villosa-Laccase im neutralen pH-Bereich*

|                                                                 |           |         |                                   |         |         |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|---------|-----------------------------------|---------|---------|---------|
| Fahrweise [-]                                                   | alkalisch | neutral | neutral                           | neutral | neutral | neutral |
| Temperatur [°C]                                                 | 55 °C     | 55 °C   | 55 °C                             | 55 °C   | 55 °C   | 55 °C   |
| pH [-]                                                          | 7         | 7       | 7                                 | 7       | 7       | 7       |
| Inkubationszeit [min]                                           | 90        | 90      | 90                                | 90      | 90      | 90      |
| Stoff [-]                                                       | AP        | AP      | AP                                | AP      | AP      | AP      |
| Aktivität [U/g otro AP]                                         | 0         | 0       | 10                                | 50      | 100     | 1000    |
| HBT [%]                                                         | 0         | 0       | 0,25                              | 0,25    | 0,25    | 0,25    |
| Aceton [ml]                                                     | 0         | 10      | 10                                | 10      | 10      | 10      |
| nach Flotation                                                  |           |         |                                   |         |         |         |
| Ausbeute [%]                                                    | 63        | 62      | 65                                | 62      | 64      | 70      |
|                                                                 |           |         | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                                               | 82,74     | 79,33   | 78,84                             | 79,15   | 78,44   | 76,79   |
| grün-rot a* [-]                                                 | -0,54     | -0,63   | -0,54                             | -0,53   | -0,54   | -0,48   |
| gelb-blau b* [-]                                                | 5,70      | 5,26    | 4,81                              | 5,16    | 5,23    | 4,91    |
| Weißgrad [% ISO]                                                | 56,6      | 51,2    | 50,7                              | 50,9    | 49,7    | 47,3    |
| Gelbwert [-]                                                    | 11,5      | 11,0    | 10,1                              | 10,9    | 11,1    | 10,6    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                                   | 11,3      | 8,4     | 9,6                               | 8,5     | 8,6     | 10,3    |
| Ascheaustragsbedingter Remissionsverlust [% ISO]                | 2,4       | 2,7     | 2,6                               | 2,7     | 2,7     | 2,5     |
| Weißgrad bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]                   | 59,0      | 53,9    | 53,3                              | 53,6    | 52,4    | 49,8    |
| nach Hyperwäsche                                                |           |         |                                   |         |         |         |
|                                                                 |           |         | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                                               | 82,82     | 80,34   | 79,70                             | 79,13   | 79,49   | 78,79   |
| grün-rot a* [-]                                                 | -0,74     | -0,90   | -0,82                             | -0,80   | -0,77   | -0,60   |
| gelb-blau b* [-]                                                | 6,46      | 6,01    | 5,88                              | 6,06    | 6,19    | 6,37    |
| Weißgrad [% ISO]                                                | 56,2      | 52,4    | 51,4                              | 50,3    | 50,8    | 49,4    |
| Gelbwert [-]                                                    | 12,9      | 12,1    | 12,0                              | 12,5    | 12,7    | 13,3    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                                   | 2,2       | 2,2     | 2,0                               | 2,2     | 2,0     | 2,3     |
| Ascheaustragsbedingter Remissionsverlust [% ISO]                | 5,5       | 5,4     | 5,6                               | 5,5     | 5,6     | 5,4     |
| Weißgrad bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]                   | 61,6      | 57,8    | 57,0                              | 55,7    | 56,4    | 54,8    |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> ] |           |         |                                   |         |         |         |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]                             |           |         |                                   |         |         |         |
| 50-100                                                          | 154       | 210     | 252                               | 306     | 251     | 181     |
| 100-150                                                         | 75        | 122     | 142                               | 178     | 142     | 91      |
| 150-200                                                         | 37        | 77      | 84                                | 110     | 87      | 60      |
| 200-250                                                         | 19        | 51      | 69                                | 92      | 58      | 42      |
| 250-300                                                         | 12        | 47      | 63                                | 57      | 58      | 30      |
| 300-350                                                         | 11        | 40      | 34                                | 68      | 21      | 9,5     |
| 350-400                                                         | 0         | 24      | 18                                | 50      | 28      | 20      |
| 400-450                                                         | 26        | 19      | 35                                | 25      | 12      | 20      |
| 450-500                                                         | 23        | 0       | 13                                | 54      | 32      | 15      |
| >500                                                            | 63        | 138     | 108                               | 283     | 205     | 23      |
| 50-150                                                          | 229       | 332     | 393                               | 484     | 393     | 272     |
| >150                                                            | 191       | 396     | 421                               | 739     | 501     | 220     |
| Summe                                                           | 420       | 728     | 814                               | 1223    | 894     | 492     |

**Anhang 13**

zu Kapitel 4.2.1.3 / Seiten 89-94

*Deinking von AP nach Inkubation mit 1 % HBT und niedrig dosierter T. villosa-Laccase im neutralen pH-Bereich*

|                                               |                                   |         |         |         |         |         |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Fahrweise [-]                                 | alkalisch                         | neutral | neutral | neutral | neutral | neutral |
| Temperatur [°C]                               | 55°C                              | 55°C    | 55°C    | 55°C    | 55°C    | 55°C    |
| pH [-]                                        | 7                                 | 7       | 7       | 7       | 7       | 7       |
| Inkubationszeit [min]                         | 90                                | 90      | 90      | 90      | 90      | 90      |
| Stoff [-]                                     | AP                                | AP      | AP      | AP      | AP      | AP      |
| Aktivität [U/g otro AP]                       | 0                                 | 0       | 10      | 50      | 100     | 1000    |
| HBT [%]                                       | 0                                 | 0       | 1       | 1       | 1       | 1       |
| Aceton [ml]                                   | 0                                 | 10      | 10      | 10      | 10      | 10      |
| nach Flotation                                |                                   |         |         |         |         |         |
| Ausbeute [%]                                  | 63                                | 62      | 62      | 64      | 62      | 67      |
|                                               | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                             | 82,74                             | 79,33   | 78,52   | 79,26   | 79,15   | 76,60   |
| grün-rot a* [-]                               | -0,54                             | -0,63   | -0,61   | -0,54   | -0,55   | -0,47   |
| gelb-blau b* [-]                              | 5,70                              | 5,26    | 5,17    | 5,15    | 5,44    | 5,16    |
| Weißgrad [% ISO]                              | 56,6                              | 51,2    | 49,9    | 51,1    | 50,7    | 46,8    |
| Gelbwert [-]                                  | 11,5                              | 11,0    | 10,9    | 10,8    | 11,4    | 11,2    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                 | 11,3                              | 8,4     | 8,1     | 9,1     | 7,9     | 9,4     |
| Ascheaustragbedingter                         | 2,4                               | 2,7     | 2,7     | 2,6     | 2,8     | 2,6     |
| Remissionsverlust [% ISO]                     |                                   |         |         |         |         |         |
| Weißgrad bereinigt um den Aschegehalt [% ISO] | 59,0                              | 53,9    | 52,7    | 53,7    | 53,5    | 49,4    |
| nach Hyperwäsche                              |                                   |         |         |         |         |         |
|                                               | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                             | 82,82                             | 80,34   | 80,00   | 79,65   | 79,60   | 78,37   |
| grün-rot a* [-]                               | -0,74                             | -0,90   | -0,86   | -0,80   | -0,78   | -0,60   |
| gelb-blau b* [-]                              | 6,46                              | 6,01    | 6,04    | 6,20    | 6,23    | 6,53    |
| Weißgrad [% ISO]                              | 56,2                              | 52,4    | 51,8    | 51,0    | 50,9    | 48,6    |
| Gelbwert [-]                                  | 12,9                              | 12,1    | 12,3    | 12,7    | 12,8    | 13,7    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                 | 2,2                               | 2,2     | 2,1     | 2,3     | 2,2     | 2,8     |
| Ascheaustragbedingter                         | 5,5                               | 5,4     | 5,5     | 5,4     | 5,4     | 5,0     |
| Remissionsverlust [% ISO]                     |                                   |         |         |         |         |         |
| Weißgrad bereinigt um den Aschegehalt [% ISO] | 61,6                              | 57,8    | 57,3    | 56,4    | 56,4    | 53,6    |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm²/m²]         |                                   |         |         |         |         |         |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]           |                                   |         |         |         |         |         |
| 50-100                                        | 154                               | 210     | 268     | 219     | 274     | 180     |
| 100-150                                       | 75                                | 122     | 158     | 126     | 152     | 98      |
| 150-200                                       | 37                                | 77      | 80      | 69      | 80      | 41      |
| 200-250                                       | 19                                | 51      | 44      | 43      | 37      | 26      |
| 250-300                                       | 12                                | 47      | 59      | 42      | 42      | 24      |
| 300-350                                       | 11                                | 40      | 24      | 17      | 54      | 7       |
| 350-400                                       | 0                                 | 24      | 11      | 29      | 30      | 24      |
| 400-450                                       | 26                                | 19      | 32      | 12      | 6       | 6       |
| 450-500                                       | 23                                | 0       | 16      | 8       | 7       | 8       |
| >500                                          | 63                                | 138     | 130     | 23      | 145     | 84      |
| 50-150                                        | 229                               | 332     | 426     | 345     | 426     | 278     |
| >150                                          | 191                               | 396     | 396     | 243     | 402     | 220     |
| Summe                                         | 420                               | 728     | 822     | 588     | 828     | 498     |

