

Annemarie Marold

**Oxidation immobilisierter Substrate  
mittels Laccasen und Myeloperoxidase**

DIPLOMARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades einer  
Diplom-Ingenieurin

der Studienrichtung Technische Chemie  
erreicht an der

Technischen Universität Graz

Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Georg Gübitz  
Institut für Umweltbiotechnologie

2009

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen / Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

(Unterschrift)

## **STATUTORY DECLARATION**

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources / resources, and that I have explicitly marked all material which has been quoted either literally or by content from the used sources.

Date

(Signature)

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Georg Gübitz bedanken, dass ich meine Diplomarbeit am Institut für Umweltbiotechnologie anfertigen durfte. Bei der Suche nach neuen Lösungswegen haben seine hilfreichen Anregungen und interessanten Ideen zum Entstehen dieser Arbeit in der vorliegenden Form maßgeblich beigetragen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Oma, die mir dieses Studium überhaupt erst ermöglicht haben! Ihr habt mich finanziell und moralisch stets unterstützt und immer an mich geglaubt. Auch an Regentagen habt ihr mir Rückhalt gegeben und ich konnte mich immer auf euch verlassen. Vielen Dank für alles – Ich hab euch lieb!

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Freund Stefan, mit dem ich im letzten Jahr viele schöne Momente erlebt habe. Danke für deine Unterstützung, deine aufbauenden (manchmal auch kritischen) Worte, die mich dazu gebracht haben, meine Diplomarbeit endlich zu Ende zu bringen! ☺

Für die freundliche Arbeitsatmosphäre im Büro  $v_{\max}$  möchte ich mich bei allen Arbeitskollegen bedanken. Insbesondere ergeht mein Dank an Alex und Konsti, die ich häufig mit fachspezifischen Fragen gelöchert habe und die stets bereit waren mir zu helfen. Bei Alex und Teresa möchte ich mich ebenfalls bedanken, dass sie immer ein offenes Ohr für all meine Probleme hatten! Ich hoffe, wir können auch in Zukunft noch oft einen leckeren Automaten-Kaffe trinken... ☺

Last but not least möchte ich mich auch bei meinem Ex-Freund Franz bedanken, der mich ein großes Stück meines Lebensweges begleitet, mich immer ermutigt und viele meiner Launen geduldig ertragen hat.

## **Kurzfassung**

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von an festen Trägermaterialien immobilisierbaren Substraten für Myeloperoxidasen und Laccasen für den Einsatz in diagnostischen Anwendungen. Dazu wurde im ersten Teil dieser Arbeit ein Screening von Substraten in Lösung durchgeführt, die mit den unterschiedlichen Enzymen einen deutlich sichtbaren Farbumschlag ergeben sollen. Hierfür wurden in Vorversuchen verschiedene Kopplungsreagenzien und Farbstoffe mit Laccasen und Horseradish Peroxidase getestet. Im Anschluss daran erfolgte auch die Umsetzung mittels Myeloperoxidase. Aus diesem Screening resultierte insbesondere Kristallviolett als universelles Substrat für beide Enzyme. Die sequentielle Oxidation einhergehend mit einem Abbau des Moleküls wurde durch Analyse der Reaktionsprodukte mittels LC-MS im Detail aufgeklärt. Im zweiten Teil der Untersuchungen wurden immobilisierte Substrate getestet, die über funktionalisierte Siloxane bzw. direkt kovalente Bindungen an geeignete Trägermaterialien gebunden wurden. Tatsächlich konnten die mittels Fast Blue und Sinapinsäure funktionalisierten Siloxane nach Aufbringung auf Trägermaterialien von Laccasen und Peroxidasen (HRP und MPO) umgesetzt werden.

## **Abstract**

The aim of this work was to develop substrates immobilized on solid support materials for laccases and myeloperoxidases for application in diagnostic systems. In a first step, a screening for colour changing enzymes substrates was carried out. Different coupling reagents and dyes were tested with laccases, horseradish peroxidase and myeloperoxidase. Crystal violet resulted as a universal substrate for all enzymes from this screening. Consequently, step-wise oxidation (with concomitant degradation) of this molecule was investigated in detail by using LC-MS and a reaction pathway was suggested. In the second part of this work some immobilized substrates were studied. First a siloxane linker was bound to each substrate and secondly the modified siloxane was covalently attached to solid carriers. Indeed, among others, siloxans functionalized with fast blue or sinapic acid after attachment to solid carriers were still susceptible to oxidation by laccases, horseradish peroxidase and myeloperoxidase.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund.....	1
1.1 Projektbeschreibung .....	1
1.2 Zielsetzung .....	2
1.3 Enzyme .....	3
1.3.1 Allgemein .....	3
1.3.2 Laccasen .....	4
1.3.3 Horseradish Peroxidase .....	5
1.3.4 Myeloperoxidase .....	5
1.4 Anwendungen.....	6
2. Methoden .....	8
2.1 Enzymaktivität.....	8
2.1.1 ABTS Assay.....	8
2.1.2 Aktivität der Laccase von <i>M. thermophila</i> in verschiedenen Lösungsmitteln.....	9
2.2 Kopplungsreaktionen.....	11
2.2.1 Verwendete Substrate.....	11
2.2.2 Optimierung der Menge von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bei der enzymatischen Kopplungsreaktion .....	11
2.2.3 Kopplungsreaktion mit 1,4-Phenylendiamin und Horseradish Peroxidase.....	12
2.2.4 Kopplungsreaktion mit 1,4-Phenylendiamin und Laccase von <i>T. versicolor</i> .....	13
2.2.5 Kopplungsreaktion mit Anilin und Laccase von <i>T. versicolor</i> .....	13
2.2.6 Herstellung von APTS-Silicagel .....	14
2.2.7 Immobilisierung von Ferulasäure und Kaffesäure auf APTS-Silicagel.....	14
2.2.8 Immobilisierung von 1,4-Phenylendiamin auf APTS-Silicagel.....	15
2.3 Reaktivfarbstoffe .....	16
2.3.1 Verwendete Substrate.....	16
2.3.2 Screening .....	16
2.3.2.1 Probenvorbereitung .....	16
2.3.2.2 Durchführung mit Laccase von <i>T. versicolor</i> .....	16
2.3.2.3 Durchführung mit Horseradish Peroxidase.....	17
2.3.2.4 Durchführung mit Myeloperoxidase.....	18
2.3.3 Messungen der Abbauprodukte von Kristallviolett und p-OH mit der HPLC-MS.....	19
2.3.4 Immobilisierung der Farbstoffe.....	21

2.3.4.1 Optimierung der Färbemethode .....	21
2.3.4.2 Färbeprozedur .....	22
2.3.5 Abbau der immobilisierten Farbstoffe mit Laccase von <i>T. hirsuta</i> .....	22
2.4 Modifizierte Siloxane .....	24
2.4.1 Modifizierte Siloxane I.....	24
2.4.1.1 Assay mit Laccase von <i>T. hirsuta</i> .....	25
2.4.1.2 Assay mit Horseradish Peroxidase.....	26
2.4.1.3 Weitere Tests .....	26
2.4.2 Modifizierte Siloxane II .....	28
2.4.2.1 Reaktionsansatz in UV-Küvetten.....	29
2.4.2.2 Reaktionsansatz in UV-Mikrotiterplatten .....	30
2.4.2.3 Immobilisierung auf Kieselgel-Platten .....	31
2.4.2.4 Abbau der immobilisierten Substrate mit Hilfe der Laccase von <i>T. hirsuta</i> , Laccase <i>M. thermophila</i> und Laccase von <i>T. villosa</i> .....	33
2.4.2.5 Abbau der immobilisierten Substrate mit Hilfe der Myeloperoxidase .....	33
2.4.3 Modifizierte Siloxane III.....	33
2.4.3.1 Reaktionsansatz in Mikrotiterplatten .....	35
2.4.3.2 Immobilisierung auf Kieselgel-Platten .....	36
2.4.3.3 Abbau der immobilisierten Substrate mit Hilfe der Laccase von <i>T. hirsuta</i> , Laccase <i>M. thermophila</i> und Laccase von <i>T. villosa</i> .....	36
2.4.3.4 Abbau der immobilisierten Substrate mit Hilfe der Myeloperoxidase .....	36
2.4.3.5 NMR Messungen .....	37
3. Ergebnisse.....	38
3.1 Enzymaktivität.....	38
3.1.1 ABTS Assay.....	38
3.1.2 Aktivität von MtL in verschiedenen Lösungsmitteln.....	38
3.2 Kopplungsreaktionen.....	40
3.2.1 Optimierung der Menge von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bei der enzymatischen Kopplungsreaktion .....	40
3.2.2 Kopplungsreaktion mit 1,4-Phenylendiamin und Horseradish Peroxidase.....	40
3.2.3 Kopplungsreaktion mit 1,4-Phenylendiamin und Laccase von <i>T. versicolor</i> .....	41
3.2.4 Kopplungsreaktion mit Anilin und Laccase von <i>T. versicolor</i> .....	41
3.2.5 Immobilisierung von Ferulasäure und Kaffesäure auf APTS-Silicagel.....	42
3.2.6 Immobilisierung von 1,4-Phenylendiamin auf APTS-Silicagel.....	43
3.3 Reaktivfarbstoffe .....	44

3.3.1 Ergebnisse des Screenings .....	44
3.3.1.1 Durchführung mit Laccase von <i>T. versicolor</i> .....	44
3.3.1.2 Durchführung mit Horseradish Peroxidase.....	46
3.3.1.3 Durchführung mit Myeloperoxidase.....	49
3.3.2 Messungen der Abbauprodukte von Kristallviolett mit der HPLC-MS.....	54
3.3.3 Immobilisierung der Farbstoffe.....	57
3.3.4 Abbau der immobilisierten Farbstoffe mit Laccase von <i>T. hirsuta</i> .....	58
3.4 Modifizierte Siloxane .....	60
3.4.1 Modifizierte Siloxane I.....	60
3.4.1.1 Assay mit Laccase von <i>T. hirsuta</i> .....	60
3.4.1.2 Assay mit Horseradish Peroxidase.....	61
3.4.1.3 Weitere Tests .....	61
3.4.2 Modifizierte Siloxane II .....	61
3.4.2.1 Reaktionsansatz in UV-Küvetten.....	62
3.4.2.2 Reaktionsansatz in UV-Mikrotiterplatten .....	62
3.4.2.3 Immobilisierung auf Kieselgel-Platten .....	63
3.4.2.3.1 Abbau der immobilisierten Substrate mit Hilfe der Enzyme ThL, MtL und TviL ..	64
3.4.2.3.2 Abbau des immobilisierten Substrats 9 mit Hilfe der Myeloperoxidase.....	66
3.4.3 Modifizierte Siloxane III.....	67
3.4.3.1 Reaktionsansatz in Mikrotiterplatten .....	67
3.4.3.2 Immobilisierung auf Kieselgel-Platten .....	69
3.4.3.2.1 Abbau der immobilisierten Substrate mit Hilfe der Enzyme ThL, MtL und TviL ..	69
3.4.3.2.2 Abbau des immobilisierten Substrats 11 mit Hilfe der Myeloperoxidase.....	69
3.4.4 Ergebnisse in Tabellenform .....	70
4. Diskussion.....	72
4.1 Zusammenfassung der Kopplungsreaktionen .....	72
4.2 Zusammenfassung des Farbstoff-Screenings .....	74
4.3 Zusammenfassung der Versuche mit Modifizierten Siloxanen .....	75
4.3.1 Modifizierte Siloxane I.....	75
4.3.2 Modifizierte Siloxane II .....	76
4.3.3 Modifizierte Siloxane III.....	77
5. Anhang.....	79
5.1 Abbildungsverzeichnis .....	87

5.2 Tabellenverzeichnis.....	88
6. Verwendete Materialien.....	90
6.1 Chemikalien.....	90



# 1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

## 1.1 Projektbeschreibung

Die Diplomarbeit entstand im Rahmen des Projektes „BioEngineering of Functional Macromolecules“ – kurz „MacroFun“ genannt – und in Zusammenarbeit mit der oberösterreichischen Forschungsgesellschaft „Profactor“.

Im MacroFun Projekt wird neben einer verstärkten Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen auch großer Wert auf umweltfreundliche und energieoptimierte Prozesse gelegt. Im Mittelpunkt stehen unter anderem die Funktionalisierung von Biomaterialien (im Hinblick auf deren Einsatz im medizinischen Bereich) und der Einsatz von Enzymen zur gezielten Modifikation von Biopolymeren unter möglichst schonenden und milden Bedingungen. Des Weiteren sollen auch die Wechselbeziehungen zwischen Enzymen mit makromolekularen Substraten erläutert und näher untersucht werden, wobei unter anderem natürlich vorkommende, mikrobielle und synthetische Materialien als Substrate zum Einsatz kommen.