**Anhang 14**

zu Kapitel 4.2.2.1 / Seiten 98-101

*Deinking von DIP nach Inkubation mit 10, 50, 100 & 1000 U/g T. villosa-Laccase und Mediator HBT*

|                                                                 |                                   |         |         |         |         |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Fahrweise [-]                                                   | neutral                           | neutral | neutral | neutral | neutral | neutral |
| Temperatur [°C]                                                 | 55°C                              | 55°C    | 55°C    | 55°C    | 55°C    | 55°C    |
| pH [-]                                                          | 7                                 | 7       | 7       | 7       | 7       | 8       |
| Inkubationszeit [min]                                           | 90                                | 90      | 90      | 90      | 90      | 90      |
| AP-Qualität [-]                                                 | DIP                               | DIP     | DIP     | DIP     | DIP     | DIP     |
| Aktivität [U/g otro DIP]                                        | 0                                 | 0       | 10      | 50      | 100     | 1000    |
| HBT [%]                                                         | 0                                 | 0       | 1       | 1       | 1       | 1       |
| Aceton [ml]                                                     | 0                                 | 75      | 75      | 75      | 75      | 75      |
| nach Flotation                                                  |                                   |         |         |         |         |         |
| Ausbeute [%]                                                    | 90                                | 87      | 88      | 86      | 87      | 85      |
|                                                                 | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                                               | 88,31                             | 88,55   | 88,32   | 88,57   | 87,80   | 86,87   |
| grün-rot a* [-]                                                 | 0,27                              | 0,28    | 0,28    | 0,34    | 0,28    | 0,40    |
| blau-gelb b* [-]                                                | 5,61                              | 5,77    | 5,91    | 6,05    | 6,15    | 6,70    |
| Weißgrad [% ISO]                                                | 67,2                              | 67,5    | 66,9    | 67,2    | 65,6    | 63,3    |
| Gelbwert [-]                                                    | 11,5                              | 11,8    | 12,0    | 12,3    | 12,5    | 13,8    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                                   | 10,9                              | 9,2     | 9,6     | 8,9     | 9,1     | 8,5     |
| Ascheausttragbedingter Remissionsverlust [% ISO]                | 2,4                               | 2,6     | 2,5     | 2,6     | 2,6     | 2,7     |
| Weißgrad, bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]                  | 69,6                              | 70,1    | 69,4    | 69,8    | 68,2    | 66,0    |
| nach Hyperwäsche                                                |                                   |         |         |         |         |         |
|                                                                 | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                                               | 87,73                             | 88,21   | 87,85   | 88,01   | 86,96   | 86,40   |
| grün-rot a* [-]                                                 | 0,09                              | 0,03    | 0,09    | 0,13    | 0,06    | 0,09    |
| blau-gelb b* [-]                                                | 6,33                              | 6,46    | 6,56    | 6,57    | 7,02    | 7,11    |
| Weißgrad [% ISO]                                                | 65,5                              | 66,3    | 65,4    | 65,7    | 63,3    | 62,5    |
| Gelbwert [-]                                                    | 12,7                              | 12,9    | 13,2    | 12,6    | 14,1    | 14,5    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                                   | 0,9                               | 1,2     | 1,3     | 1,1     | 1,2     | 1,7     |
| Ascheausttragbedingter Remissionsverlust [% ISO]                | 6,7                               | 6,4     | 6,3     | 6,5     | 6,4     | 5,9     |
| Weißgrad, bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]                  | 72,2                              | 72,7    | 71,7    | 72,2    | 69,7    | 68,4    |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> ] |                                   |         |         |         |         |         |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]                             |                                   |         |         |         |         |         |
| 50-100                                                          | 52                                | 42      | 49      | 45      | 52      | 52      |
| 100-150                                                         | 31                                | 31      | 31      | 26      | 27      | 35      |
| 150-200                                                         | 17                                | 17      | 21      | 21      | 14      | 20      |
| 200-250                                                         | 8                                 | 6       | 11      | 7       | 4       | 6       |
| 250-300                                                         | 7                                 | 3       | 5       | 4       | 2       | 7       |
| 300-350                                                         | 12                                | 10      | 15      | 3       | 19      | 15      |
| 350-400                                                         | 20                                | 19      | 14      | 14      | 5       | 5       |
| 400-450                                                         | 0                                 | 0       | 6       | 0       | 0       | 7       |
| 450-500                                                         | 0                                 | 0       | 0       | 0       | 8       | 0       |
| >500                                                            | 0                                 | 11      | 0       | 9       | 0       | 11      |
| 50-150                                                          | 83                                | 73      | 80      | 71      | 79      | 87      |
| >150                                                            | 64                                | 66      | 72      | 59      | 52      | 71      |
| Summe                                                           | 147                               | 139     | 152     | 130     | 131     | 158     |

**Anhang 15**

zu Kapitel 4.2.2.1 / Seiten 102-104

*Deinking von DIP nach Inkubation mit 200, 400, 600 und 800 U/g T. villosa-Laccase und Mediator HBT*

|                                                 |                                   |         |         |         |         |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| Fahrweise [-]                                   | neutral                           | neutral | neutral | neutral | neutral |
| Temperatur [°C]                                 | 55°C                              | 55°C    | 55°C    | 55°C    | 55°C    |
| pH [-]                                          | 7                                 | 7       | 7       | 7       | 7       |
| Inkubationszeit [min]                           | 90                                | 90      | 90      | 90      | 90      |
| AP-Qualität [-]                                 | DIP                               | DIP     | DIP     | DIP     | DIP     |
| Aktivität [U/g otro DIP]                        | 0                                 | 200     | 400     | 600     | 800     |
| HBT [%]                                         | 0                                 | 1       | 1       | 1       | 1       |
| Aceton [ml]                                     | 75                                | 75      | 75      | 75      | 75      |
| nach Flotation                                  |                                   |         |         |         |         |
| Ausbeute [%]                                    | 88                                | 88      | 87      | 87      | 86      |
|                                                 | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                               | 87,49                             | 86,84   | 86,65   | 86,66   | 86,73   |
| grün-rot a* [-]                                 | 0,26                              | 0,31    | 0,32    | 0,44    | 0,25    |
| blau-gelb b* [-]                                | 5,98                              | 6,49    | 6,75    | 6,69    | 6,93    |
| Weißgrad [% ISO]                                | 65,2                              | 63,4    | 62,8    | 62,9    | 62,8    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                   | 6,1                               | 5,9     | 5,7     | 5,4     | 5,3     |
| Ascheaustragbedingter Remissionsverlust [% ISO] | 3,2                               | 3,3     | 3,4     | 3,5     | 3,5     |
| Weißgrad, bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]  | 68,5                              | 66,7    | 66,2    | 66,4    | 66,3    |
| Gelbwert [-]                                    | 12,3                              | 13,3    | 13,9    | 13,9    | 14,2    |
| nach Hyperwäsche                                |                                   |         |         |         |         |
|                                                 | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                               | 87,23                             | 87,19   | 87,03   | 86,99   | 87,28   |
| grün-rot a* [-]                                 | 0,05                              | 0,16    | 0,15    | 0,32    | 0,16    |
| blau-gelb b* [-]                                | 6,42                              | 6,52    | 6,86    | 6,67    | 6,83    |
| Weißgrad [% ISO]                                | 64,4                              | 64,1    | 63,5    | 63,6    | 64,0    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                   | 1,0                               | 1,3     | 1,3     | 1,3     | 1,4     |
| Ascheaustragbedingter Remissionsverlust [% ISO] | 6,5                               | 6,3     | 6,2     | 6,3     | 6,2     |
| Weißgrad, bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]  | 70,9                              | 70,5    | 69,7    | 69,9    | 70,2    |
| Gelbwert [-]                                    | 13,0                              | 13,3    | 13,9    | 13,7    | 13,8    |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm²/m²]           |                                   |         |         |         |         |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]             |                                   |         |         |         |         |
| 50-100                                          | 116                               | 98      | 110     | 104     | 118     |
| 100-150                                         | 83                                | 90      | 85      | 70      | 81      |
| 150-200                                         | 56                                | 51      | 68      | 48      | 67      |
| 200-250                                         | 35                                | 34      | 47      | 33      | 44      |
| 250-300                                         | 25                                | 18      | 15      | 27      | 32      |
| 300-350                                         | 13                                | 17      | 14      | 11      | 11      |
| 350-400                                         | 9                                 | 5       | 0       | 0       | 0       |
| 400-450                                         | 0                                 | 0       | 0       | 0       | 23      |
| 450-500                                         | 7                                 | 16      | 0       | 7       | 24      |
| >500                                            | 14                                | 10      | 10      | 0       | 0       |
| 50-150                                          | 199                               | 188     | 195     | 174     | 199     |
| >150                                            | 159                               | 151     | 154     | 126     | 201     |
| Summe                                           | 358                               | 339     | 349     | 300     | 400     |

**Anhang 16**

zu Kapitel 4.2.2.2 / Seiten 105-107

**Deinking von DIP nach Inkubation mit *T. villosa*-Laccase und variabler HBT-Konzentration**

|                                                 |                                   |         |         |         |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|
| Fahrweise [-]                                   | neutral                           | neutral | neutral | neutral |
| Temperatur [°C]                                 | 55 °C                             | 55 °C   | 55 °C   | 55 °C   |
| pH [-]                                          | 7                                 | 7       | 7       | 7       |
| Inkubationszeit [min]                           | 90                                | 90      | 90      | 90      |
| AP-Qualität [-]                                 | DIP                               | DIP     | DIP     | DIP     |
| Aktivität [U/g otro DIP]                        | 400                               | 400     | 400     | 400     |
| HBT [%]                                         | 0                                 | 0,1     | 0,5     | 2       |
| Aceton [ml]                                     | 75                                | 75      | 75      | 75      |
| nach Flotation                                  |                                   |         |         |         |
| Ausbeute [%]                                    | 81                                | 81      | 81      | 87      |
|                                                 | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                               | 86,79                             | 86,41   | 86,65   | 86,52   |
| grün-rot a* [-]                                 | 0,32                              | 0,30    | 0,32    | 0,35    |
| blau-gelb b* [-]                                | 6,51                              | 6,63    | 6,67    | 6,74    |
| Weißgrad [% ISO]                                | 63,3                              | 62,5    | 62,9    | 62,6    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                   | 5,9                               | 5,7     | 5,4     | 5,7     |
| Ascheaustragbedingter Remissionsverlust [% ISO] | 3,3                               | 3,4     | 3,5     | 3,4     |
| Weißgrad, bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]  | 66,6                              | 65,9    | 66,4    | 66,0    |
| Gelbwert [-]                                    | 13,4                              | 13,7    | 13,7    | 13,9    |
| nach Hyperwäsche                                |                                   |         |         |         |
|                                                 | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                               | 86,94                             | 87,10   | 87,14   | 86,82   |
| grün-rot a* [-]                                 | 0,10                              | 0,10    | 0,15    | 0,19    |
| blau-gelb b* [-]                                | 6,60                              | 6,65    | 6,62    | 6,57    |
| Weißgrad [% ISO]                                | 63,6                              | 63,8    | 63,9    | 63,4    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                   | 0,9                               | 0,9     | 1,1     | 0,9     |
| Ascheaustragbedingter Remissionsverlust [% ISO] | 6,7                               | 6,7     | 6,4     | 6,7     |
| Weißgrad, bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]  | 70,3                              | 70,5    | 70,4    | 70,1    |
| Gelbwert [-]                                    | 13,4                              | 13,5    | 13,4    | 13,4    |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm²/m²]           |                                   |         |         |         |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]             |                                   |         |         |         |
| 50-100                                          | 93                                | 100     | 107     | 99      |
| 100-150                                         | 65                                | 77      | 89      | 91      |
| 150-200                                         | 54                                | 53      | 61      | 48      |
| 200-250                                         | 28                                | 44      | 39      | 32      |
| 250-300                                         | 41                                | 17      | 14      | 27      |
| 300-350                                         | 8                                 | 22      | 16      | 10      |
| 350-400                                         | 9                                 | 5       | 18      | 5       |
| 400-450                                         | 0                                 | 0       | 6       | 6       |
| 450-500                                         | 0                                 | 0       | 0       | 0       |
| >500                                            | 0                                 | 0       | 16      | 31      |
| 50-150                                          | 158                               | 177     | 196     | 190     |
| >150                                            | 140                               | 141     | 170     | 159     |
| Summe                                           | 298                               | 318     | 366     | 349     |

**Anhang 17**

zu Kapitel 4.2.2.3 / Seiten 108-111

*Deinking von DIP nach Inkubation mit T. villosa-Laccase-Gaben von 0, 10, 50, 100 und 1000 U/g ohne Mediator*

| Fahrweise [-]                         | Rohweiße | neutral                           | neutral | neutral | neutral | neutral |
|---------------------------------------|----------|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| Temperatur [°C]                       | 55°C     | 55°C                              | 55°C    | 55°C    | 55°C    | 55°C    |
| pH [-]                                | 7        | 7                                 | 7       | 7       | 7       | 7       |
| Inkubationszeit [min]                 | 90       | 90                                | 90      | 90      | 90      | 90      |
| AP-Qualität [-]                       | DIP      | DIP                               | DIP     | DIP     | DIP     | DIP     |
| Aktivität [U/g otro DIP]              | 0        | 0                                 | 10      | 50      | 100     | 1000    |
| nach Flotation                        |          |                                   |         |         |         |         |
| Ausbeute [%]                          | -        | 85                                | 89      | 89      | 89      | 85      |
|                                       |          | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                     | 86,38    | 88,04                             | 88,12   | 88,22   | 87,73   | 86,88   |
| grün-rot a* [-]                       | 0,49     | 0,28                              | 0,37    | 0,44    | 0,38    | 0,40    |
| blau-gelb b* [-]                      | 5,14     | 5,95                              | 5,85    | 5,95    | 5,86    | 6,73    |
| Weißgrad [% ISO]                      | 63,9     | 66,4                              | 66,5    | 66,6    | 65,8    | 63,3    |
| Gelbwert [-]                          | 10,9     | 12,1                              | 12,0    | 12,3    | 12,1    | 13,9    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]         | 12,5     | 8,5                               | 10,9    | 10,4    | 10,5    | 8,8     |
| Ascheaustragbedingter                 | 2,3      | 2,7                               | 2,4     | 2,5     | 2,5     | 2,6     |
| Remissionsverlust [% ISO]             |          |                                   |         |         |         |         |
| Weißgrad, bereinigt um den            | 66,2     | 69,0                              | 69,0    | 69,1    | 68,2    | 65,9    |
| Aschegehalt [% ISO]                   |          |                                   |         |         |         |         |
| nach Hyperwäsche                      |          |                                   |         |         |         |         |
|                                       |          | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                     | -        | 87,10                             | 87,65   | 87,90   | 86,68   | 86,26   |
| grün-rot a* [-]                       | -        | -0,01                             | 0,23    | 0,22    | 0,18    | 0,17    |
| blau-gelb b* [-]                      | -        | 6,75                              | 6,64    | 6,63    | 6,94    | 7,46    |
| Weißgrad [% ISO]                      | -        | 63,9                              | 65,0    | 65,5    | 62,8    | 61,5    |
| Gelbwert [-]                          | -        | 13,5                              | 13,5    | 13,4    | 14,1    | 15,2    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]         | -        | 1,0                               | 1,2     | 1,4     | 1,3     | 1,1     |
| Ascheaustragbedingter                 | -        | 6,6                               | 6,4     | 6,2     | 6,3     | 6,4     |
| Remissionsverlust [% ISO]             |          |                                   |         |         |         |         |
| Weißgrad, bereinigt um den            | -        | 70,4                              | 71,4    | 71,6    | 69,1    | 67,9    |
| Aschegehalt [% ISO]                   |          |                                   |         |         |         |         |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm²/m²] |          |                                   |         |         |         |         |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]   |          |                                   |         |         |         |         |
| 50-100                                | 64       | 53                                | 45      | 48      | 49      | 55      |
| 100-150                               | 36       | 31                                | 27      | 29      | 41      | 35      |
| 150-200                               | 18       | 21                                | 17      | 19      | 25      | 24      |
| 200-250                               | 25       | 13                                | 15      | 8       | 9       | 13      |
| 250-300                               | 16       | 5                                 | 16      | 5       | 10      | 5       |
| 300-350                               | 3        | 14                                | 4       | 3       | 11      | 15      |
| 350-400                               | 15       | 10                                | 14      | 14      | 10      | 9       |
| 400-450                               | 0        | 13                                | 13      | 7       | 0       | 0       |
| 450-500                               | 0        | 0                                 | 7       | 8       | 0       | 0       |
| >500                                  | 0        | 21                                | 35      | 0       | 15      | 10      |
| 50-150                                | 100      | 84                                | 72      | 77      | 90      | 90      |
| >150                                  | 77       | 97                                | 121     | 65      | 79      | 76      |
| Summe                                 | 177      | 181                               | 193     | 142     | 169     | 166     |

**Anhang 18**

zu Kapitel 4.2.2.3 / Seiten 112-114

*Deinking von DIP nach Inkubation mit T. villosa-Laccase-Gaben von 0, 30, 50 und 70 U/g ohne Mediator*

|                                                 |         |                                   |         |         |         |
|-------------------------------------------------|---------|-----------------------------------|---------|---------|---------|
| Fahrweise [-]                                   | neutral | neutral                           | neutral | neutral | neutral |
| Temperatur [°C]                                 | 55°C    | 55°C                              | 55°C    | 55°C    | 55°C    |
| pH [-]                                          | 7       | 7                                 | 7       | 7       | 7       |
| Inkubationszeit [min]                           | 90      | 90                                | 90      | 90      | 90      |
| AP-Qualität [-]                                 | DIP     | DIP                               | DIP     | DIP     | DIP     |
| Aktivität [U/g otro DIP]                        | 0       | 0                                 | 30      | 50      | 70      |
| nach Flotation                                  |         |                                   |         |         |         |
| Ausbeute [%]                                    | -       | 87                                | 86      | 87      | 87      |
|                                                 |         | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                               | 85,98   | 87,64                             | 87,37   | 87,44   | 87,57   |
| grün-rot a* [-]                                 | 0,57    | 0,35                              | 0,41    | 0,49    | 0,51    |
| blau-gelb b* [-]                                | 4,34    | 4,95                              | 4,94    | 4,98    | 5,15    |
| Weißgrad [% ISO]                                | 63,81   | 66,5                              | 66,0    | 66,1    | 66,1    |
| Gelbwert [-]                                    | 9,4     | 10,3                              | 10,4    | 10,5    | 10,8    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                   | 12,4    | 10,2                              | 10,0    | 10,0    | 9,8     |
| Ascheaustragbedingter Remissionsverlust [% ISO] | 2,3     | 2,5                               | 2,5     | 2,5     | 2,5     |
| Weißgrad, bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]  | 66,2    | 69,0                              | 68,5    | 68,6    | 68,7    |
| nach Hyperwäsche                                |         |                                   |         |         |         |
|                                                 |         | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                               | -       | 87,23                             | 86,79   | 87,03   | 86,67   |
| grün-rot a* [-]                                 | -       | 0,12                              | 0,13    | 0,16    | 0,19    |
| blau-gelb b* [-]                                | -       | 5,48                              | 5,75    | 5,58    | 5,93    |
| Weißgrad [% ISO]                                | -       | 65,3                              | 64,2    | 64,9    | 64,2    |
| Gelbwert [-]                                    | -       | 11,2                              | 11,7    | 11,4    | 12,2    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                   | -       | 1,0                               | 1,1     | 1,0     | 1,0     |
| Ascheaustragbedingter Remissionsverlust [% ISO] | -       | 6,6                               | 6,5     | 6,6     | 6,6     |
| Weißgrad, bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]  | -       | 72,0                              | 70,7    | 71,5    | 70,8    |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm²/m²]           |         |                                   |         |         |         |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]             |         |                                   |         |         |         |
| 50-100                                          | -       | 130                               | 138     | 132     | 131     |
| 100-150                                         | -       | 132                               | 120     | 105     | 119     |
| 150-200                                         | -       | 83                                | 100     | 103     | 90      |
| 200-250                                         | -       | 72                                | 46      | 61      | 71      |
| 250-300                                         | -       | 50                                | 41      | 37      | 42      |
| 300-350                                         | -       | 25                                | 31      | 24      | 31      |
| 350-400                                         | -       | 20                                | 23      | 9       | 13      |
| 400-450                                         | -       | 12                                | 6       | 0       | 20      |
| 450-500                                         | -       | 0                                 | 16      | 16      | 7       |
| >500                                            | -       | 0                                 | 0       | 29      | 0       |
| 50-150                                          | -       | 262                               | 258     | 237     | 250     |
| >150                                            | -       | 262                               | 263     | 279     | 274     |
| Summe                                           | -       | 524                               | 521     | 516     | 524     |