In unserer Arbeitsgruppe ist das Augenmerk auf die Entwicklung „Bio Responsiver Polymere“ (BRP) gerichtet, welche wiederum aus den sogenannten „Carrier Operating-Matrix Barrier“-Systemen (COMB) aufgebaut sind. Das Kürzel COMB bezieht sich auf die drei funktionellen Schichten in diesem System, die genaue Darstellung findet sich in Abbildung 1. Das Sensorsystem soll die Eigenschaften besitzen auf bakterielle oder pilzliche Kontaminationen zu reagieren, um in weiterer Folge antibakterielle Substanzen freisetzen oder eine Farbreaktion hervorrufen zu können.

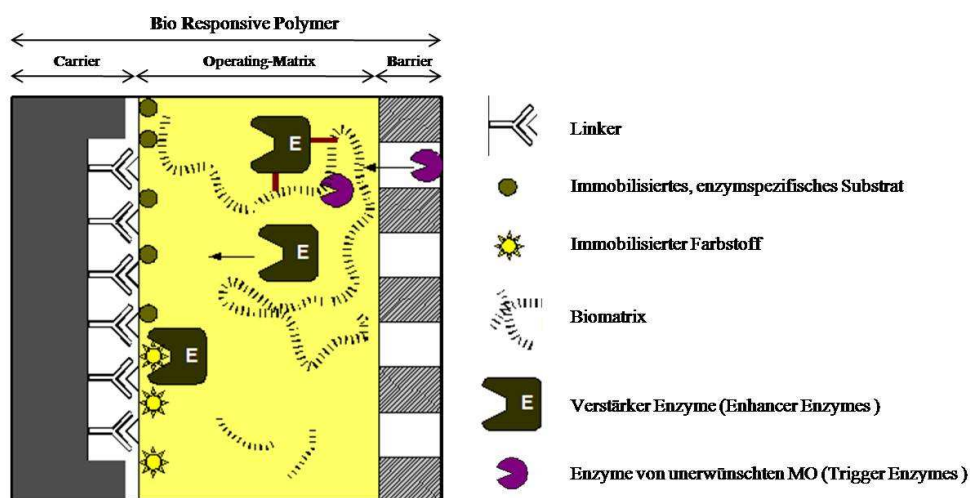


Abbildung 1: Aufbau des COMB Systems

Die „Carrier“-Schicht dient als Träger und sollte aus einem transparenten Material wie zum Beispiel Glas, Lignozellulose oder PET bestehen. Auf diesem Trägermaterial wird ein enzymespezifisches Substrat aufgebracht, das bei Reaktion mit dem Enzym einen deutlichen Farbumschlag erkennen lässt. Im Mittelteil des „COMB“-Systems befindet sich die „Operating Matrix“. Dieser Teil besteht aus Biopolymeren wie Gelatine, Pektin oder Carboxymethylzellulose (CMC), an welche die sogenannten „Enhancer Enzyme“ (Laccasen, Proteasen) gebunden sind. Die von einem kontaminierenden Bakterium oder Pilz freigesetzten Enzyme passieren die „Barrier“-Schicht, bauen die Biomatrix ab und setzen die daran gebundenen „Enhancer-Enzyme“ frei. Diese wiederum sind nicht in der Lage die „Barrier“-Schicht aufgrund des Vernetzungsgrades zu passieren und wandern in Richtung der „Carrier“-Schicht, wo eine enzymespezifische Reaktion mit dem Substrat zustande kommt und eine Farbreaktion sichtbar wird.

Für ein gut funktionierendes Sensorsystem müssen die einzelnen Komponenten einige wichtige Anforderungen erfüllen. So zum Beispiel ist die „Carrier“-Schicht für die Strukturgebung (Kapsel, Film) verantwortlich und spielt eine wichtige Rolle bei der Feuchtigkeitskontrolle. Weiters muss auch eine kovalente Bindung vom Trägermaterial zum Substrat über einen Linker vorhanden sein, damit der Farbstoff nicht ausgewaschen oder abgetragen werden kann. Der Farbstoff selbst muss wiederum geeignete funktionelle Gruppen (Hydroxy- oder Aminogruppen) für die Vernetzung mit dem Polymer über einen Linker aufweisen. Auch eine starke Leuchtkraft muss gegeben sein, damit die Farbreaktion detektiert werden kann. Für die „Operating Matrix“ sollte eine Kombination aus mehreren Biopolymeren möglich sein. Als Grundvoraussetzung muss natürlich auch der enzymatische Abbau der Biomatrix gegeben sein. Weiters sollten die Biopolymere Linkergruppen für die Bindung von beispielsweise „Enhancer Enzymen“ oder „Quenchern“ aufweisen (-OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -SH). Die „Barrier“-Schicht muss gegen äußere Einflüsse beständig sein. Die Diffusionskontrolle wird durch den Vernetzungsgrad bestimmt. So sollen kontaminierende Enzyme in das System gelangen, ohne dass die im System befindlichen Komponenten (zum Beispiel die freigesetzten „Enhancer Enzyme“) ausgespült werden können.

## **1.2 Zielsetzung**

Ziel dieser Diplomarbeit war es, ein Screening mit den verschiedensten Kopplungsreagenzien, Farbstoffen und modifizierten Siloxanen im flüssigen und immobilisierten Zustand durchzuführen, um neue und geeignete Substrate für die Umsetzung mit dem Enzym Myeloperoxidase zu finden.

Im ersten Teil meiner Arbeit wurde ein Screening mit 17 Kopplungsreagenzien und 44 Farbstoffen durchgeführt. Es galt herauszufinden, welche Substrate mit den verwendeten Enzymen eine gut sichtbare Farbreaktion ergeben. Dazu wurden zunächst vergleichende Untersuchungen in „flüssigem

Zustand“ mit Laccasen und Horseradish Peroxidase durchgeführt, um die Umsetzung optimieren zu können. Am Ende der Testreihen wurde der Umsatz der besten Substrate auch mit dem Enzym Myeloperoxidase getestet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden von der Firma „Profactor“ modifizierte Siloxane als Enzymsubstrate untersucht. Hierfür wurden die Substrate über funktionalisierte Siloxane bzw. direkte kovalente Bindungen an geeignete Trägermaterialien gebunden. Im Anschluss erfolgte die Umsetzung der immobilisierten Substrate zunächst mit Laccasen und in weiterer Folge mit dem Enzym Myeloperoxidase.

## **1.3 Enzyme**

### **1.3.1 Allgemein**

Enzyme sind Proteine, die biochemische Reaktionen katalysieren. Sie setzen die Aktivierungsenergie herab, damit die Reaktion leichter stattfinden kann. Das Substrat wird dabei direkt an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden und es entsteht ein Enzym-Substrat-Komplex. Die räumliche Struktur des aktiven Zentrums ist dafür verantwortlich, dass nur ein exakt passendes Substrat an das Enzym andocken kann. Schon ein kleiner Unterschied im Aufbau des Moleküls bzw. in der Ladungsverteilung kann bewirken, dass ein dem Substrat ähnlicher Stoff nicht mehr als solcher erkannt wird. Die Bindung zwischen dem Substrat und dem aktiven Zentrum des Enzyms ist daher hochspezifisch. Nach der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes durch nicht kovalente Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen), wandelt das Enzym die Ausgangsstoffe in die Reaktionsprodukte um. Anschließend wird das Produkt aus dem Komplex freigesetzt und das Enzym liegt wieder in der ursprünglichen Ausgangsform vor [1].

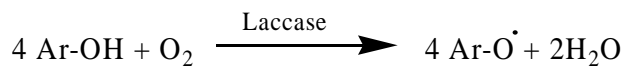
Allgemein werden Enzyme in sechs Klassen unterteilt, nämlich Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen. Manche Enzyme sind auch in der Lage, mehrere Reaktionen gleichzeitig zu katalysieren, diese werden dann mehreren Enzymklassen zugeordnet. Die Handhabung von Enzymen ist generell etwas schwierig, da zu hohe Temperaturen zur Denaturierung führen und zu niedrige Temperaturen den Reaktionsprozess verzögern bzw. verlangsamen. Auch eine Änderung des pH-Wertes hat großen Einfluss auf die Enzymaktivität, da der pH-Wert die Katalyse wichtiger Aminosäuren im Enzym beeinflussen kann [2].

Folgende Enzyme fanden in dieser Arbeit Anwendung und werden nachfolgend kurz beschrieben:

- Laccase von *Trametes versicolor* (TveL)
- Laccase von *Trametes hirsuta* (ThL)
- Laccase von *Myceliophthera thermophila* (MtL)
- Laccase von *Trametes villosa* (TviL)
- Horseradish Peroxidase (HRP)
- Myeloperoxidase (MPO)

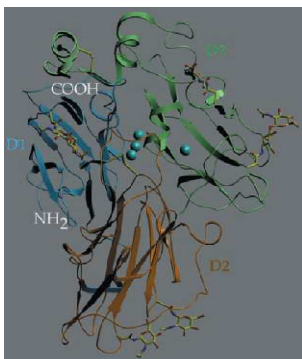
### 1.3.2 Laccasen

Laccasen sind kupferhaltige Oxidoreduktasen, die in vielen Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen vorkommen. Sie akzeptieren eine Vielzahl an aromatischen Alkoholen und Aminen als Substrate und sind von keinem Kofaktor abhängig. Einzig und alleine Sauerstoff (Luft) wird als Kosubstrat für ein einwandfreies Arbeiten benötigt [3, 4]. In Formel 1 ist die Reaktion eines aromatischen Alkohols mit Laccase dargestellt. Dabei wird das Phenol unter gleichzeitiger Reduktion von Sauerstoff oxidiert. Die Phenolgruppe wird zu einem Radikal oxidiert, der Sauerstoff zu Wasser reduziert.



**Formel 1: Reaktionsmechanismus der Laccase**

In Abbildung 2 ist die kristalline Struktur der Laccase von *Trametes versicolor* dargestellt. Es handelt sich dabei um ein Monomer, das in drei Bereiche unterteilt ist: D1 (blau), D2 (braun), D3 (grün). Die vier türkisen Kugeln im Zentrum stellen die vier Kupferatome dar, von denen eines dem Typ 1, eines dem Typ 2 und zwei dem Typ 3 entsprechen [5].

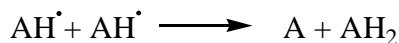
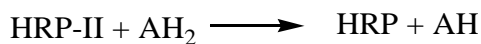
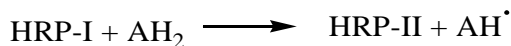
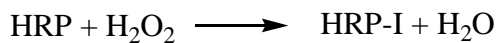


**Abbildung 2: Kristallstruktur der Laccase von *Trametes versicolor* [5]**

### 1.3.3 Horseradish Peroxidase

Das Enzym Horseradish Peroxidase wurde bei der Firma „Sigma Aldrich“ bestellt und aus den Wurzeln des Meerrettichs isoliert. Die HRP gehört zur Klasse der Oxidoreduktasen und besitzt laut Produktbeschreibung eine Masse von ~44 kDa. Der optimale pH-Bereich liegt zwischen 6,0 und 6,5. Die spezifische Aktivität beträgt  $1000 \text{ U mg}^{-1}$  (ABTS).

Die HRP ist ein Häm Protein, das eine Vielzahl an organischen und anorganischen Substanzen mit Hilfe von Wasserstoffperoxid oxidieren kann. Der genaue Reaktionsmechanismus ist in Formel 2 dargestellt, wobei HRP-I den Übergangszustand I, HRP-II den Übergangszustand II,  $\text{AH}_2$  den aromatischen Elektronendonator,  $\text{AH}^\cdot$  das freie Radikal und A das Oxidationsprodukt darstellt [6]. Die HRP besitzt 15 Peroxidase-Isoenzyme, von denen das Isoenzym C am häufigsten vertreten ist. Die Produktion der Peroxidase aus den Wurzeln des Meerrettichs erfolgt in großem Maßstab und wird für organische Synthesen, in Enzym Assays, in klinischen Tests, für Immuntests und bei der Aufbereitung von Abwässern eingesetzt [7].