**Anhang 19**

zu Kapitel 4.2.2.3 / Seiten 115-117

*Deinking von DIP nach Inkubation mit T. villosa-Laccase-Gaben von 0, 200, 400, 600 und 800 U/g ohne Mediator*

|                                                 |                                   |         |         |         |         |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| Fahrweise [-]                                   | neutral                           | neutral | neutral | neutral | neutral |
| Temperatur [°C]                                 | 55°C                              | 55°C    | 55°C    | 55°C    | 55°C    |
| pH [-]                                          | 7                                 | 7       | 7       | 7       | 7       |
| Inkubationszeit [min]                           | 90                                | 90      | 90      | 90      | 90      |
| AP-Qualität [-]                                 | DIP                               | DIP     | DIP     | DIP     | DIP     |
| Aktivität [U/g otro DIP]                        | 0                                 | 200     | 400     | 600     | 800     |
| nach Flotation                                  |                                   |         |         |         |         |
| Ausbeute [%]                                    | 89                                | 89      | 90      | 89      | 89      |
|                                                 | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                               | 87,23                             | 87,18   | 86,92   | 86,71   | 86,77   |
| grün-rot a* [-]                                 | 0,34                              | 0,34    | 0,43    | 0,46    | 0,47    |
| blau-gelb b* [-]                                | 5,85                              | 6,26    | 6,47    | 6,48    | 6,72    |
| Weißgrad [% ISO]                                | 64,8                              | 64,3    | 63,6    | 63,2    | 63,0    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                   | 6,9                               | 6,5     | 6,6     | 6,7     | 6,3     |
| Ascheaustragbedingter Remissionsverlust [% ISO] | 3,0                               | 3,1     | 3,1     | 3,1     | 3,2     |
| Weißgrad, bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]  | 67,8                              | 67,4    | 66,7    | 66,2    | 66,2    |
| Gelbwert [-]                                    | 12,1                              | 12,9    | 13,4    | 13,5    | 13,9    |
| nach Hyperwäsche                                |                                   |         |         |         |         |
|                                                 | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |         |         |
| Helligkeit L* [-]                               | 87,58                             | 87,52   | 87,17   | 87,17   | 87,11   |
| grün-rot a* [-]                                 | 0,08                              | 0,17    | 0,17    | 0,26    | 0,34    |
| blau-gelb b* [-]                                | 6,27                              | 6,25    | 6,73    | 6,70    | 6,76    |
| Weißgrad [% ISO]                                | 65,2                              | 65,1    | 63,9    | 63,9    | 63,7    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                   | 1,1                               | 0,9     | 1,0     | 1,0     | 1,1     |
| Ascheaustragbedingter Remissionsverlust [% ISO] | 6,5                               | 6,7     | 6,6     | 6,5     | 6,4     |
| Weißgrad, bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]  | 71,7                              | 71,8    | 70,5    | 70,5    | 70,2    |
| Gelbwert [-]                                    | 12,6                              | 12,7    | 13,6    | 13,7    | 13,8    |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm²/m²]           |                                   |         |         |         |         |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]             |                                   |         |         |         |         |
| 50-100                                          | 100                               | 98      | 115     | 119     | 109     |
| 100-150                                         | 72                                | 74      | 84      | 77      | 81      |
| 150-200                                         | 58                                | 64      | 68      | 51      | 72      |
| 200-250                                         | 35                                | 30      | 32      | 43      | 36      |
| 250-300                                         | 25                                | 34      | 29      | 24      | 28      |
| 300-350                                         | 35                                | 14      | 7       | 21      | 3       |
| 350-400                                         | 16                                | 14      | 19      | 22      | 14      |
| 400-450                                         | 12                                | 0       | 14      | 18      | 7       |
| 450-500                                         | 0                                 | 0       | 8       | 7       | 23      |
| >500                                            | 0                                 | 17      | 13      | 0       | 42      |
| 50-150                                          | 172                               | 172     | 199     | 196     | 190     |
| >150                                            | 181                               | 173     | 189     | 186     | 225     |
| Summe                                           | 353                               | 345     | 388     | 382     | 415     |

**Anhang 20**

zu Kapitel 4.2.3 / Seiten 118-119

*Deinking einer Referenzmischung aus unbedrucktem Zeitungsdruckpapier nach Inkubation mit T. villosa-Laccase und Mediator HBT*

|                                                 |                                   |         |         |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|
| Fahrweise [-]                                   | neutral                           | neutral | neutral |
| Temperatur [°C]                                 | 55°C                              | 55°C    | 55°C    |
| pH [-]                                          | 7                                 | 7       | 7       |
| Inkubationszeit [min]                           | 90                                | 90      | 90      |
| AP-Qualität [-]                                 | DIP                               | DIP     | DIP     |
| Aktivität [U/g otro DIP]                        | 0                                 | 1000    | 1000    |
| HBT [%]                                         | 0                                 | 0       | 1       |
| Aceton [ml]                                     | 0                                 | 0       | 75      |
| nach Flotation                                  |                                   |         |         |
| Ausbeute [%]                                    | 72                                | 72      | 68      |
|                                                 | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |
| Helligkeit L* [-]                               | 86,90                             | 85,75   | 85,73   |
| grün-rot a* [-]                                 | -0,29                             | 0,14    | 0,16    |
| blau-gelb b* [-]                                | 6,61                              | 7,76    | 8,57    |
| Weißgrad [% ISO]                                | 63,7                              | 60,3    | 59,5    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                   | 12,5                              | 12,6    | 8,9     |
| Ascheaustragbedingter Remissionsverlust [% ISO] | 2,3                               | 2,3     | 2,6     |
| Weißgrad, bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]  | 66,1                              | 62,6    | 62,1    |
| Gelbwert [-]                                    | 13,0                              | 15,8    | 17,4    |
|                                                 | nach Hyperwäsche                  |         |         |
|                                                 | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |
| Helligkeit L* [-]                               | 86,40                             | 85,82   | 85,64   |
| grün-rot a* [-]                                 | -0,42                             | 0,18    | 0,16    |
| blau-gelb b* [-]                                | 8,13                              | 9,33    | 9,55    |
| Weißgrad [% ISO]                                | 61,5                              | 59,0    | 58,5    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                   | 1,5                               | 1,7     | 1,4     |
| Ascheaustragbedingter Remissionsverlust [% ISO] | 6,1                               | 5,9     | 6,2     |
| Weißgrad, bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]  | 67,6                              | 65,0    | 64,7    |
| Gelbwert [-]                                    | 15,9                              | 18,8    | 19,3    |

**Anhang 21**

zu Kapitel 4.2.4.1 / Seiten 121-123

*Deinking von Laccase- bzw. LMS-behandeltem DIP. Laccase von T. villosa*

|                                                                 |                                   |         |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|
| Fahrweise [-]                                                   | neutral                           | neutral | neutral |
| Temperatur [°C]                                                 | 55 °C                             | 55 °C   | 55 °C   |
| pH [-]                                                          | 7                                 | 7       | 7       |
| Inkubationszeit [min]                                           | 90                                | 90      | 90      |
| AP-Qualität [-]                                                 | DIP                               | DIP     | DIP     |
| Laccase [U/g otro DIP]                                          | 0                                 | 1000    | 1000    |
| HBT [%]                                                         | 0                                 | 0       | 1       |
| Aceton [ml]                                                     | 0                                 | 0       | 170     |
| nach Flotation                                                  |                                   |         |         |
| Ausbeute [%]                                                    | 87                                | 89      | 83      |
|                                                                 | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |
| Helligkeit L* [-]                                               | 86,92                             | 86,33   | 86,19   |
| grün-rot a* [-]                                                 | 0,34                              | 0,52    | 0,49    |
| blau-gelb b* [-]                                                | 5,58                              | 6,75    | 7,22    |
| Weißgrad [% ISO]                                                | 64,5                              | 62,2    | 61,4    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                                   | 7,6                               | 7,4     | 6,0     |
| Ascheaustagbedingter Remissionsverlust [% ISO]                  | 2,8                               | 2,9     | 3,3     |
| Weißgrad, bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]                  | 67,3                              | 65,0    | 64,7    |
| Gelbwert [-]                                                    | 11,6                              | 14,1    | 15,0    |
| nach Hyperwäsche                                                |                                   |         |         |
|                                                                 | Mittelwerte, Nutschblattoberseite |         |         |
| Helligkeit L* [-]                                               | 87,02                             | 86,56   | 86,18   |
| grün-rot a* [-]                                                 | -0,07                             | 0,12    | 0,19    |
| blau-gelb b* [-]                                                | 6,52                              | 7,31    | 7,62    |
| Weißgrad [% ISO]                                                | 63,9                              | 62,2    | 61,1    |
| Aschegehalt Weißgradblatt [%]                                   | 1,0                               | 1,0     | 1,0     |
| Ascheaustagbedingter Remissionsverlust [% ISO]                  | 6,6                               | 6,6     | 6,6     |
| Weißgrad, bereinigt um den Aschegehalt [% ISO]                  | 70,5                              | 68,8    | 67,7    |
| Gelbwert [-]                                                    | 13,1                              | 14,8    | 15,5    |
| Schmutzpunkte nach Flotation [mm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> ] |                                   |         |         |
| Schmutzpunktdurchmesserklassen [µm]                             |                                   |         |         |
| 50-100                                                          | 113                               | 111     | 112     |
| 100-150                                                         | 67                                | 82      | 77      |
| 150-200                                                         | 61                                | 58      | 43      |
| 200-250                                                         | 23                                | 25      | 28      |
| 250-300                                                         | 27                                | 8       | 24      |
| 300-350                                                         | 22                                | 17      | 7       |
| 350-400                                                         | 0                                 | 0       | 5       |
| 400-450                                                         | 0                                 | 6       | 6       |
| 450-500                                                         | 7                                 | 0       | 0       |
| >500                                                            | 24                                | 0       | 0       |
| 50-150                                                          | 180                               | 193     | 189     |
| >150                                                            | 164                               | 113     | 113     |
| Summe                                                           | 344                               | 306     | 302     |

**Anhang 22**

zu Kapitel 4.3.1.1 / Seiten 130-134

Kappazahlen, Weißgrade,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ - und Gelbwerte eines sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes nach einer Inkubationsphase (LM) mit verschiedenen Laccasen und HBT bei 0,5 MPa  $O_2$  und pH 4,5 sowie nach abgeschlossener alkalischer Extraktion (LM-E)

| Behandlung<br>[-]                                 | Aktivität<br>[U/g otro] | HBT<br>[%] | Kappazahl<br>[%] | Weißgrad<br>[% ISO] | $L^*$<br>[-] | $a^*$<br>[-] | $b^*$<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|---------------------------------------------------|-------------------------|------------|------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| bei Verwendung von <i>T. villosa</i> -Laccase     |                         |            |                  |                     |              |              |              |                 |
| Referenz                                          | 0                       | 0          | 8,1              | 40,6                | 81,25        | 4,22         | 20,97        | 44,5            |
| LM                                                | 5                       | 2          | 6,8              | 38,0                | 79,98        | 4,64         | 22,01        | 47,2            |
| LM                                                | 15                      | 2          | 6,7              | 37,9                | 80,00        | 4,68         | 22,18        | 47,5            |
| LM                                                | 1000                    | 1          | 6,1              | 39,6                | 80,84        | 4,60         | 21,43        | 45,8            |
| Referenz-E                                        | 0                       | 0          | 7,1              | 43,0                | 82,86        | 3,88         | 20,89        | 43,5            |
| LM-E                                              | 5                       | 2          | 5,6              | 46,1                | 84,35        | 3,46         | 19,82        | 40,7            |
| LM-E                                              | 15                      | 2          | 4,8              | 46,7                | 84,63        | 3,41         | 19,65        | 40,3            |
| LM-E                                              | 1000                    | 1          | 5,3              | 48,2                | 85,12        | 3,26         | 18,82        | 38,6            |
| bei Verwendung von <i>M. thermophila</i> -Laccase |                         |            |                  |                     |              |              |              |                 |
| Referenz                                          | 0                       | 0          | 8,1              | 39,9                | 81,01        | 4,37         | 21,32        | 45,4            |
| LM                                                | 5                       | 2          | 7,9              | 39,9                | 80,90        | 4,39         | 21,15        | 45,1            |
| LM                                                | 15                      | 2          | 7,8              | 39,0                | 80,49        | 4,49         | 21,54        | 46,0            |
| LM                                                | 1000                    | 1          | 7,6              | 34,6                | 78,35        | 5,47         | 23,62        | 51,4            |
| Referenz-E                                        | 0                       | 0          | 7,2              | 42,4                | 82,67        | 4,03         | 21,30        | 44,3            |
| LM-E                                              | 5                       | 2          | 6,9              | 43,8                | 83,40        | 3,85         | 20,85        | 43,2            |
| LM-E                                              | 15                      | 2          | 6,9              | 43,7                | 83,40        | 3,88         | 20,99        | 43,4            |
| LM-E                                              | 1000                    | 1          | 5,6              | 44,1                | 83,57        | 3,88         | 20,75        | 42,9            |
| bei Verwendung von <i>T. versicolor</i> -Laccase  |                         |            |                  |                     |              |              |              |                 |
| Referenz                                          | 0                       | 0          | 7,8              | 39,6                | 80,88        | 4,42         | 21,59        | 45,9            |
| LM                                                | 2                       | 2          | 7,7              | 35,7                | 78,22        | 5,14         | 21,92        | 48,3            |
| LM                                                | 5                       | 2          | 7,3              | 36,3                | 78,76        | 5,17         | 22,05        | 48,3            |
| LM                                                | 15                      | 2          | 6,4              | 35,4                | 78,55        | 5,51         | 22,92        | 50,2            |
| Referenz-E                                        | 0                       | 0          | 7,3              | 42,4                | 82,68        | 3,97         | 21,27        | 44,2            |
| LM-E                                              | 2                       | 2          | 6,5              | 43,8                | 83,36        | 3,72         | 20,80        | 43,0            |
| LM-E                                              | 5                       | 2          | 5,3              | 44,1                | 83,60        | 3,81         | 20,82        | 43,0            |
| LM-E                                              | 15                      | 2          | 4,8              | 47,3                | 84,86        | 3,35         | 19,43        | 39,8            |

**Anhang 23**

zu Kapitel 4.3.1.2.1 / Seiten 135-140

Einfluss verschiedener pH-Werte während der Inkubationsphase einer Laccase-Mediator-Behandlung auf die Entwicklung des Weißgrades, der Farbwerte  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  und des Gelbwertes eines sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes. Inkubationsbedingungen: pH 4,5 - 8; Sauerstoffdruck: 0,5 MPa; HBT: 1%; Aktivität: 1000 U/g (*T. villosa*- und *M. thermophila*-Laccase) bzw. 15 U/g (*T. versicolor*-Laccase)

| Behandlung<br>[-]                                 | Aktivität<br>[U/g] | HBT<br>[%] | pH<br>[-] | Kappazahl<br>[-] | Weißgrad<br>[% ISO] | $L^*$<br>[-] | $a^*$<br>[-] | $b^*$<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|---------------------------------------------------|--------------------|------------|-----------|------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| bei Verwendung von <i>T. villosa</i> -Laccase     |                    |            |           |                  |                     |              |              |              |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 8,1              | 40,6                | 81,25        | 4,22         | 20,97        | 44,5            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 4,5       | 6,1              | 39,6                | 80,84        | 4,60         | 21,43        | 45,8            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 7,1              | 43,0                | 82,86        | 3,88         | 20,89        | 43,5            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 4,5       | 5,3              | 48,2                | 85,12        | 3,26         | 18,82        | 38,6            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 7,7              | 39,4                | 80,70        | 4,23         | 21,50        | 45,7            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7         | 7,2              | 39,1                | 80,62        | 4,33         | 21,71        | 46,1            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 6,8              | 41,6                | 82,24        | 3,91         | 21,53        | 44,8            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7         | 6,4              | 43,4                | 83,15        | 3,67         | 21,01        | 43,4            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7,5       | 7,6              | 39,2                | 80,64        | 4,22         | 21,64        | 45,9            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7,5       | 7,3              | 38,7                | 80,49        | 4,35         | 22,01        | 46,7            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7,5       | 6,8              | 42,9                | 82,75        | 3,68         | 20,79        | 43,1            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7,5       | 6,8              | 43,5                | 83,10        | 3,63         | 20,79        | 43,0            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 8         | 7,4              | 39,2                | 80,54        | 4,11         | 21,48        | 45,6            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 8         | 7,4              | 39,3                | 80,59        | 4,13         | 21,38        | 45,4            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 8         | 6,8              | 40,9                | 81,60        | 3,86         | 21,28        | 44,6            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 8         | 6,7              | 41,9                | 82,12        | 3,70         | 20,96        | 43,7            |
| bei Verwendung von <i>M. thermophila</i> -Laccase |                    |            |           |                  |                     |              |              |              |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 8,1              | 39,9                | 81,01        | 4,37         | 21,32        | 45,4            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 4,5       | 7,6              | 34,6                | 78,35        | 5,47         | 23,62        | 51,4            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 7,2              | 42,4                | 82,67        | 4,03         | 21,30        | 44,3            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 4,5       | 5,6              | 44,1                | 83,57        | 3,88         | 20,75        | 42,9            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 7,7              | 39,4                | 80,70        | 4,23         | 21,50        | 45,7            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7         | 7,1              | 39,1                | 80,74        | 4,42         | 21,95        | 46,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 6,8              | 41,6                | 82,24        | 3,91         | 21,53        | 44,8            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7         | 6,4              | 43,0                | 82,94        | 3,81         | 21,08        | 43,7            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7,5       | 7,6              | 39,2                | 80,64        | 4,22         | 21,64        | 45,9            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7,5       | 7,2              | 38,5                | 80,47        | 4,47         | 22,25        | 47,2            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7,5       | 6,8              | 42,9                | 82,75        | 3,68         | 20,79        | 43,1            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7,5       | 6,3              | 44,1                | 83,54        | 3,66         | 20,88        | 43,0            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 8         | 7,4              | 39,2                | 80,54        | 4,11         | 21,48        | 45,6            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 8         | 7,1              | 38,7                | 80,46        | 4,39         | 21,95        | 46,7            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 8         | 6,8              | 40,9                | 81,60        | 3,86         | 21,28        | 44,6            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 8         | 6,2              | 42,5                | 82,70        | 3,83         | 21,22        | 44,0            |
| bei Verwendung von <i>T. versicolor</i> -Laccase  |                    |            |           |                  |                     |              |              |              |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 7,8              | 39,6                | 80,88        | 4,42         | 21,59        | 45,9            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 4,5       | 6,4              | 35,4                | 78,55        | 5,51         | 22,92        | 50,2            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 7,3              | 42,4                | 82,68        | 3,97         | 21,27        | 44,2            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 4,5       | 4,8              | 47,3                | 84,86        | 3,35         | 19,43        | 39,8            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 7,7              | 39,4                | 80,70        | 4,23         | 21,50        | 45,7            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 7         | 7,2              | 39,9                | 81,00        | 4,21         | 21,37        | 45,3            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 6,8              | 41,6                | 82,24        | 3,91         | 21,53        | 44,8            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 7         | 6,6              | 42,4                | 82,61        | 3,76         | 21,24        | 44,0            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7,5       | 7,6              | 39,2                | 80,64        | 4,22         | 21,64        | 45,9            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 7,5       | 7,3              | 39,5                | 80,85        | 4,20         | 21,65        | 45,8            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7,5       | 6,8              | 42,9                | 82,75        | 3,68         | 20,79        | 43,1            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 7,5       | 6,6              | 43,8                | 83,24        | 3,60         | 20,64        | 42,7            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 8         | 7,4              | 39,2                | 80,54        | 4,11         | 21,48        | 45,6            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 8         | 7,5              | 39,7                | 80,85        | 4,07         | 21,41        | 45,3            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 8         | 6,8              | 40,9                | 81,60        | 3,86         | 21,28        | 44,6            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 8         | 6,6              | 42,5                | 82,53        | 3,73         | 20,97        | 43,6            |