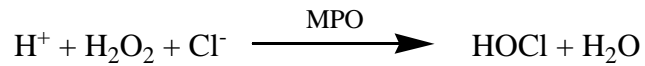
**Formel 2: Reaktionsmechanismus der HRP**

### 1.3.4 Myeloperoxidase

Das in dieser Arbeit verwendete Enzym Myeloperoxidase wurde von der Firma „Planta Natural Products“ aus menschlichen Leukozyten gewonnen und zählt zur Klasse der Oxidoreduktasen. Wie auf der Firmenhomepage beschrieben, handelt es sich hierbei um ein Protein mit ~145 kDa, das aus einem 5 mM Phosphate Puffer mit pH 7,4 lyophilisiert wurde. Der so erhaltene grüne Feststoff ist bei Tiefkühlung über mehrere Jahre haltbar. Die Aktivität kann mit den beiden Substraten Guaiacol bei einer Wellenlänge von 470 nm oder mit TMB (3,5,3',5'-Tetramethylbenzidin) bei einer Wellenlänge von 655 nm bestimmt werden.

Die menschliche Myeloperoxidase unterscheidet sich von der pflanzlichen, pilzlichen oder bakteriellen Peroxidase in der Primär-, Sekundär-, Tertiärstruktur und durch die kovalente Bindung der Häm Gruppe an die Proteinmatrix [8]. Die MPO ist ein Häm-Protein, das die Oxidation von

Halogeniden (insbesondere von Chloridionen) mit Hilfe von Wasserstoffperoxid katalysieren kann (Formel 3) [9, 10]. Die sich daraus bildenden Hypochloritionen können in weitere Folge verschiedene Biomoleküle oxidieren bzw. halogenieren und helfen so bei der Bekämpfung von unerwünschten Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) oder Tumorzellen. Auch in der Wundheilung spielt die Myeloperoxidase eine große Rolle.



**Formel 3: Reaktionsmechanismus der MPO**

## 1.4 Anwendungen

Biosensoren sollen die Eigenschaften besitzen, auf Umwelteinflüsse selbstständig reagieren zu können. Die Reaktionen werden dabei von unterschiedlichen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Feuchtigkeit oder kontaminierenden Organismen hervorgerufen. Der Anwendungsbereich ist breit gefächert und reicht von Verpackungsmaterialien bis hin zur medizinischen Versorgung. So wären Biosensoren in Krankenzimmern, Blutbeuteln, Reinräumen, Kühlschränken, Schwimmbädern oder in der Lebensmittelindustrie (zum Beispiel in Verpackungsmaterialien) durchaus sinnvoll.

Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe lassen sich anhand ihrer chemischen Strukturen in verschiedene Gruppen einteilen. Unter anderem wurden in dem Screening Anthrachinonfarbstoffe, Azofarbstoffe, Indigofarbstoffe, Nitrofarbstoffe und Triphenylmethanfarbstoffe verwendet, deren Anwendungsbereiche im Folgenden kurz beschrieben sind.

Triphenylmethanfarbstoffe werden hauptsächlich in der Textilindustrie zum Färben von Nylon, Wolle, Seide und Baumwolle verwendet. Beim Färben von Papier, Leder, Plastik, Benzin, Lack, Fett, Öl und Wachs finden diese Farbstoffe ebenfalls Anwendung. Auch in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie werden Triphenylmethanfarbstoffe eingesetzt [11, 12]. In der Medizin wird Kristallviolett beispielsweise als verdünnte Lösung auf die Haut oder auf das Zahnfleisch aufgetragen, um Pilzinfektionen vorzubeugen. Auch dem Hühnerfutter wird es beigemischt, um Pilzkrankungen zu vermeiden und zu kontrollieren [13].

Azofarbstoffe spielen beispielsweise beim dauerhaften Färben von Haaren eine Rolle. Das Entfärben gelingt nur durch drastische Maßnahmen und kann zu Haarausfall oder Gesundheitsproblemen führen. Aus diesem Grund wurden bereits Versuche unternommen solche Farbstoffe unter schonenden Bedingungen enzymatisch abzubauen [14].

Bei den in der Industrie verwendeten Farbstoffen handelt es sich meist um sehr abbauresistente Moleküle. Die Abwasserentsorgung gestaltet sich daher oft als sehr schwierig. Zwar gibt es eine Vielzahl an Methoden, um diese Abwässer zu reinigen bzw. aufzubereiten, meist handelt es sich jedoch um chemische Prozesse, die mit hohen Kosten verbunden sind, eine große Menge an Schlamm produzieren und daher nur eine limitierte Anwendungsmöglichkeit haben. Biologische Prozesse werden deshalb aufgrund der geringeren Kosten und der Umweltverträglichkeit immer wichtiger und sind die beste Alternative. Darüber hinaus können Mikroorganismen in großen Mengen produziert werden, sie haben meist schnelle Wachstumsraten und sind sehr anpassungsfähig [11, 15, 13].

Für den biologischen Abbau und in weiterer Folge auch die Entgiftung von umweltschädlichen Farbstoffen wurden bereits verschiedenste Untersuchungen durchgeführt. Unter anderem wurde das Reaktionsverhalten von den Triphenylmethanfarbstoffen Acid Violet 19, Basic Green 1, Pararosanilin, Methyl Green und Acid Green 16 mit Laccase von *Trametes versicolor* untersucht [12]. Bei den Textilfarbstoffen Reactive Black 5, Direct Blue 71 und Reactive Blue 19 wurden Tests mit der Laccase von *Trametes hirsuta* gemacht [16]. Das Reaktionsverhalten der Azofarbstoffe Tartrazine, Diamond Fast Brown, Indigo Carmine oder Diamond Black PV 200 wurde mit einer neuen Laccase von *Trametes hirsuta* untersucht [17] und es wurde auch der Versuch unternommen, sechs Azofarbstoffe mit Laccasen in Kombination mit Ultraschall zu behandeln [18].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich Peroxidasen für folgende Anwendungen als sehr wichtig herausgestellt haben [19]:

- Entfärbung von (synthetischen) Farbstoffen
- Organische Synthesen und Polymersynthesen
- Geruchsbekämpfung von Düngern
- Papier- und Zellstoffindustrie (Bleichen von Sulfatzellstoffen oder Ligninmodifikationen)
- Biosensoren
- Klinische Tests
- Immuntests

## 2. Methoden

### 2.1 Enzymaktivität

Für den zeitlichen Verlauf einer Reaktion spielt die Reaktionsgeschwindigkeit eine wesentliche Rolle, welche in direktem Zusammenhang mit der Enzymaktivität steht. Die Enzymaktivität gibt an, wie viel aktives Enzym in der Probe vorhanden ist und wird mit den Einheiten Unit (U) und Katal (kat) beschrieben.

Zumeist wird die Enzymaktivität in Units angegeben, wobei ein Unit definiert wird als diejenige Menge an Enzym, die unter gegebenen Bedingungen ein Mikromol Substrat pro Minute umsetzt ( $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol min}^{-1}$ ). Katal ist die SI-Einheit der Enzymaktivität und beschreibt die Umsetzung von  $1 \text{ mol sec}^{-1}$ .

In dieser Arbeit kamen sechs Enzyme zum Einsatz. Das Enzym Laccase von *T. versicolor* (TveL) wurde von der Firma „Fluka“ bezogen und hatte eine Aktivität von  $22,4 \text{ U mg}^{-1}$ . Das Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) wurde bei der Firma „Sigma Aldrich“ bestellt mit einer Aktivität von  $1000 \text{ U mg}^{-1}$  (ABTS). Für das Enzym Myeloperoxidase (MPO) wurde die Firma „Planta Natural Products“ kontaktiert, die das Enzym mit einer Aktivität von  $1000 \text{ U mg}^{-1}$  bereitstellte. Die Aktivitäten der drei genannten Enzyme waren also bereits bekannt und mussten daher nur noch für die Enzyme Laccase von *T. hirsuta* (ThL, von Marc Schroeder produziert und aufgereinigt) [20] Laccase von *M. thermophila* (MtL) und Laccase von *T. villosa* (TviL) bestimmt werden. Hierfür wurde ein ABTS Assay verwendet, der bereits 1988 von Niku-Paavola et al. beschrieben wurde [21].

#### 2.1.1 ABTS Assay

Für den Assay erfolgte die Herstellung einer 20 mM ABTS Lösung (in ddH<sub>2</sub>O). Weiters kam ein 25 mM Succinat Puffer (in ddH<sub>2</sub>O) zum Einsatz, der für alle verwendeten Enzyme mit 1 M NaOH auf den pH-Wert 4,5 eingestellt wurde. Die Verdünnung der Enzyme erfolgte mit ddH<sub>2</sub>O. Für die ThL wurde ein Verdünnungsfaktor von 100, für die MtL ein Faktor von 10000 und für die TviL ein Verdünnungsfaktor von 1000 verwendet.

Der Blank setzte sich aus 0,35 ml ABTS Lösung und 1,15 ml Succinat Puffer zusammen. Der Reaktionsansatz für die Proben setzte sich aus 0,35 ml ABTS Lösung und 1,15 ml Enzym Lösung zusammen. Zur besseren Übersicht ist das Pipettierschema in Tabelle 1 zusammengefasst. Die



Messung der Reaktion erfolgte mit dem Photospektrometer, wobei die Absorptionzunahme bei 436 nm für 2 min gemessen wurde.

**Tabelle 1: Pipettierschema zur Bestimmung der Enzymaktivitäten mittels ABTS Assay**

	Blank	Probe
ABTS Lösung [ml]	0,35	0,35
Puffer [ml]	1,15	-
Enzymlösung [ml]	-	1,15

Die Berechnung der Aktivitäten erfolgte unter Miteinbeziehung des Lambert Beer'schen Gesetzes nach Formel 4. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.1.1 zu finden.

**Formel 4: Berechnung der Enzymaktivitäten mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes**

$$A = k \cdot \frac{V_{\text{Gesamt}}}{V_{\text{Probe}} \cdot \epsilon \cdot d} \cdot f$$

$A$       Aktivität [ $U \text{ ml}^{-1}$ ]

$k$       Steigung [ $Abs \text{ min}^{-1}$ ]

$V_{\text{Gesamt}}$       Gesamtvolumen [1,5 ml]

$V_{\text{Probe}}$       Probenvolumen [1,15 ml]

$\epsilon$       Molarer Extinktionskoeffizient von ABTS [ $29,3 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]

$d$       Schichtdicke [1 cm]

$f$       Verdünnungsfaktor

## 2.1.2 Aktivität der Laccase von *M. thermophila* in verschiedenen Lösungsmitteln

Für spätere Versuche mit modifizierten Siloxanen (siehe Kapitel 2.4) war es notwendig die Aktivität der MtL in verschiedenen Lösungsmitteln mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen (in ddH<sub>2</sub>O) zu testen. Unter anderem wurden als Lösungsmittel dH<sub>2</sub>O, Acetonitril, DMSO und 75 %iger Ethanol verwendet. Als Substrate kamen ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) und DMP (2,6-Dimethoxyphenol) zum Einsatz, wobei kein Absorptionsspektrum aufgenommen wurde, sondern nur auf die optische Aktivität bzw. auf eine Farbänderung geachtet wurde. Der Versuch wurde in 96 Mikrotiterplatten durchgeführt. Das Pipettierschema ist Tabelle 2 zu entnehmen, das Ergebnis des optischen Tests ist in Kapitel 3.1.2 diskutiert.

**Tabelle 2: Pipettierschema für MtL in verschiedenen Lösungsmitteln**

Enzym Verdünnungsfaktor	Lösungsmittel [ $\mu$ l]	Substrat [ $\mu$ l]	Enzym [ $\mu$ l]
1:10	200	50	50
1:50	200	50	50
1:100	200	50	50
1:1000	200	50	50

## 2.2 Kopplungsreaktionen

Laut dem technischen Datenblatt 204 von Polysciences, bilden 1,4-Phenylendiamin und Brenzkatechin (Abbildung 3) bei Umsetzung mit Peroxidasen ein blau gefärbtes Kopplungsprodukt. Das so genannte Hanks-Yates Reagens bildete die Grundlage für die nachfolgenden Versuche der Kopplungsreaktionen. Basierend auf dieser Reaktion wurden nun statt Brenzkatechin andere Substanzen mit ähnlicher Struktur auf eine ebenso intensive Farbreaktion bzw. einen ähnlich schnellen Umsatz hin getestet.

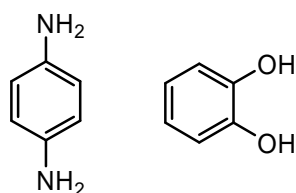


Abbildung 3: 1,4-Phenylendiamin (links) und Brenzkatechin (rechts)

### 2.2.1 Verwendete Substrate

Für die Kopplungsreaktionen wurden 17 Chemikalien ausgesucht, die als Substrate für die Umsetzung mit Peroxidasen und Laccasen in Frage kamen. Hierbei handelte es sich durchwegs um Aromaten mit Hydroxy- und Methoxygruppen in ortho-, metha- und para- Position. Die Namen der Chemikalien, sowie die dazugehörigen Molekülstrukturen sind im Anhang in Tabelle 48 angeführt, die drei mit \* gekennzeichneten Substrate 12, 14 und 16 wurden nicht getestet.

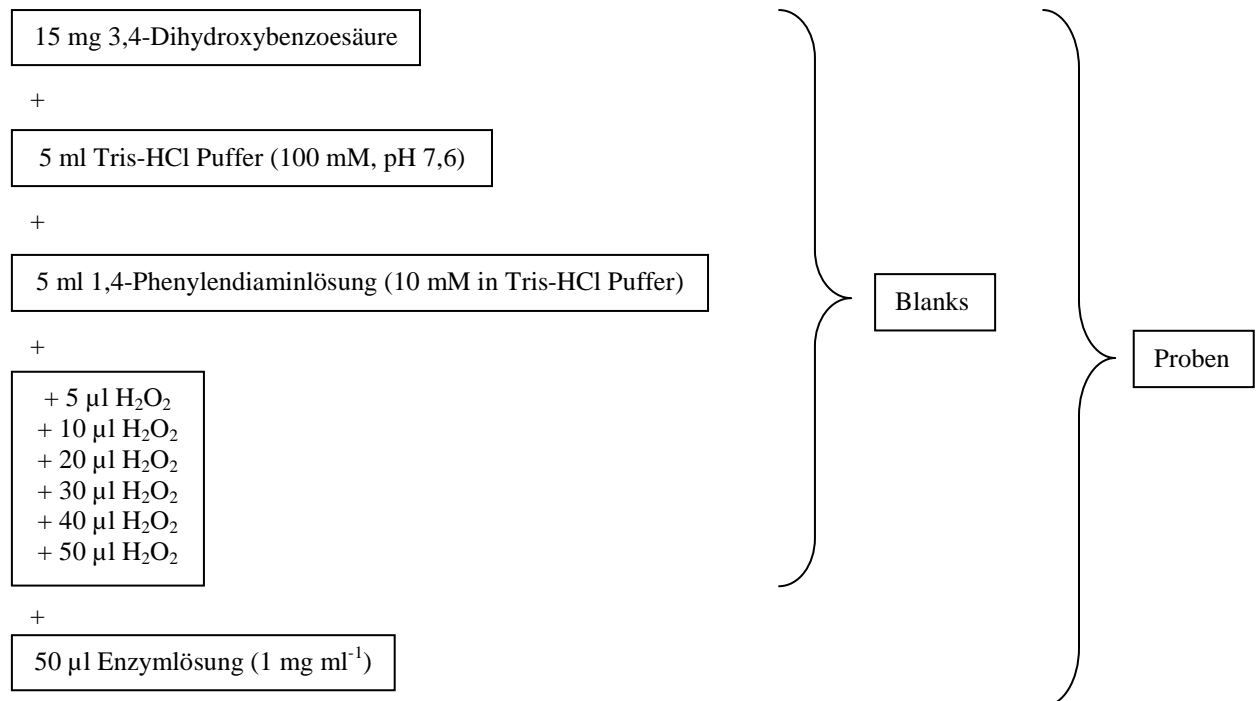
### 2.2.2 Optimierung der Menge von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei der enzymatischen Kopplungsreaktion

Für die Umsetzung der Substrate mit Hilfe des Enzyms HRP ist die Zugabe von Wasserstoffperoxid erforderlich. Substrat 8 (3,4-Dihydroxybenzoesäure) wurde ausgesucht, um herauszufinden, mit welcher Konzentration an Wasserstoffperoxid die Reaktion am besten funktioniert.

15 mg von Substrat 8 wurden dazu in 12 kleine Glasröhrchen eingewogen und in jeweils 5 ml 100 mM Tris-HCl Puffer pH 7,6 gelöst. Danach erfolgte die Herstellung einer 10 mM 1,4-Phenylendiaminlösung (in Tris-HCl Puffer), wovon weitere 5 ml in die Glasröhrchen gefüllt wurden. Von einer 1 %igen Wasserstoffperoxid Lösung (mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt) konnten nun verschiedene Mengen in die Glasröhrchen pipettiert werden, um die optimale Menge an Wasserstoffperoxid für die

Umsetzung herauszufinden. Zum Schluss wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  HRP mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  gestartet.

Für einen besseren Überblick ist die Durchführung in Abbildung 4 noch einmal als Fließschema dargestellt. Das Foto des optischen Tests inklusive zugehöriger Diskussion sind in Kapitel 3.2.1 zu finden.



**Abbildung 4: Fließschema zur Optimierung der Menge von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei der enzymatischen Kopplungsreaktion**

### 2.2.3 Kopplungsreaktion mit 1,4-Phenylendiamin und Horseradish Peroxidase

Für diesen Versuch wurde zunächst ein tausendstel der molaren Masse (10-20 mg) der Substrate 1-13 in kleine Glasröhrchen eingewogen und in 5 ml 100 mM Tris-HCl Puffer pH 7,6 gelöst. Danach erfolgte die Zugabe von 5 ml einer 10 mM 1,4-Phenylendiamin Lösung. Sowohl zu den Blanks, als auch zu den Proben wurden anschließend 10  $\mu\text{l}$  einer 1 %igen  $\text{H}_2\text{O}_2$  Lösung pipettiert. Der Reaktionsstart erfolgte durch die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  HRP mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  zu den Proben. Das Pipettierschema ist in Tabelle 3 dargestellt, die Fotos der Kopplungsreaktionen inklusive Diskussion sind in Kapitel 3.2.2 zu finden.

**Tabelle 3: Kopplungsreaktion mit 1,4-Phenylendiamin und HRP**

	Blank	Probe
Tris-HCl Puffer [ml]	5	5
1,4-Phenylendiamin Lösung [ml]	5	5
Wasserstoffperoxid [ $\mu$ l]	10	10
HRP [ $\mu$ l]	-	50

#### 2.2.4 Kopplungsreaktion mit 1,4-Phenylendiamin und Laccase von *T. versicolor*

Es wurde ein tausendstel der molaren Masse (10-20 mg) der Substrate 1-13 in kleine Glasröhrchen eingewogen und in 5 ml 100 mM Natriumacetat Puffer pH 4,5 (der pH-Wert wurde mit einer 100 mM Essigsäure Lösung eingestellt) gelöst. Für die Reaktion mit Laccase durfte kein Wasserstoffperoxid zugegeben werden, dafür wurde bei allen Substraten getestet, ob der Zusatz von HOBT (1-Hydroxybenzotriazol) als Mediator die Reaktion beschleunigt. Zu diesem Zweck wurden zusätzliche Proben mit 3 mg HOBT und Enzym angesetzt. Für den Reaktionsstart erfolgte die Zugabe von 50  $\mu$ l TveL mit einer Konzentration von 1 mg ml<sup>-1</sup>. Tabelle 4 gibt einen Überblick über das verwendete Pipettierschema. Die Fotos der Kopplungsreaktionen inklusive Diskussion finden sich in Kapitel 3.2.3.

**Tabelle 4: Kopplungsreaktion mit 1,4-Phenylendiamin und TveL**

	Blank	Probe ohne Mediator	Probe mit Mediator
NaAc Puffer [ml]	5	5	5
1,4-Phenylendiamin Lösung [ml]	5	5	5
HOBT [mg]	-	-	3
Laccase [ $\mu$ l]	-	50	50

#### 2.2.5 Kopplungsreaktion mit Anilin und Laccase von *T. versicolor*

Ein tausendstel der molaren Masse (10-20 mg) der Substrate 1-14 wurde in Glasröhrchen eingewogen und in 5 ml 100 mM Natriumacetat Puffer pH 4,5 (der pH-Wert wurde mit einer 100 mM Essigsäure Lösung eingestellt) gelöst. Danach erfolgte die Zugabe von 5 ml einer 10 mM Anilin Lösung (gelöst in NaAc Puffer). Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 50  $\mu$ l TveL mit einer Konzentration von 1 mg ml<sup>-1</sup> gestartet. Das Pipettierschema findet sich in Tabelle 5, Fotos der Kopplungsreaktion inklusive Diskussion sind Kapitel 3.2.4 zu entnehmen.

**Tabelle 5: Kopplungsreaktion mit Anilin und TveL**

	Blank	Probe
NaAc Puffer [ml]	5	5
Anilin Lösung [ml]	5	5
Laccase [ $\mu$ l]	-	50

### 2.2.6 Herstellung von APTS-Silicagel

Die Modifizierung von Silicagel mittels APTS wurde im Jahre 2003 von Le Berre et al. beschrieben [22]. Bei der durchgeführten Synthese wurden allerdings kürzere Reaktionszeiten und höhere Temperaturen verwendet.

Es wurden 6x 10 g Silicagel in 50 ml Sarstedt Röhren eingewogen und jeweils 30 ml einer 20 %igen Glutaraldehydlösung (in EtOH 75 %ig) zugegeben. Weiters wurden noch jeweils 200  $\mu$ l HCl zur Reaktion dazu pipettiert und für vier Stunden bei 40 °C geschüttelt. Danach folgten mehrere Waschschrte mit EtOH 75 %ig, bevor das abzentrifugierte Silicagel über Nacht im Exsikkator unter Vakuum getrocknet wurde. Die Lagerung des APTS-Silicagels erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anwendung fand das synthetisierte APTS-Silicagel bei der Immobilisierung von Ferulasäure, Kaffesäure und 1,4-Phenylendiamin in Kapitel 2.2.7 und 2.2.8.

### 2.2.7 Immobilisierung von Ferulasäure und Kaffesäure auf APTS-Silicagel

Die Immobilisierung auf APTS-Silicagel wurde in 50 ml Sarstedt Röhren vorgenommen. Hierfür wurden 1 Äquivalent (bezogen auf die Einwaage von APTS-Silicagel) EDAC, jeweils 1 Äquivalent von Ferulasäure und Kaffesäure und 0,1 Äquivalent HOBT in die Röhren eingewogen. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde jeweils 1 g des modifizierten Kieselgels hinzugefügt und für weitere 30 min gerührt. Nach beendeter Reaktion erfolgte das Abzentrifugieren, mehrmalige Waschen mit EtOH abs. und das Trocknen über Nacht im Exsikkator unter Vakuum. Die immobilisierten Substrate wurden am nächsten Tag nach der Harker-Yates Methode mit HRP und TveL nach der Vorschrift von Kapitel 2.2.3 bzw. 2.2.4 getestet. Ergebnisse und Diskussion sind dem Kapitel 3.2.5 zu entnehmen.

### **2.2.8 Immobilisierung von 1,4-Phenylendiamin auf APTS-Silicagel**

Nach erfolgreicher Immobilisierung von Ferulasäure und Kaffesäure auf APTS-Silicagel wurde nun versucht den umgekehrten Weg zu gehen und nicht die verschiedenen Substrate, sondern das 1,4-Phenylendiamin an das APTS-Silicagel zu koppeln. Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen:

Es wurden 2x 2 g vom getrockneten APTS-Silicagel in 50 ml Sarstedt Röhrchen eingewogen und je 10 ml 2,5 %ige Glutaraldehydlösung (in dH<sub>2</sub>O) hinzugefügt, woraufhin sich die Lösung leicht gelb färbte. Nach drei Stunden rühren bei Raumtemperatur hatte die Lösung eine altrosa Farbe und wurde mehrmals mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Als nächstes erfolgte die Herstellung einer 45 mM 1,4-Phenylendiamin Lösung (in dH<sub>2</sub>O), wovon je 10 ml in die Sarstedt Röhrchen pipettiert und über Nacht gerührt wurden. Die Lösungen konnten am Tag darauf mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und im Exsikkator über Nacht unter Vakuum getrocknet werden. Das immobilisierte 1,4-Phenylendiamin wurde am nächsten Tag nach der Hanger-Yates Methode von Kapitel 2.2.4 getestet, Ergebnisse sind in Kapitel 3.2.6 diskutiert.

## 2.3 Reaktivfarbstoffe

### 2.3.1 Verwendete Substrate

In einem groß angelegten Screening Experiment wurden 44 Farbstoffe (siehe Anhang) mit den Enzymen TveL, HRP und MPO auf ihre biologische Abbaubarkeit getestet. Ziel war es herauszufinden, welche Substrate nach Umsetzung mit den Enzymen eine deutlich sichtbare Farbänderung oder Entfärbung ergeben. Alle bekannten Strukturen hatten aromatische Ringe mit verschiedenen funktionellen Gruppen, die den Enzymen als Angriffspunkte dienen, wobei deren Position (d.h. ortho-, metha- oder para-) einen entscheidenden Einfluss auf den Umsatz bzw. auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat. Die Farbstoffe 26-44 (mit Ausnahme von Farbstoff 32), mit den systematisch substituierten Gruppen am Benzolring, wurden von A. Kandelbauer an der TU Graz synthetisiert [3]. Die photometrischen Messungen erfolgten mit dem Plate-Reader der Firma TECAN.