**Anhang 24**

zu Kapitel 4.3.1.2.2 / Seiten 141-146

*Einfluss der Sauerstoffversorgung während der Inkubationsphase einer Laccase-Mediator-Behandlung auf die Entwicklung des Weißgrades, der Farbwerte L\*, a\*, b\* und des Gelbwertes eines sauerstoffvorgebleichten Nadelholz-Sulfatzellstoffes. Inkubationsbedingungen: pH 4,5 und 7; Sauerstoffdruck: 0,5 MPa und Luftatmosphäre; HBT: 1%; Aktivität: 1000 U/g (T. villosa- und M. thermophila-Laccase) bzw. 15 U/g (T. versicolor-Laccase). LM = nach Inkubation mit Laccase und Mediator; LM-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; Referenz und Referenz-E = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase und Mediator*

| Behandlung<br>[-]                                 | Aktivität<br>[U/g] | HBT<br>[%] | pH<br>[-] | O <sub>2</sub><br>[MPa] | Kappazahl<br>[-] | Weißgrad<br>[% ISO] | L*<br>[-] | a*<br>[-] | b*<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|---------------------------------------------------|--------------------|------------|-----------|-------------------------|------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| bei Verwendung von <i>T. villosa</i> -Laccase     |                    |            |           |                         |                  |                     |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 8,1              | 40,6                | 81,25     | 4,22      | 20,97     | 44,5            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 6,1              | 39,6                | 80,84     | 4,60      | 21,43     | 45,8            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 7,1              | 43,0                | 82,86     | 3,88      | 20,89     | 43,5            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 5,3              | 48,2                | 85,12     | 3,26      | 18,82     | 38,6            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 7,7              | 39,4                | 80,70     | 4,23      | 21,50     | 45,7            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 7         | 0,5                     | 7,2              | 39,1                | 80,62     | 4,33      | 21,71     | 46,1            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 6,8              | 41,6                | 82,24     | 3,91      | 21,53     | 44,8            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 7         | 0,5                     | 6,4              | 43,4                | 83,15     | 3,67      | 21,01     | 43,4            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 0,1                     | 7,9              | 40,5                | 81,32     | 4,27      | 21,22     | 44,9            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 4,5       | 0,1                     | 6,7              | 33,6                | 76,91     | 6,15      | 22,38     | 50,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,1                     | 7,2              | 41,5                | 82,20     | 4,10      | 21,59     | 45,1            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 4,5       | 0,1                     | 4,9              | 43,4                | 82,87     | 3,91      | 20,40     | 42,7            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 7,7              | 40,0                | 80,93     | 4,25      | 21,06     | 44,9            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 7,6              | 37,1                | 78,97     | 4,84      | 21,30     | 46,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 7,1              | 42,4                | 82,70     | 3,89      | 21,38     | 44,3            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 6,4              | 43,4                | 83,21     | 3,85      | 21,08     | 43,6            |
| bei Verwendung von <i>M. thermophila</i> -Laccase |                    |            |           |                         |                  |                     |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 8,1              | 39,9                | 81,01     | 4,37      | 21,32     | 45,4            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 7,6              | 34,6                | 78,35     | 5,47      | 23,62     | 51,4            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 7,2              | 42,4                | 82,67     | 4,03      | 21,30     | 44,3            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 5,6              | 44,1                | 83,57     | 3,88      | 20,75     | 42,9            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 7,7              | 39,4                | 80,70     | 4,23      | 21,50     | 45,7            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 7         | 0,5                     | 7,1              | 39,1                | 80,74     | 4,42      | 21,95     | 46,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 6,8              | 41,6                | 82,24     | 3,91      | 21,53     | 44,8            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 7         | 0,5                     | 6,4              | 43,0                | 82,94     | 3,81      | 21,08     | 43,7            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 0,1                     | 7,9              | 40,5                | 81,32     | 4,27      | 21,22     | 44,9            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 4,5       | 0,1                     | 8,0              | 31,3                | 75,02     | 6,33      | 22,33     | 51,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,1                     | 7,2              | 41,5                | 82,20     | 4,10      | 21,59     | 45,1            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 4,5       | 0,1                     | 6,2              | 40,6                | 81,75     | 4,41      | 21,81     | 45,9            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 7,7              | 40,0                | 80,93     | 4,25      | 21,06     | 44,9            |
| LMS                                               | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 7,8              | 37,2                | 79,01     | 4,87      | 21,33     | 46,7            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 7,1              | 42,4                | 82,70     | 3,89      | 21,38     | 44,3            |
| LMS-E                                             | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 6,9              | 43,0                | 82,89     | 3,92      | 20,94     | 43,5            |
| bei Verwendung von <i>T. versicolor</i> -Laccase  |                    |            |           |                         |                  |                     |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 7,8              | 39,6                | 80,88     | 4,42      | 21,59     | 45,9            |
| LMS                                               | 15                 | 2          | 4,5       | 0,5                     | 6,4              | 35,4                | 78,55     | 5,51      | 22,92     | 50,2            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 7,3              | 42,4                | 82,68     | 3,97      | 21,27     | 44,2            |
| LMS-E                                             | 15                 | 2          | 4,5       | 0,5                     | 4,8              | 47,3                | 84,86     | 3,35      | 19,43     | 39,8            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 7,7              | 39,4                | 80,70     | 4,23      | 21,50     | 45,7            |
| LMS                                               | 15                 | 2          | 7         | 0,5                     | 7,2              | 39,9                | 81,00     | 4,21      | 21,37     | 45,3            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 6,8              | 41,6                | 82,24     | 3,91      | 21,53     | 44,8            |
| LMS-E                                             | 15                 | 2          | 7         | 0,5                     | 6,6              | 42,4                | 82,61     | 3,76      | 21,24     | 44,0            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 0,1                     | 7,9              | 40,5                | 81,32     | 4,27      | 21,22     | 44,9            |
| LMS                                               | 15                 | 2          | 4,5       | 0,1                     | 7,0              | 33,8                | 76,81     | 5,86      | 21,87     | 49,5            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,1                     | 7,2              | 41,5                | 82,20     | 4,10      | 21,59     | 45,1            |
| LMS-E                                             | 15                 | 2          | 4,5       | 0,1                     | 5,6              | 43,1                | 82,90     | 3,97      | 20,76     | 43,3            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 7,7              | 40,0                | 80,93     | 4,25      | 21,06     | 44,9            |
| LMS                                               | 15                 | 2          | 7         | 0,1                     | 7,6              | 38,7                | 80,54     | 4,39      | 22,05     | 46,8            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 7,1              | 42,4                | 82,70     | 3,89      | 21,38     | 44,3            |
| LMS-E                                             | 15                 | 2          | 7         | 0,1                     | 6,9              | 44,1                | 83,45     | 3,68      | 20,64     | 42,6            |

**Anhang 25**

zu Kapitel 4.3.1.4 / Seiten 147-151

*Sauerstoffvorgebleichter Nadelholz-Sulfatzellstoff nach T. villosa-Laccase-Behandlung (L) im Bleichautoklaven bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck bzw. im offenen Temperiergefäß bei Luftatmosphäre bei pH-Werten von 4,5 und 7 sowie nach anschließender alkalischer Extraktion (E) bzw. Peroxidbleiche (P)*

| Behandlung<br>[-] | Aktivität<br>[U/g] | pH<br>[-] | O <sub>2</sub><br>[MPa] | Kappazahl<br>[-] | Weißgrad<br>[% ISO] | L*<br>[-] | a*<br>[-] | b*<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|-------------------|--------------------|-----------|-------------------------|------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| Referenz          | 0                  | 4,5       | 0,5                     | 8,3              | 38,9                | 80,35     | 4,43      | 21,57     | 46,1            |
| L                 | 1000               | 4,5       | 0,5                     | 8,3              | 37,4                | 79,02     | 4,88      | 21,00     | 46,0            |
| Referenz -E       | 0                  | 4,5       | 0,5                     | 7,9              | 39,8                | 81,24     | 4,32      | 21,91     | 46,2            |
| L-E               | 1000               | 4,5       | 0,5                     | 7,2              | 40,6                | 81,57     | 4,20      | 21,51     | 45,3            |
| Referenz-P        | 0                  | 4,5       | 0,5                     | 6,2              | 51,4                | 87,39     | 2,43      | 19,46     | 38,2            |
| L-P               | 1000               | 4,5       | 0,5                     | 5,5              | 55,1                | 88,92     | 1,84      | 18,36     | 35,4            |
| Referenz          | 0                  | 4,5       | 0,1                     | 8,0              | 39,3                | 80,67     | 4,37      | 21,58     | 45,9            |
| L                 | 1000               | 4,5       | 0,1                     | 8,0              | 37,4                | 79,16     | 4,76      | 21,28     | 46,4            |
| Referenz-E        | 0                  | 4,5       | 0,1                     | 7,8              | 40,7                | 81,72     | 4,21      | 21,72     | 45,5            |
| L-E               | 1000               | 4,5       | 0,1                     | 7,7              | 41,7                | 82,08     | 4,06      | 21,08     | 44,2            |
| Referenz-P        | 0                  | 4,5       | 0,1                     | 6,3              | 52,1                | 87,86     | 2,34      | 19,62     | 38,2            |
| L-P               | 1000               | 4,5       | 0,1                     | 6,1              | 54,3                | 88,78     | 2,01      | 18,98     | 36,6            |
| Referenz          | 0                  | 7         | 0,5                     | 8,3              | 40,0                | 81,05     | 4,10      | 21,32     | 45,0            |
| L                 | 1000               | 7         | 0,5                     | 8,0              | 39,4                | 80,22     | 4,44      | 20,66     | 44,6            |
| Referenz-E        | 0                  | 7         | 0,5                     | 7,6              | 40,1                | 81,45     | 4,20      | 21,94     | 46,0            |
| L-E               | 1000               | 7         | 0,5                     | 7,4              | 40,8                | 81,78     | 4,18      | 21,74     | 45,5            |
| Referenz-P        | 0                  | 7         | 0,5                     | 6,0              | 52,1                | 87,57     | 2,20      | 19,04     | 37,2            |
| L-P               | 1000               | 7         | 0,5                     | 5,5              | 55,6                | 89,11     | 1,77      | 18,24     | 35,1            |
| Referenz          | 0                  | 7         | 0,1                     | 8,2              | 39,0                | 80,67     | 4,41      | 21,99     | 46,6            |
| L                 | 1000               | 7         | 0,1                     | 7,8              | 38,0                | 79,54     | 4,62      | 21,23     | 46,0            |
| Referenz-E        | 0                  | 7         | 0,1                     | 7,9              | 40,1                | 81,44     | 4,22      | 21,98     | 46,1            |
| L-E               | 1000               | 7         | 0,1                     | 7,5              | 40,5                | 81,70     | 4,28      | 21,88     | 45,9            |
| Referenz-P        | 0                  | 7         | 0,1                     | 6,0              | 53,2                | 88,25     | 2,13      | 19,16     | 37,1            |
| L-P               | 1000               | 7         | 0,1                     | 5,9              | 55,5                | 89,17     | 1,75      | 18,36     | 35,2            |