### 2.3.2 Screening

#### 2.3.2.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitungen gestalteten sich für alle Versuche gleich. Es wurden ~15 mg von den jeweiligen Farbstoffen in Sarstedt Röhrchen eingewogen und auf 15 ml mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Um ein gänzlich Lösen der Farbstoffe gewährleisten zu können, erfolgte eine 15minütige Behandlung der Sarstedt Röhrchen im Ultraschallbad. Die hergestellten Lösungen waren jedoch zu konzentriert, um ein auswertbares Absorptionsspektrum mit dem Plate-Reader zu erhalten. Daher wurde für jeden Farbstoff einzeln ausgetestet, welche Menge in jeweils 10 ml des verwendeten Puffer pipettiert werden muss, um eine Absorption von ~1 zu erhalten. Die Daten für die Einwaage der Farbstoffe, die zugegebene Menge Farbstofflösung in den Puffer und die Konzentrationen der einzelnen Farbstoffe im Reaktionsansatz sind dem Anhang zu entnehmen.

#### 2.3.2.2 Durchführung mit Laccase von *T. versicolor*

Für die Durchführung mit TveL wurden alle Stocklösungen und Verdünnungen mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt. Als Puffer wurde eine 100 mM Natriumacetat Lösung mit einer 100 mM Essigsäure Lösung im Verhältnis 1:2 gemischt, sodass sich ein pH-Wert von 4,5 ergab. Als Enzym kam die Laccase von *T.*



*versicolor* zum Einsatz. Diese hatte eine Aktivität von  $1000 \text{ U mg}^{-1}$  (ABTS) und wurde in einer Konzentration von  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  eingesetzt.

Zunächst wurden sowohl für die Blanks, als auch für die Proben 10 ml Pufferlösung in kleine Glasfläschchen pipettiert. Danach konnten die im Anhang in Tabelle 50 angeführten Mengen an Farbstofflösung hinzu gegeben werden. Als Blank dienten die hergestellten Farblösungen in 10 ml Puffer. Für die Proben wurden noch jeweils  $200 \mu\text{l}$  von der Laccase zugegeben. Danach erfolgten sofort die Messungen mit dem Plate-Reader. Hierfür wurden sowohl von den Blanks als auch von den Proben  $300 \mu\text{l}$  in eine 96 Mikrotiterplatte pipettiert und bei einem Wellenlängenscan von 300-800 nm vermessen. Die Glasfläschchen mit den Farbreaktionen sind in Abbildung 12 dargestellt. Die Absorptionsspektren wurden bis zwei Tage nach Zugabe des Enzyms aufgenommen und sind in den Abbildungen 13 – 16 ersichtlich.

### 2.3.2.3 Durchführung mit Horseradish Peroxidase

Für die Durchführung mit HRP wurden alle Stocklösungen und Verdünnungen mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  hergestellt. Als Puffer wurde ein Phosphat Puffer mit pH 6,3 verwendet. Hierzu wurden eine 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat Lösung und eine 20 mM Dinatriumhydrogenphosphat Lösung im Verhältnis 2,3:1 gemischt. Als Enzym kam die Horseradish Peroxidase zum Einsatz. Diese hatte eine Aktivität von  $1000 \text{ U mg}^{-1}$  (ABTS) und wurde in einer Konzentration von  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  verwendet. Vom Wasserstoffperoxid wurden  $10 \mu\text{l}$  einer 1 %igen Lösung zugegeben.

10 ml Pufferlösung wurden sowohl für die Blanks, als auch für die Proben in kleine Glasfläschchen pipettiert. Danach konnten die im Anhang in Tabelle 51 angeführten Mengen an Farbstofflösung hinzu gegeben werden.

Bei der Oxidation von HRP ist im Gegensatz zur Laccase noch die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  notwendig. Um sicher zu gehen, dass bei den Blanks durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid kein Abbau stattfindet, wurden für die Farbstoffe 1-14 ein Blank ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  und ein Blank mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  hergestellt. Bei den Blanks mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und bei den Proben wurden daher noch  $10 \mu\text{l}$  einer 1%igen Wasserstoffperoxid Lösung dazu pipettiert.

Für den Reaktionsstart war noch die Zugabe von  $200 \mu\text{l}$  des Enzyms HRP zu den Proben erforderlich, danach erfolgten sofort die Messungen mit dem Plate-Reader. Hierfür wurden sowohl von den Blanks, als auch von den Proben  $300 \mu\text{l}$  in eine 96 Mikrotiterplatte pipettiert und bei einem Wellenlängenscan von 300-800 nm vermessen. Die Farbreaktionen sind in Abbildung 17 dargestellt. Die Absorptionsspektren wurden bis zwei Tage nach Zugabe des Enzyms aufgenommen und sind in den Abbildungen 18 – 21 ersichtlich.

### 2.3.2.4 Durchführung mit Myeloperoxidase

Aufgrund der Tatsache, dass das Enzym MPO teuer ist und nur in begrenzten Mengen zur Verfügung stand, wurde das Gesamtvolumen von 10 ml auf 300  $\mu$ l reduziert und die Reaktion fand in 96 Mikrotiterplatten statt. Weiters gab es vor dem eigentlichen Screening noch einige Vorversuche, um sicherzustellen, dass die Farbreaktionen gut funktionieren würden.

#### Vorversuche

Bei den Vorbereitungen für die Vorversuche wurden alle Stocklösungen und Verdünnungen mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt und die Probenvorbereitungen verliefen wie in Kapitel 2.3.2.1 beschrieben. Als Puffer kamen ein 100 mM Kaliumphosphat Puffer und ein 100 mM Natriumacetat Puffer zum Einsatz. Die verwendeten Enzyme, ihre eingesetzten Aktivitäten und die zugegebenen Mengen Wasserstoffperoxid sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Diskussion zu den Vorversuchen findet sich in Kapitel 3.3.1.3.

**Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für Vorversuche**

Versuch	Farbstoffe	Puffer	Enzym	Aktivität	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
1	1, 2, 3, 5, 6, 7	Phosphat, pH 7,0	10 $\mu$ l MPO	10 U ml <sup>-1</sup>	0,8 $\mu$ l 30 %ig
2	5, 14, 22, 29, 31	Phosphat, pH 7,0	10 $\mu$ l MPO	10 U ml <sup>-1</sup>	0,8 $\mu$ l 30 %ig
3	5, 14, 22, 29, 31	Phosphat, pH 7,0	10 $\mu$ l HRP	10 U ml <sup>-1</sup>	0,8 $\mu$ l 30 %ig
4	5, 14, 22, 29, 31	NaAc, pH 4,3	10 $\mu$ l Laccase	22 U ml <sup>-1</sup>	-
5	5, 14, 22, 29, 31	Phosphat, pH 6,4	10 $\mu$ l HRP	15 U ml <sup>-1</sup>	8 $\mu$ l 3 %ig
	5, 14, 22, 29, 31	Phosphat, pH 6,4	20 $\mu$ l HRP	15 U ml <sup>-1</sup>	8 $\mu$ l 3 %ig
	5, 14, 22, 29, 31	Phosphat, pH 6,4	30 $\mu$ l HRP	15 U ml <sup>-1</sup>	8 $\mu$ l 3 %ig
	5, 14, 22, 29, 31	Phosphat, pH 6,4	40 $\mu$ l HRP	15 U ml <sup>-1</sup>	8 $\mu$ l 3 %ig
	5, 14, 22, 29, 31	Phosphat, pH 6,4	60 $\mu$ l HRP	15 U ml <sup>-1</sup>	8 $\mu$ l 3 %ig
	5, 14, 22, 29, 31	Phosphat, pH 6,4	100 $\mu$ l HRP	15 U ml <sup>-1</sup>	8 $\mu$ l 3 %ig
6	5, 14, 22, 29, 31	Phosphat, pH 7,0	50 $\mu$ l MPO	150 U ml <sup>-1</sup>	8 $\mu$ l 3 %ig
7	5, 14, 22, 29, 31	Phosphat, pH 7,0	100 $\mu$ l MPO	150 U ml <sup>-1</sup>	8 $\mu$ l 3 %ig
8	1, 2, 3, 5, 6, 7	Phosphat, pH 7,0	100 $\mu$ l MPO	150 U ml <sup>-1</sup>	8 $\mu$ l 3 %ig
9	1, 2	Phosphat, pH 7,0	100 $\mu$ l MPO	150 U ml <sup>-1</sup>	1,98 $\mu$ l 1 %ig

#### Hauptversuche

Nachdem ausgetestet wurde mit welcher Aktivität und in welcher Konzentration das Enzym MPO am Besten funktioniert, kam es zu den eigentlichen Hauptversuchen. Hierbei wurden alle Stocklösungen und Verdünnungen mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt. Als Puffer kam ein Kaliumphosphat Puffer mit pH 7,0 zum

Einsatz. Vom Enzym MPO wurden 100  $\mu\text{l}$  mit einer Aktivität von 150  $\text{U ml}^{-1}$  verwendet. Vom Wasserstoffperoxid wurden 2  $\mu\text{l}$  einer 1 %igen Lösung zugegeben.

Die Probenvorbereitungen verliefen wie in Kapitel 2.3.2.1 beschrieben. Es wurden 10 ml der Farbstofflösungen mit den in Tabelle 52 angeführten Mengen hergestellt. Anschließend wurden aus diesen Lösungen jeweils 2x 200  $\mu\text{l}$  (für Blank und Probe) in 96 Mikrotiterplatten überführt. Für das Gesamtvolumen von 300  $\mu\text{l}$  wurden bei den Blanks noch jeweils 100  $\mu\text{l}$  Puffer zugegeben, bei den Proben wurden 100  $\mu\text{l}$  MPO hinzu pipettiert.

Gleich im Anschluss erfolgten die Messungen mit dem Plate-Reader bei einem Wellenlängenscan von 300-800 nm. Die Farbreaktionen in den Mikrotiterplatten sind in Abbildung 28 dargestellt. Die Absorptionsspektren wurden bis zwei Tage nach Zugabe des Enzyms aufgenommen und sind in Abbildung 29 ersichtlich.

### **2.3.3 Messungen der Abbauprodukte von Kristallviolett und p-OH mit der HPLC-MS**

Nachdem die Umsetzungen der Farbstoffe 1 und 31 (Kristallviolett und p-OH) mit dem Enzym MPO sehr gut funktioniert haben, wurde der Abbau der beiden Substrate mit Hilfe der HPLC-MS (HPLC gekoppelt mit dem Massenspektrometer) gemessen. Für die Untersuchung der Farbstoffe finden sich nachfolgend die genauen Parameter und Einstellungen für die Messungen.

Die HPLC (High Pressure Liquid Chromatographie) ist ein Flüssigchromatographie Verfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz zusammen mit dem Laufmittel (mobile Phase) durch eine Trennsäule (stationäre Phase) gepumpt wird. Dabei wechselwirkt das zu untersuchende Substrat mit der stationären Phase. Ist die Wechselwirkung stark, verbleibt die Substanz lange in der Säule. Ist die Wechselwirkung schwach, verlässt die Substanz die Säule bald wieder. Je nach Stärke dieser Wechselwirkungen kommt es zu unterschiedlichen Retentionszeiten am Ende der Trennsäule, wo sie anschließend in einem Detektor nachgewiesen werden können.

Für die Messung mit dem Massenspektrometer werden die zu untersuchenden Substanzen durch Erhitzen in die Gasphase überführt und in ein elektrisches Feld eingebracht. Durch die Beschleunigung in diesem elektrischen Feld können die ionisierten Teilchen in ihr Masse/Ladungsverhältnis getrennt werden, was am Detektor registriert, aufgenommen und in ein Diagramm umgewandelt wird.

Kristallviolett

Für die HPLC wurde als Laufmittel ein Gemisch aus 80 % Acetonitril, 8 % Ameisensäure und 12 % ddH<sub>2</sub>O verwendet. Die Flussrate betrug 0,8 ml min<sup>-1</sup> bei einer Laufzeit von 30 min. Anschließend erfolgte eine gekoppelte Messung mit dem Massenspektrometer, wobei die Elektrospray Ionisation angewandt wurde. Folgende Einstellungen waren dabei noch zu berücksichtigen: Trocknungstemperatur 350 °C, Kapillarspannung 3500 V, Zerstäuber 50 psi, Trocknungsgas 10 l min<sup>-1</sup>, Scan von 100-1000 m/z.

p-OH

Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus 50 % Acetonitril, 10 % Ameisensäure und 40 % ddH<sub>2</sub>O eingesetzt. Die Flussrate betrug 0,3 ml min<sup>-1</sup> bei einer Laufzeit von 60 min. Es erfolgte eine anschließende Messung mit dem gekoppelten Massenspektrometer, wobei die Elektrospray Ionisation zum Einsatz kam. Folgende Einstellungen waren dabei noch zu berücksichtigen: Trocknungstemperatur 350 °C, Kapillarspannung 3500 V, Zerstäuber 50 psi, Trocknungsgas 10 l min<sup>-1</sup>, Scan von 100-2200 m/z.

Die Probenvorbereitungen erfolgten wie in Kapitel 2.3.2.1 beschrieben. Von den Farbstofflösungen wurden 70 µl von Kristallviolett und 1,1 ml von p-OH in 10 ml eines 50 mM Ammoniumacetat Puffers pH 6,8 pipettiert, um eine Absorption von ~1 zu erlangen. Diese Lösungen wurden als Stocklösungen für die weitere Vorgehensweise verwendet.

Aus den Stocklösungen wurden sowohl für Kristallviolett als auch für p-OH 3x 133 µl in eine 96 Mikrotiterplatte pipettiert. Zu Blank 1 wurden noch 67 µl Ammoniumacetat Puffer hinzugefügt, bei Blank 2 wurden 67 µl Ammoniumacetat Puffer und 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 %ig) zugegeben. Bei der Probe war noch die Zugabe von 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 %ig) und für den Reaktionsstart die Zugabe von 67 µl MPO mit einer Aktivität von 150 U ml<sup>-1</sup> erforderlich. Zur besseren Übersicht ist das Pipettierschema in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7: Pipettierschema zur Messung der Abbauprodukte von Kristallviolett und p-OH**

	Farbstofflösung [µl]	Puffer [µl]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [µl]	MPO [µl]
Blank 1	133	67	-	-
Blank 2	133	67	1,98	-
Probe	133	-	1,98	67

Die erste Messung der Abbaureaktion erfolgte sofort nach Zugabe des Enzyms MPO. Es wurde ein Wellenlängenscan von 300-800 nm mit dem Plate-Reader durchgeführt. Die Lösungen wurden nach der Messung in 2 ml Reaktionsgefäße pipettiert und die Reaktion wurde durch Tiefkühlung bei -72 °C

gestoppt. Die Mikrotiterplatte mit den restlichen Reaktionsansätzen wurde anschließend zum Inkubieren in den Brutraum bei 37 °C und einer relativen Luftfeuchte von 60 % gelegt. Eine weitere Messung erfolgte nach 1 Stunde, wobei die Reaktionslösungen nach der Messung wieder in 2 ml Reaktionsgefäße pipettiert wurden und das Stoppen der Reaktion durch Tiefkühlung bei -72 °C erfolgte. Die Mikrotiterplatte mit den restlichen Proben wurde wiederum in den Brutraum gelegt. Nach 6 und 24 Stunden erfolgten nochmalige Messungen, wobei die Farbstofflösungen nach dem Messen jeweils wieder in 2 ml Reaktionsgefäße pipettiert und zum Stoppen der Reaktion in den Tiefkühler gelegt wurden. Ergebnisse sind Kapitel 3.3.2 zu entnehmen.

### 2.3.4 Immobilisierung der Farbstoffe

Für die Immobilisierung wurden zwei der 44 Farbstoffe ausgewählt, die beim Screening bei allen drei Enzymen (TveL, HRP und MPO) einen gut sichtbaren Farbumschlag ergeben haben. Dies war sowohl bei Reactive Blue 221, als auch bei Kristallviolett der Fall. Es wurde versucht, die beiden Farbstoffe auf ein geeignetes Trägermaterial aufzubringen. Folgende Materialien kamen dabei in Frage:

- Druckpapier
- Whatman Filterpapier
- Overheadfolie

#### 2.3.4.1 Optimierung der Färbemethode

Um eine Optimierung der Färbemethode zu finden, erfolgte die Durchführung zunächst bei unterschiedlichen Bedingungen. Es wurden die Parameter Farbstoffkonzentration, Färbedauer und Waschen variiert.

Das Färben wurde bei Reactive Blue mit 0,049 mM, 0,099 mM und 0,164 mM Farbstofflösungen erprobt, was einer Konzentration von 15 mg, 30 mg und 50 mg Farbstoff in 300 ml dH<sub>2</sub>O entspricht. Bei Kristallviolett wurden 0,123 mM, 0,234 mM und 0,409 mM Farbstofflösungen hergestellt, was ebenfalls einer Konzentration von 15 mg, 30 mg und 50 mg Farbstoff in 300 ml dH<sub>2</sub>O entspricht. Die Färbedauer wurde mit 10 min., 30 min. und 60 min. erprobt und es wurde getestet, ob das Waschen der gefärbten Proben mit Wasser bei Raumtemperatur oder bei erhöhter Temperatur besser funktioniert. In Tabelle 8 sind alle Variationen zusammengefasst.

**Tabelle 8: Optimierung der Färbemethode**

c [mg l <sup>-1</sup> ]	Färbedauer [min]	Waschen
50	10	Raumtemperatur
50	10	60 °C
50	30	Raumtemperatur
50	30	60 °C
50	60	Raumtemperatur
50	60	60 °C
100	10	Raumtemperatur
100	10	60 °C
100	30	Raumtemperatur
100	30	60 °C
100	60	Raumtemperatur
100	60	60 °C
167	10	Raumtemperatur
167	10	60 °C
167	30	Raumtemperatur
167	30	60 °C
167	60	Raumtemperatur
167	60	60 °C

#### 2.3.4.2 Färbeprozedur

Das Färben der Proben bzw. die Immobilisierung erfolgte leicht abgeändert nach einer Vorschrift der Firma DyStar und Tina Brückner [23]. Für das Färben wurden 7,5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in ein Becherglas eingewogen und in 300 ml dH<sub>2</sub>O gelöst. Danach erfolgte die Zugabe von 15 mg / 30 mg / 50 mg des jeweiligen Farbstoffes und die Lösung wurde langsam auf 60 – 65 °C erhitzt. Gleich nach dem Start des Heizvorganges wurde das zu färbende Material (Druckerpapier, Whatman Filter, Overheadfolie) in die Farbstofflösung getaucht und erhitzt. Die Reaktion wurde nach der anberaumten Zeit abgebrochen und die Proben wurden für 30 min. in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach konnten die gefärbten Materialien über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und am nächsten Tag zum Entfärben in die Enzymlösung getaucht werden.

#### 2.3.5 Abbau der immobilisierten Farbstoffe mit Laccase von *T. hirsuta*

Der enzymatische Abbau der immobilisierten Farbstoffe mit ThL erfolgte in einem 100 mM Natriumacetat Puffer, mit einem pH-Wert von 4,3. Hierfür wurden sowohl für die Blanks als auch für die Proben 30 ml des Puffers in Petrischalen pipettiert, bei den Proben erfolgte noch die Zugabe von

100  $\mu$ l Laccase. Das gefärbte Papier konnte nun für 24 Stunden in die Enzymlösung eingetaucht werden. Am nächsten Tag wurden alle Proben 30 min lang in 500 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die Farbdifferenz wurde schließlich mit dem Farbmessgerät gemessen. Die Auswertung inklusive Diskussion ist Kapitel 3.3.4 zu entnehmen.

## 2.4 Modifizierte Siloxane

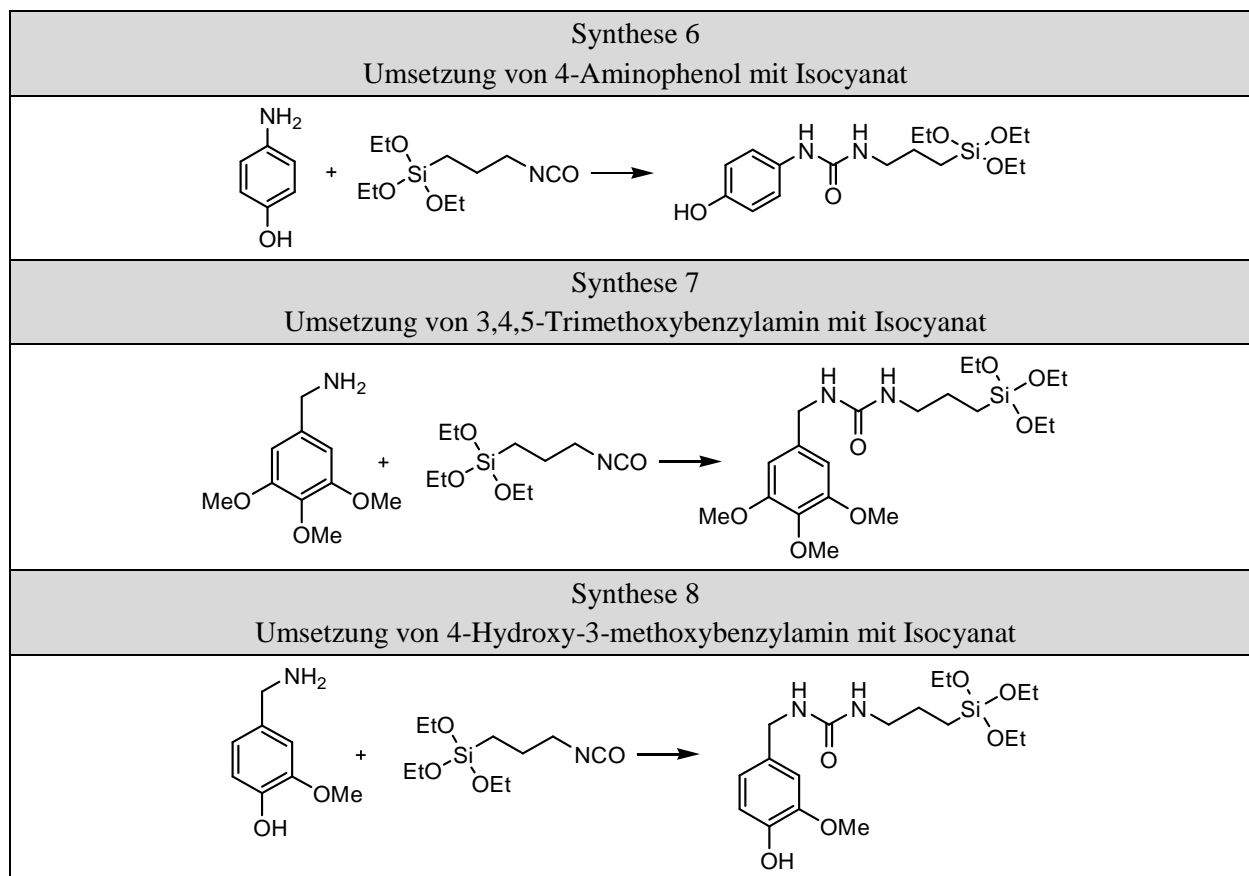
### 2.4.1 Modifizierte Siloxane I

Acht potentielle Laccasesubstrate (Tabelle 9) wurden von der Firma Profactor mit Hilfe von Isocyanat Silica Derivaten synthetisiert und uns zu Testzwecken zur Verfügung gestellt. Die Substrate wurden hinsichtlich ihrer Umsetzbarkeit mit Laccase und Horseradish Peroxidase getestet.

**Tabelle 9: Synthese der modifizierten Siloxane I**

<b>Synthese 1</b> Umsetzung von 4-Hydroxybenzylamin mit Isocyanat	
<b>Synthese 2</b> Umsetzung von 5-Amino-2-methoxyphenol mit Isocyanat	
<b>Synthese 3</b> Umsetzung von 3-Methoxybenzylamin mit Isocyanat	
<b>Synthese 4</b> Umsetzung von 3,5-Dimethoxybenzylamin mit Isocyanat	
<b>Synthese 5</b> Umsetzung von 4-Methoxybenzylamin mit Isocyanat	





Für die Umsetzung der modifizierten Siloxane wurden mit den Enzymen ThL und HRP zwei Vorversuche in Mikrotiterplatten gestartet. Nachfolgend die Beschreibung der durchgeführten Experimente und deren Reaktionsbedingungen.