**Anhang 26**

zu Kapitel 4.3.2.1 / Seiten 157-161

Weißgrade, L\*, a\*, b\*- und Gelbwerte eines ligninerhaltend gebleichten Holzschliffs nach LMS-Behandlung. Variiert werden in der Inkubationsphase die eingesetzten Laccase-Präparate, die pH-Werte und die Sauerstoffversorgung. LM = nach Inkubation mit Laccase und Mediator; LM-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; LM-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase und Mediator

| Behandlung<br>[-]                                 | Aktivität<br>[U/g] | HBT<br>[%] | pH<br>[-] | O <sub>2</sub><br>[MPa] | Weißgrad<br>[% ISO] | L*<br>[-] | a*<br>[-] | b*<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|---------------------------------------------------|--------------------|------------|-----------|-------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| bei Verwendung von <i>T. villosa</i> -Laccase     |                    |            |           |                         |                     |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 70,0                | 93,11     | -0,32     | 12,08     | 22,0            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 47,3                | 82,92     | 4,30      | 16,04     | 35,5            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 47,4                | 88,13     | -1,20     | 26,01     | 45,3            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 37,7                | 81,71     | 1,77      | 26,06     | 50,4            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 73,0                | 94,12     | -1,30     | 11,40     | 20,0            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 66,6                | 92,61     | -0,99     | 14,40     | 25,6            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 67,2                | 91,97     | 0,07      | 12,49     | 23,3            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7         | 0,5                     | 58,9                | 88,52     | 1,44      | 14,03     | 27,8            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 62,4                | 88,90     | 0,13      | 16,78     | 31,4            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7         | 0,5                     | 52,2                | 86,59     | 1,19      | 17,68     | 34,4            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 68,8                | 93,07     | -0,69     | 13,20     | 23,7            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 7         | 0,5                     | 67,2                | 92,84     | -0,58     | 14,21     | 25,6            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 68,5                | 92,54     | -0,38     | 12,44     | 22,7            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 58,2                | 87,77     | 1,65      | 13,38     | 27,0            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 57,1                | 88,86     | -0,01     | 16,77     | 31,3            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 51,4                | 86,12     | 1,17      | 17,66     | 34,5            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 71,1                | 93,51     | -1,34     | 11,99     | 21,0            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 66,0                | 92,11     | -1,24     | 14,05     | 24,9            |
| bei Verwendung von <i>M. thermophila</i> -Laccase |                    |            |           |                         |                     |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 70,0                | 93,11     | -0,32     | 12,08     | 22,0            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 50,0                | 84,36     | 3,35      | 15,75     | 33,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 47,4                | 88,13     | -1,20     | 26,01     | 45,3            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 40,0                | 83,27     | 1,25      | 26,02     | 49,2            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 73,0                | 94,12     | -1,30     | 11,40     | 20,0            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 70,2                | 93,70     | -1,23     | 13,14     | 23,0            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 67,2                | 91,97     | 0,07      | 12,49     | 23,3            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7         | 0,5                     | 56,6                | 87,51     | 1,94      | 14,52     | 29,3            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 62,4                | 88,90     | 0,13      | 16,78     | 31,4            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7         | 0,5                     | 52,2                | 86,57     | 1,51      | 17,53     | 34,5            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 68,8                | 93,07     | -0,69     | 13,20     | 23,7            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 7         | 0,5                     | 68,4                | 93,43     | -0,80     | 14,27     | 25,3            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 68,5                | 92,54     | -0,38     | 12,44     | 22,7            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 58,6                | 88,04     | 1,64      | 13,45     | 27,1            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 57,1                | 88,86     | -0,01     | 16,77     | 31,3            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 55,3                | 87,87     | 0,81      | 16,76     | 32,2            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 71,1                | 93,51     | -1,34     | 11,99     | 21,0            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 69,2                | 93,17     | -1,25     | 13,09     | 23,0            |
| bei Verwendung von <i>T. versicolor</i> -Laccase  |                    |            |           |                         |                     |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 70,0                | 93,11     | -0,32     | 12,08     | 22,0            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 4,5       | 0,5                     | 48,2                | 83,40     | 3,84      | 15,92     | 34,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 47,4                | 88,13     | -1,20     | 26,01     | 45,3            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 4,5       | 0,5                     | 38,7                | 82,38     | 1,44      | 26,09     | 49,9            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 73,0                | 94,12     | -1,30     | 11,40     | 20,0            |
| LM-P                                              | 15                 | 2          | 4,5       | 0,5                     | 67,5                | 92,88     | -1,09     | 14,15     | 25,0            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 67,2                | 91,97     | 0,07      | 12,49     | 23,3            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 7         | 0,5                     | 64,4                | 90,74     | 0,51      | 12,83     | 24,5            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 62,4                | 88,90     | 0,13      | 16,78     | 31,4            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 7         | 0,5                     | 54,7                | 87,85     | 0,52      | 17,40     | 33,1            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,5                     | 68,8                | 93,07     | -0,69     | 13,20     | 23,7            |
| LM-P                                              | 15                 | 2          | 7         | 0,5                     | 68,5                | 93,10     | -0,67     | 13,51     | 24,2            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 68,5                | 92,54     | -0,38     | 12,44     | 22,7            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 7         | 0,1                     | 65,4                | 90,94     | 0,32      | 12,29     | 23,4            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 57,1                | 88,86     | -0,01     | 16,77     | 31,3            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 7         | 0,1                     | 58,6                | 89,29     | 0,05      | 16,04     | 30,0            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 71,1                | 93,51     | -1,34     | 11,99     | 21,0            |
| LM-P                                              | 15                 | 2          | 7         | 0,1                     | 70,8                | 93,46     | -1,28     | 12,15     | 21,4            |

**Anhang 27**

zu Kapitel 4.3.2.2 / Seiten 162-165

Weißgrade, L\*, a\*, b\*- und Gelbwerte eines ligninerhaltend gebleichten TMP nach LMS-Behandlung. Variiert wurden in der Inkubationsphase die eingesetzten Laccase-Präparate, die pH-Werte und die Sauerstoffversorgung. LM = nach Inkubation mit Laccase und Mediator; LM-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; LM-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase

| Behandlung<br>[-]                                 | Aktivität<br>[U/g] | HBT<br>[%] | pH<br>[-] | O <sub>2</sub><br>[MPa] | Weißgrad<br>[% ISO] | L*<br>[-] | a*<br>[-] | b*<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|---------------------------------------------------|--------------------|------------|-----------|-------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| bei Verwendung von <i>T. villosa</i> -Laccase     |                    |            |           |                         |                     |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 65,7                | 92,31     | -0,14     | 14,64     | 26,7            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 48,8                | 83,72     | 3,50      | 15,94     | 34,3            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 56,2                | 89,11     | 0,18      | 18,22     | 33,8            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 47,2                | 84,44     | 1,78      | 19,31     | 38,4            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 70,9                | 94,35     | -1,26     | 13,75     | 23,9            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 60,8                | 91,67     | -0,61     | 18,28     | 32,5            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 65,1                | 92,13     | -0,12     | 14,89     | 27,2            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 55,2                | 86,88     | 1,69      | 14,89     | 30,0            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 54,6                | 89,07     | -0,18     | 19,87     | 36,2            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 50,8                | 86,77     | 1,05      | 19,53     | 37,3            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 65,3                | 92,69     | -1,06     | 15,83     | 27,9            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 63,1                | 91,96     | -0,82     | 16,61     | 29,5            |
| bei Verwendung von <i>M. thermophila</i> -Laccase |                    |            |           |                         |                     |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 65,7                | 92,31     | -0,14     | 14,64     | 26,7            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 44,5                | 81,74     | 4,04      | 17,34     | 37,9            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 56,2                | 89,11     | 0,18      | 18,22     | 33,8            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 44,5                | 82,99     | 2,38      | 19,78     | 40,2            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 70,9                | 94,35     | -1,26     | 13,75     | 23,9            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 4,5       | 0,5                     | 66,7                | 93,47     | -1,11     | 15,94     | 27,8            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 65,1                | 92,13     | -0,12     | 14,89     | 27,2            |
| LM                                                | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 54,7                | 86,80     | 1,79      | 15,18     | 30,6            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 54,6                | 89,07     | -0,18     | 19,87     | 36,2            |
| LM-E                                              | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 51,0                | 86,90     | 1,07      | 19,49     | 37,3            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 65,3                | 92,69     | -1,06     | 15,83     | 27,9            |
| LM-P                                              | 1000               | 1          | 7         | 0,1                     | 63,8                | 92,29     | -0,96     | 16,50     | 29,2            |
| bei Verwendung von <i>T. versicolor</i> -Laccase  |                    |            |           |                         |                     |           |           |           |                 |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 65,7                | 92,31     | -0,14     | 14,64     | 26,7            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 4,5       | 0,5                     | 40,2                | 79,31     | 5,11      | 18,16     | 41,3            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 56,2                | 89,11     | 0,18      | 18,22     | 33,8            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 4,5       | 0,5                     | 42,1                | 81,75     | 2,82      | 20,36     | 42,0            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 4,5       | 0,5                     | 70,9                | 94,35     | -1,26     | 13,75     | 23,9            |
| LM-P                                              | 15                 | 2          | 4,5       | 0,5                     | 65,5                | 93,12     | -1,03     | 16,46     | 28,9            |
| Referenz                                          | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 65,0                | 91,99     | -0,08     | 14,68     | 26,9            |
| LM                                                | 15                 | 2          | 7         | 0,1                     | 61,3                | 89,92     | 0,53      | 14,41     | 27,4            |
| Referenz-E                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 54,6                | 89,07     | -0,18     | 19,87     | 36,2            |
| LM-E                                              | 15                 | 2          | 7         | 0,1                     | 52,9                | 88,06     | 0,26      | 19,76     | 36,7            |
| Referenz-P                                        | 0                  | 0          | 7         | 0,1                     | 65,3                | 92,69     | -1,06     | 15,83     | 27,9            |
| LM-P                                              | 15                 | 2          | 7         | 0,1                     | 65,4                | 92,72     | -1,01     | 15,77     | 27,8            |