#### 2.4.1.1 Assay mit Laccase von *T. hirsuta*

Für den Laccase Assay wurden 10 mg der modifizierten Siloxane mit der Nummer 1, 4, 5, 6, 7 und 8 in 2 ml Reaktionsgefäße eingewogen. Zum Lösen der Substrate wurden 2 ml DMSO (trocken) dazu pipettiert und über Nacht im Thermomixer mit 1000 rpm bei 30 °C geschüttelt. Weiters wurde ein 100 mM Natriumacetat Puffer hergestellt, der mit einer 140 mM Essigsäurelösung auf pH 4,5 eingestellt wurde. Auch eine 25 %ige Ethanol Lösung wurde benötigt, die mit dH<sub>2</sub>O verdünnt wurde. Das Enzym ThL wurde 1:100 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde Tabelle 10 entsprechend in einer 96 Mikrotiterplatte vorbereitet und im Anschluss mit dem Plate-Reader vermessen. Als Messmethode wurde ein Kinetik Zyklus mit einem Wellenlängenscan von 300-800 nm gewählt, wobei alle 30 Minuten ein Zyklus gefahren wurde. Ergebnisse und Diskussion finden sich in Kapitel 3.4.1.1.

**Tabelle 10: Reaktionsansatz für modifizierte Siloxane I mit ThL**

	Blank Substrat [ $\mu\text{l}$ ]	Blank Enzym [ $\mu\text{l}$ ]	Substrat + Enzym [ $\mu\text{l}$ ]
Puffer	125	125	25
EtOH	25	25	25
Substrat	100	-	100
Enzym	-	100	100

#### 2.4.1.2 Assay mit Horseradish Peroxidase

Für den HRP Assay wurden 10 mg der modifizierten Siloxane mit der Nummer 1, 4, 5, 6, 7 und 8 in 2 ml Reaktionsgefäße eingewogen. Zum Lösen der Substrate wurden 2 ml DMSO (trocken) dazu pipettiert und über Nacht im Thermomixer mit 1000 rpm bei 30 °C geschüttelt. Weiters wurde ein Phosphat Puffer mit pH 6,3 hergestellt, der aus einer 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Lösung und einer 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Lösung im Verhältnis 3:1 gemischt wurde. Auch eine 25 %ige Ethanol Lösung und eine 1 %ige Wasserstoffperoxid Lösung wurden benötigt, die mit  $\text{dH}_2\text{O}$  verdünnt wurden. Das Enzym HRP mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  wurde 1:1000 mit  $\text{dH}_2\text{O}$  verdünnt eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde Tabelle 11 entsprechend in einer Mikrotiterplatte vorbereitet und im Anschluss mit dem Plate-Reader vermessen. Als Messmethode wurde wiederum ein Kinetik Zyklus mit einem Wellenlängenscan von 300 – 800 nm gewählt, wobei alle 30 Minuten ein Zyklus gefahren wurde. Auswertung und Diskussion sind in Kapitel 3.4.1.2 zu finden.

**Tabelle 11: Reaktionsansatz für modifizierte Siloxane I mit HRP**

	Blank Substrat [ $\mu\text{l}$ ]	Blank Enzym [ $\mu\text{l}$ ]	Substrat + Enzym [ $\mu\text{l}$ ]
Puffer	125	125	25
EtOH	25	25	25
$\text{H}_2\text{O}_2$	1	1	1
Substrat	100	-	100
Enzym	-	100	100

#### 2.4.1.3 Weitere Tests

Nachdem die Vorversuche mit Laccase von *T. hirsuta* und Horseradish Peroxidase nicht optimal funktioniert haben, wurden noch weitere Tests durchgeführt, um bessere Reaktionsbedingungen zu erforschen. Ziel war es herauszufinden, in welchem Puffer bzw. Lösungsmittel (Ethanol, Acetonitril, Benzaldehyd, DMSO) die Umsetzung gut funktioniert, ohne dass die Substrate ausfallen oder trüb werden. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die durchgeführten Experimente. Die genauen

Pipettierschemata für jeden einzelnen Versuch sind den Tabellen 13 – 20 zu entnehmen, Ergebnisse und Diskussion sind in Kapitel 3.4.1.3 zu finden.

**Tabelle 12: Ansätze für verbesserte Reaktionsbedingungen der modifizierte Siloxane**

Versuch	Substrat	Puffer	pH	Mediator	Laccase	Verdünnung
1	5	100 mM NaAc	4,5		TveL	1:100
2	1, 4, 5, 6, 7	25 mM Succinat	4,5		TveL	
3	1, 4, 5, 6, 7, 8	Phosphat	7,0		MtL	1:1000
4	1, 4, 5, 6, 7, 8	dH <sub>2</sub> O	7,0		MtL	1:1000
5	1, 5	dH <sub>2</sub> O	7,0		MtL	1:100
6	1, 4, 7	-	-	ja	MtL	1:1000
7	1, 4, 7	-	-	ja	MtL	1:1000
8	1, 4, 7	-	-	ja	MtL	1:1000

**Tabelle 13: Versuch 1 – Reaktionsansatz für EtOH 75 %ig**

	Blank [µl]	Laccase [µl]	Substrat [µl]	Substrat + Enzym [µl]
Puffer	975	875	875	775
EtOH	25	25	25	25
Substrat	-	-	100	100
Enzym	-	100	-	100

**Tabelle 14: Versuch 2 – Reaktionsansatz für 50 % EtOH in Endkonzentration**

	Blank [µl]	Substrat [µl]	Substrat + Enzym [µl]
Puffer	500	400	300
EtOH	500	500	500
Substrat	-	100	100
Enzym	-	-	100

**Tabelle 15: Versuch 3 – Reaktionsansatz für 80 % Acetonitril in Endkonzentration + Phosphatpuffer**

	Blank [µl]	Substrat [µl]	Substrat + Enzym [µl]
Acetonitril	800	800	800
Puffer	200	100	-
Substrat	-	100	100
Enzym	-	-	100

**Tabelle 16: Versuch 4 – Reaktionsansatz für 80 % Acetonitril in Endkonzentration + dH<sub>2</sub>O**

	Blank [µl]	Substrat [µl]	Substrat + Enzym [µl]
Acetonitril	800	800	800
Puffer	200	100	-
Substrat	-	100	100
Enzym	-	-	100

**Tabelle 17: Versuch 5 – Reaktionsansatz für Benzaldehyd**

	Blank [ $\mu$ l]	Substrat [ $\mu$ l]	Substrat + Enzym [ $\mu$ l]
Acetonitril	800	800	800
Puffer	200	100	-
Benzaldehyd	15	15	15
Substrat	-	100	100
Enzym	-	-	100

**Tabelle 18: Versuch 6 – Reaktionsansatz für Mediator + EtOH**

	Blank [ $\mu$ l]	Positiv Kontrolle [ $\mu$ l]	Substrat + Enzym [ $\mu$ l]
Enzym	200	200	200
Mediator	200	200	200
Substrat	-	200	200
Puffer	600	400	400

**Tabelle 19: Versuch 7 – Reaktionsansatz für Mediator + Acetonitril**

	Blank [ $\mu$ l]	Positiv Kontrolle [ $\mu$ l]	Substrat + Enzym [ $\mu$ l]
Enzym	200	200	200
Mediator	200	200	200
Substrat	-	200	200
Puffer	600	400	400

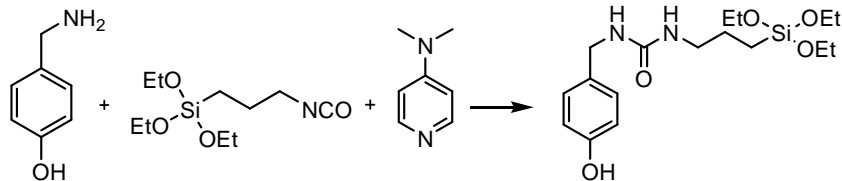
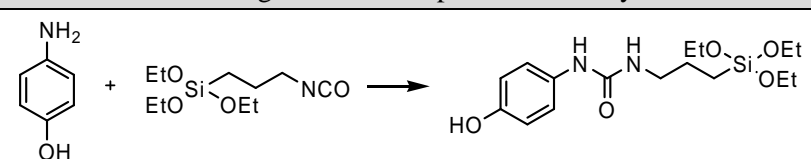
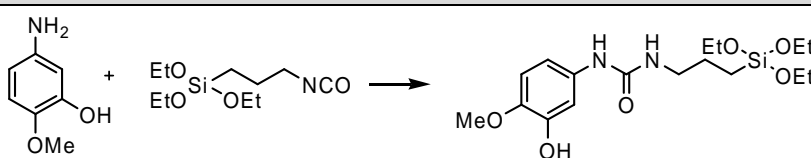
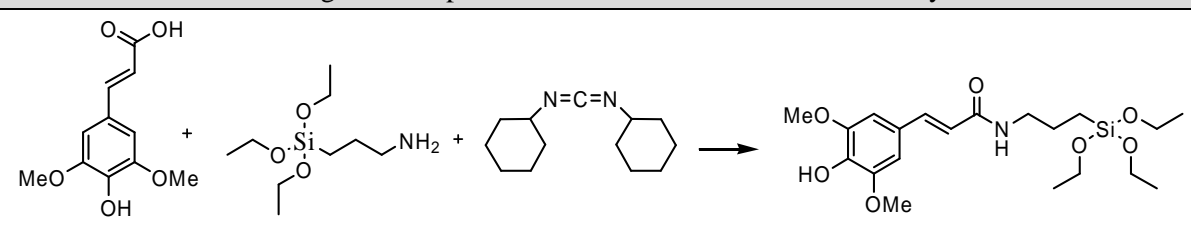
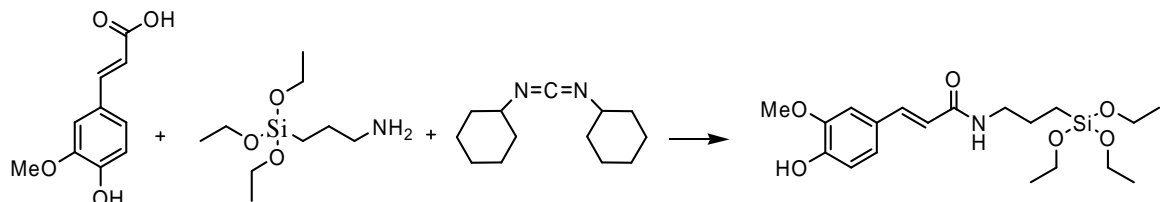
**Tabelle 20: Versuch 8 – Reaktionsansatz für Mediator + DMSO**

	Blank + Enzym [ $\mu$ l]	Positiv Kontrolle [ $\mu$ l]	Substrat + Enzym [ $\mu$ l]	Substrat [ $\mu$ l]
Enzym	200	200	200	-
Mediator	200	200	200	-
DMP	-	200	-	-
Substrat	-	-	200	200
Puffer	600	400	400	800

## 2.4.2 Modifizierte Siloxane II

Drei der vorne genannten modifizierten Siloxane wurden von der Firma Profactor neu synthetisiert, sodass die Substrate am Ende der Herstellung in ethanolischer Lösung vorlagen. Es handelte sich dabei um die Substrate 1, 2, und 6 von Tabelle 9. Ausgangssubstrate dafür waren 4-Hydroxybenzylamin, 4-Aminophenol und 5-Amino-2-methoxyphenol. Zusätzlich wurden noch Sinapinsäure und Ferulasäure modifiziert. Die genaue Herstellung erfolgte nach folgenden Syntheseschritten:

Tabelle 21: Synthese der modifizierten Siloxane II

Synthese 1 Umsetzung von 4-Hydroxybenzylamin mit Isocyanat und DMAP als Katalysator	
	
Synthese 6 Umsetzung von 4-Aminophenol mit Isocyanat	
	
Synthese 2 Umsetzung von 5-Amino-2-methoxyphenol mit Isocyanat	
	
Synthese 9 Umsetzung von Sinapinsäure mit AMTES und DCC als Katalysator	
	
Synthese 10 Umsetzung von Ferulasäure mit AMTES und DCC als Katalysator	
	

#### 2.4.2.1 Reaktionsansatz in UV-Küvetten

Um die Farbreaktion photometrisch verfolgen zu können, wurden parallel zwei Versuche gestartet. Zum einen wurde die Reaktion in reinem Ethanol durchgeführt, zum anderen wurde die Reaktion in einem 1:1 Gemisch aus Ethanol und Puffer verfolgt. Die genauen Versuchsbedingungen sind den nachfolgenden Beschreibungen zu entnehmen.

Für die Durchführung wurden zunächst die Reagenzien Ethanol, Puffer und Substrat in UV-Küvetten pipettiert. Erst kurz vor Messbeginn wurde Enzym zugegeben, um die Reaktion zu starten. Die Messung erfolgte mit dem Photospektrometer, wobei ein Wellenlängenscan von 200 – 800 nm vorgenommen wurde. Ergebnisse sind in Kapitel 3.4.2.1 diskutiert.

#### Versuch mit Ethanol

Der Versuch wurde in Ethanol (99,8 %ig) durchgeführt. Als Substrat wurden jeweils 100 µl der ethanolischen Lösungen eingesetzt. Als Enzyme dienten ThL und MtL (jeweils 1:1000 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt). Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 22 beschrieben.