**Anhang 28**

zu Kapitel 4.3.2.3 / Seiten 166-168

*Ligninerhaltend gebleichter Holzschliff nach T. villosa-Laccase-Behandlung (L) im Bleichautoklaven bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck bzw. im offenen Temperiergefäß bei Luftatmosphäre bei pH-Werten von 4,5 und 7 sowie nach anschließender alkalischer Extraktion (E) bzw. Peroxidbleiche (P). L = nach Inkubation mit Laccase; L-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; L-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase*

| Behandlung<br>[-] | Aktivität<br>[U/g] | pH<br>[-] | O <sub>2</sub><br>[MPa] | Weißgrad<br>[% ISO] | L*<br>[-] | a*<br>[-] | b*<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|-------------------|--------------------|-----------|-------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| Referenz          | 0                  | 4,5       | 0,5                     | 67,1                | 92,11     | -0,13     | 12,85     | 23,7            |
| L                 | 1000               | 4,5       | 0,5                     | 60,1                | 88,77     | 1,86      | 13,20     | 26,7            |
| Referenz E        | 0                  | 4,5       | 0,5                     | 56,4                | 88,25     | 0,43      | 16,32     | 31,0            |
| L-E               | 1000               | 4,5       | 0,5                     | 52,4                | 86,31     | 1,27      | 16,98     | 33,4            |
| Referenz-P        | 0                  | 4,5       | 0,5                     | 70,3                | 93,34     | -1,58     | 12,43     | 21,6            |
| L-P               | 1000               | 4,5       | 0,5                     | 69,3                | 93,19     | -1,51     | 13,04     | 22,7            |
| Referenz          | 0                  | 4,5       | 0,1                     | 69,5                | 92,98     | -0,36     | 12,30     | 22,4            |
| L                 | 1000               | 4,5       | 0,1                     | 63,9                | 90,43     | 1,29      | 12,60     | 24,8            |
| Referenz-E        | 0                  | 4,5       | 0,1                     | 58,3                | 89,23     | -0,06     | 16,26     | 30,3            |
| L-E               | 1000               | 4,5       | 0,1                     | 56,4                | 88,26     | 0,46      | 16,39     | 31,2            |
| Referenz-P        | 0                  | 4,5       | 0,1                     | 70,2                | 93,24     | -1,27     | 12,31     | 21,7            |
| L-P               | 1000               | 4,5       | 0,1                     | 69,8                | 93,31     | -1,22     | 12,74     | 22,4            |
| Referenz          | 0                  | 7         | 0,5                     | 66,4                | 91,63     | 0,13      | 12,63     | 23,6            |
| L                 | 1000               | 7         | 0,5                     | 57,6                | 87,41     | 2,18      | 13,25     | 27,3            |
| Referenz-E        | 0                  | 7         | 0,5                     | 54,0                | 87,44     | 0,59      | 17,38     | 33,2            |
| L-E               | 1000               | 7         | 0,5                     | 50,6                | 85,52     | 1,75      | 17,41     | 34,8            |
| Referenz-P        | 0                  | 7         | 0,5                     | 67,2                | 92,30     | -1,31     | 13,36     | 23,6            |
| L-P               | 1000               | 7         | 0,5                     | 67,2                | 92,49     | -1,27     | 13,65     | 24,1            |
| Referenz          | 0                  | 7         | 0,1                     | 67,7                | 92,35     | -0,39     | 12,80     | 23,4            |
| L                 | 1000               | 7         | 0,1                     | 59,2                | 88,21     | 1,76      | 13,11     | 26,5            |
| Referenz-E        | 0                  | 7         | 0,1                     | 56,0                | 88,42     | 0,07      | 17,05     | 31,9            |
| L-E               | 1000               | 7         | 0,1                     | 53,2                | 86,95     | 0,85      | 17,26     | 33,3            |
| Referenz-P        | 0                  | 7         | 0,1                     | 70,1                | 93,36     | -1,37     | 12,61     | 22,1            |
| L-P               | 1000               | 7         | 0,1                     | 68,2                | 92,76     | -1,21     | 13,19     | 23,3            |

**Anhang 29**

zu Kapitel 4.3.2.4 / Seiten 169-171

*Ligninerhaltend gebleichter TMP nach T. villosa-Laccase-Behandlung (L) im Bleichautoklaven bei 0,5 MPa Sauerstoffdruck bzw. im offenen Temperiergefäß bei Luftatmosphäre bei pH-Werten von 4,5 und 7 sowie nach anschließender alkalischer Extraktion (E) bzw. Peroxidbleiche (P). L = nach Inkubation mit Laccase; L-E = nach Inkubation und alkalischer Extraktion; L-P = nach Inkubation und Peroxidbleiche. Referenz, Referenz-E und Referenz-P = Werte der entsprechenden Fahrweisen ohne Laccase*

| Behandlung<br>[-] | Aktivität<br>[U/g] | pH<br>[-] | O <sub>2</sub><br>[MPa] | Weißgrad<br>[% ISO] | L*<br>[-] | a*<br>[-] | b*<br>[-] | Gelbwert<br>[-] |
|-------------------|--------------------|-----------|-------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| Referenz          | 0                  | 4,5       | 0,5                     | 66,0                | 92,49     | -0,14     | 14,63     | 26,6            |
| L                 | 1000               | 4,5       | 0,5                     | 57,9                | 88,44     | 1,83      | 14,97     | 29,8            |
| Referenz -E       | 0                  | 4,5       | 0,5                     | 55,1                | 88,94     | 0,13      | 18,99     | 35,0            |
| L-E               | 1000               | 4,5       | 0,5                     | 51,3                | 86,73     | 1,17      | 19,00     | 36,6            |
| Referenz -P       | 0                  | 4,5       | 0,5                     | 67,9                | 93,64     | -1,25     | 15,24     | 26,6            |
| L-P               | 1000               | 4,5       | 0,5                     | 63,5                | 92,14     | -0,83     | 16,58     | 29,5            |
| Referenz          | 0                  | 4,5       | 0,1                     | 65,9                | 92,45     | -0,11     | 14,65     | 26,7            |
| L                 | 1000               | 4,5       | 0,1                     | 59,8                | 89,42     | 1,41      | 14,87     | 29,1            |
| Referenz -E       | 0                  | 4,5       | 0,1                     | 55,4                | 89,02     | 0,17      | 18,92     | 34,9            |
| L-E               | 1000               | 4,5       | 0,1                     | 52,5                | 87,31     | 0,95      | 18,72     | 35,8            |
| Referenz -P       | 0                  | 4,5       | 0,1                     | 68,1                | 93,70     | -1,18     | 15,11     | 26,4            |
| L-P               | 1000               | 4,5       | 0,1                     | 65,9                | 92,97     | -0,98     | 15,83     | 27,9            |
| Referenz          | 0                  | 7         | 0,5                     | 64,7                | 91,79     | 0,05      | 14,61     | 26,9            |
| L                 | 1000               | 7         | 0,5                     | 55,1                | 86,88     | 2,18      | 14,99     | 30,6            |
| Referenz -E       | 0                  | 7         | 0,5                     | 53,5                | 88,29     | 0,33      | 19,52     | 36,3            |
| L-E               | 1000               | 7         | 0,5                     | 48,5                | 85,40     | 1,81      | 19,62     | 38,6            |
| Referenz -P       | 0                  | 7         | 0,5                     | 59,8                | 90,62     | -0,37     | 17,32     | 31,4            |
| L-P               | 1000               | 7         | 0,5                     | 58,4                | 90,18     | -0,08     | 17,91     | 32,7            |
| Referenz          | 0                  | 7         | 0,1                     | 65,4                | 92,26     | -0,11     | 14,79     | 27,0            |
| L                 | 1000               | 7         | 0,1                     | 57,0                | 87,70     | 1,51      | 14,47     | 28,9            |
| Referenz -E       | 0                  | 7         | 0,1                     | 53,8                | 88,65     | 0,08      | 19,94     | 36,6            |
| L-E               | 1000               | 7         | 0,1                     | 49,8                | 86,33     | 1,28      | 19,86     | 38,2            |
| Referenz -P       | 0                  | 7         | 0,1                     | 61,7                | 91,34     | -0,78     | 16,79     | 30,0            |
| L-P               | 1000               | 7         | 0,1                     | 60,5                | 91,10     | -0,57     | 17,52     | 31,5            |



## **Publikation**

HAGER, A.; NELLESSEN, B.; PULS, J. (2002): Zur Anwendung von Laccasen beim Altpapier-Deinking. In: MURR, J.; GALLAND, G.; HANECKER, E. (Hrsg.): 10. PTS-CTP - Deinking-Symposium 2002. Vortragsband. München: PTS: 34-1 – 34-10.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Armin Hager  
geboren 1970 in Würzburg

### **Schulbildung**

Juni 90                      Abitur am Städtischen Mozart-Gymnasium Würzburg

### **Hochschulbildung**

Oktober 90 - Oktober 96    Studium der Forstwissenschaften an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
Abschluss als Diplom-Forstwirt  
November 96 - Mai 99      Studium der Holzwirtschaft an der Universität Hamburg  
Abschluss als Diplom-Holzwirt  
Juli 99 – Juli 03            Doktorand an der Universität Hamburg

### **Zusatzqualifikationen**

April 94 - April 95        Studium der Limnologie für Nebenfachbiologen an der Universität Konstanz  
Abschluss: Mündliche Prüfung

### **Berufliche Tätigkeiten**

Juli 99 - März 02            Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Holzchemie und chemischer Technologie des Holzes der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft Hamburg