**Tabelle 22: Reaktionsansatz in UV-Küvetten für modifizierte Siloxane II mit Ethanol**

	Blank Substrat [µl]	Blank Enzym [µl]	Substrat + Enzym [µl]
Ethanol (99,8 %ig)	900	900	800
Substrat	100	-	100
Enzym	-	100	100

#### Versuch mit Ethanol und Puffer

Für den zweiten Ansatz wurde mit Ethanol (99,8 %ig) und Puffer im Verhältnis 1:1 gearbeitet. Beim Verwenden der ThL kam ein 50 mM Ammoniumacetat Puffer pH 4,3 zum Einsatz. Für die MtL wurde ein 50 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,6 verwendet. Als Substrat wurden wiederum jeweils 100 µl der ethanolischen Lösungen eingesetzt. Der Reaktionsansatz ist Tabelle 23 zu entnehmen.

**Tabelle 23: Reaktionsansatz in UV-Küvetten für modifizierte Siloxane II mit Ethanol und Puffer**

	Blank Substrat [µl]	Blank Enzym [µl]	Substrat + Enzym [µl]
Puffer	450	450	400
Ethanol (99,8 %ig)	450	450	400
Substrat	100	-	100
Enzym	-	100	100

#### 2.4.2.2 Reaktionsansatz in UV-Mikrotiterplatten

Der Reaktionsansatz in den UV-Mikrotiterplatten wurde gleich gehandhabt, wie der Reaktionsansatz in den UV-Küvetten (Kapitel 0). Der einzige Unterschied lag darin, dass im Verhältnis weniger Volumen verwendet wurde und die Absorption der Proben mit dem Plate-Reader gemessen werden konnte.

Für den Versuchsstart wurden zunächst Puffer und Ethanol in einer UV-Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Platte wurde dabei auf Eis gekühlt, damit das Ethanol nicht verdampfen konnte. Danach wurden die Substrate zugegeben und erst ganz zum Schluss das Enzym. Die Reaktionszeit betrug sechs Stunden. Für unten stehende Versuche wurde anschließend ein Wellenlängenscan von 300 – 700 nm durchgeführt, die Ergebnisse inklusive eingescannter Mikrotiterplatten werden in Kapitel 3.4.2.2 diskutiert.

#### Versuch mit Ethanol

Dieser Versuch wurde ausschließlich mit Ethanol (99,8 %ig) durchgeführt. Als Substrate wurden jeweils 30 µl der ethanolischen Lösungen eingesetzt und als Enzyme wurden 30 µl ThL und MtL (jeweils 1:1000 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt) verwendet. Der Reaktionsansatz ist Tabelle 24 zu entnehmen.

**Tabelle 24: Reaktionsansatz in UV-Mikrotiterplatte für modifizierte Siloxane II mit Ethanol**

	Blank Substrat	Blank Enzym	Substrat + Enzym
Ethanol (99,8 %ig)	270	270	240
Substrat	30	-	30
Enzym	-	30	30

#### Versuch mit Ethanol und Puffer

Der Versuch wurde mit Ethanol (99,8 %ig) und Puffer im Verhältnis 1:1 durchgeführt. Für die ThL kam ein 50 mM Ammoniumacetat Puffer pH 4,3 zum Einsatz. Für die MtL wurde ein 50 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,6 verwendet. Als Substrat wurden 30 µl der ethanolischen Lösungen eingesetzt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 25 ersichtlich.

**Tabelle 25: Reaktionsansatz in UV-Mikrotiterplatte für modifizierte Siloxane II mit Ethanol und Puffer**

	Blank Substrat	Blank Enzym	Substrat + Enzym
Puffer	135	135	120
Ethanol (99,8 %ig)	135	135	120
Substrat	30	-	30
Enzym	-	30	30

### 2.4.2.3 Immobilisierung auf Kieselgel-Platten

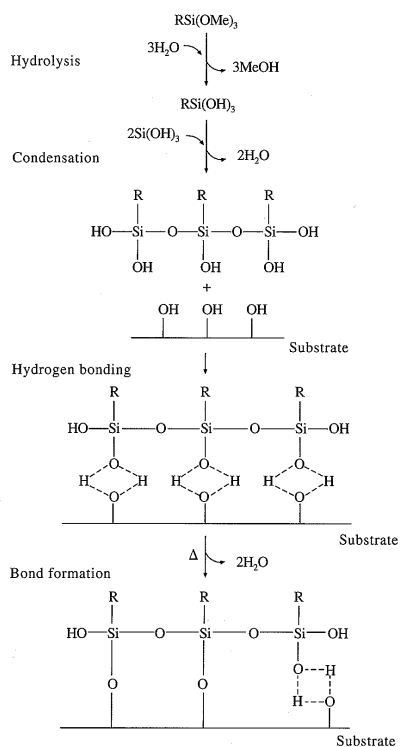
Die Immobilisierung auf Kieselgel-Platten (DC-Platten) wurde auf drei verschiedene Arten ausgeführt, wobei der Unterschied im Trocknungsverfahren lag. Bei Versuch I wurden die Substrate bei Raumtemperatur, bei Versuch II im Trockenschrank und bei Versuch III im Exsikkator unter Vakuum getrocknet.

## Versuch I

Von einer DC-Platte wurden 20 Quadrate mit einer Größe von 2x 2 cm ausgeschnitten. Jeweils vier dieser Kieselgel-Platten wurden mit 100 µl vom gleichen Substrat betropft und für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

## Versuch II

Für einen zweiten Versuch mit den DC-Plättchen wurden wiederum 20 Quadrate mit den Maßen 2x 2 cm ausgeschnitten. Auch dieses Mal wurden 100 µl von den Substraten auf die Kieselgel-Platten aufgetragen. Der Unterschied bestand nun darin, die DC-Platten über den Zeitraum von drei Tagen bei Raumtemperatur trocknen zu lassen. Anschließend wurden die Plättchen noch bei 105 °C für 24 Stunden in den Trockenschrank gelegt, um eine Polymerisation gewährleisten zu können. Die Polymerisations-Reaktion ist in Abbildung 5 dargestellt und wurde von Barry Arkles et al. beschrieben.



**Abbildung 5: Polymerisationsreaktion von Silanen auf Hydroxy-Oberflächen**

## Versuch III

Beim dritten Versuch wurden 20 quadratische Kieselgel-Platten mit einer Größe von 2x 2 cm ausgeschnitten und mit 100 µl von den Substraten betropft. Die Plättchen trockneten anschließend für 24 Stunden unter Vakuum im Exsikkator.



#### 2.4.2.4 Abbau der immobilisierten Substrate mit Hilfe der Laccase von *T. hirsuta*, Laccase *M. thermophila* und Laccase von *T. villosa*

Nach den unterschiedlichen Trocknungsprozessen wie in Kapitel 2.4.2.3 beschrieben, wurden die Blanks in 10 ml ddH<sub>2</sub>O getaucht. Die restlichen DC-Platten wurden in 10 ml Enzymlösung (500 µl Enzym auf 10 ml ddH<sub>2</sub>O) mit ThL, MtL und TviL (jeweils 1:1000 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt) eingelegt. Nach 24 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen. Die Plättchen konnten aus dem bidestillierten Wasser bzw. aus den Enzymlösungen entnommen und wiederum für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet werden. Anschließend erfolgte das Waschen aller Proben für eine weitere Stunde in 10 ml dH<sub>2</sub>O. Nach erneuter Trocknung für eine Stunde bei Raumtemperatur wurden die gefärbten DC-Platten mit dem Farbmessgerät gemessen. Die gefärbten Plättchen, sowie die gemessenen  $\Delta E$ -Werte sind Kapitel 3.4.2.3.1 zu entnehmen.

#### 2.4.2.5 Abbau der immobilisierten Substrate mit Hilfe der Myeloperoxidase

Für die Immobilisierung von Substrat 4 wurde die Trocknungsmethode nach Versuch II im Trockenschrank angewandt (siehe Kapitel 2.4.2.3). Nach vollendeter Polymerisation konnte der Blank in ein kleines Fläschchen mit 1,5 ml ddH<sub>2</sub>O und 1,5 µl einer 1 %igen Wasserstoffperoxid Lösung getaucht werden. Für die Probe wurden 1,5 ml eines 100 mM Kaliumphosphat Puffers pH 7,1 und 1,5 µl einer 1 %igen Wasserstoffperoxid Lösung in einem kleinen Fläschchen zusammen pipettiert. Das immobilisierte Substrat wurde daraufhin in das Fläschchen eingelegt und 500 µl vom Enzym Myeloperoxidase mit einer Aktivität von 150 U ml<sup>-1</sup> wurden hinzugefügt. Die Reaktionszeit betrug fünf Tage. Diskussion und Fotos können Kapitel 3.4.2.3.2 entnommen werden.

### 2.4.3 Modifizierte Siloxane III

Für den dritten Teil der Testreihe mit modifizierten Siloxanen kamen die zwei bereits bekannten Substrate 6 und 2 und vier neue Substanzen zum Einsatz. Alle Substrate wurden zwei Mal umkristallisiert und gesäult und lagen nun zum Testen in sehr reiner Form vor. Die Substrate 11, 6, 2, 13 und 14 lagen als Feststoffe, Substrat 12 in flüssiger Form vor. Die Proben wurden wie schon im zweiten Teil in flüssigem Zustand und danach immobilisiert auf DC-Platten mit verschiedenen Enzymen getestet. Zusätzlich wurden von den Substraten 11, 6, 2, 13 und 14 noch NMR Messungen durchgeführt, um sicherzustellen, dass es sich bei den synthetisierten Produkten auch wirklich um die vorliegenden Substrate handelt.

Tabelle 26: Synthese der modifizierten Siloxane III

<p>Synthese 11</p> <p>Umsetzung von Fast Blue RR mit Isocyanat</p>
<p>Synthese 6</p> <p>Umsetzung von 4-Aminophenol mit Isocyanat</p>
<p>Synthese 2</p> <p>Umsetzung von 5-Amino-2-methoxyphenol mit Isocyanat</p>
<p>Synthese 12</p> <p>Umsetzung von Vanillinsäure mit Isocyanat</p>
<p>Synthese 13</p> <p>Umsetzung von 4-Amino-2-methylphenol mit Isocyanat</p>
<p>Synthese 14</p> <p>Umsetzung von 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure mit Isocyanat</p>

Da Substrat 12 in flüssigem Zustand vorlag, wurde von dieser Probe mit Hilfe des Molekulargewichts und der Dichte auf die Molarität zurück gerechnet. Es ergab sich eine Konzentration von 0,25 mM. Für die restlichen fünf Proben wurden daher ebenfalls 0,25 mM Lösungen hergestellt. Die Einwaagen der einzelnen Substrate finden sich in Tabelle 27. Die Proben wurden anschließend in 2 ml EtOH (99,8%ig) gelöst, um eine Konzentration von 0,25 mM zu erhalten.

**Tabelle 27: Einwaage der Substrate für modifizierte Siloxane III**

Substrat	Einwaage [mg]
11	259,26
6	177,86
2	192,84
13	184,87
14	199,83

### 2.4.3.1 Reaktionsansatz in Mikrotiterplatten

Der Versuch in Mikrotiterplatten wurde gleich durchgeführt, wie in Kapitel 2.4.2.2 beschrieben. Auch hier wurden zunächst Puffer und Ethanol in einer Mikrotiterplatte vorgelegt, wobei die Platte auf Eis gekühlt wurde, damit das Ethanol nicht verdampfen konnte. Danach wurden die Substrate und zum Schluss die Enzyme zupipettiert. Die Reaktionszeit betrug 24 Stunden. Ergebnisse und eingescannte Mikrotiterplatten finden sich in Kapitel 3.4.3.1.

#### Versuch mit Ethanol

Der Versuch wurde ausschließlich mit Ethanol (99,8 %ig) durchgeführt. Als Substrate wurden jeweils 30 µl der ethanolischen Lösungen eingesetzt und als Enzyme wurden 30 µl ThL und MtL (jeweils 1:1000 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt) verwendet. Der Reaktionsansatz ist Tabelle 28 zu entnehmen.

**Tabelle 28: Reaktionsansatz in Mikrotiterplatte für modifizierte Siloxane III mit EtOH**

	Blank Substrat	Blank Enzym	Substrat + Enzym
Ethanol (99,8 %ig)	270	270	240
Substrat	30	-	30
Enzym	-	30	30

#### Versuch mit Ethanol und Puffer

Der Versuch wurde mit Ethanol (99,8 %ig) und Puffer im Verhältnis 1:1 durchgeführt. Für die ThL kam ein 50 mM Ammoniumacetat Puffer pH 4,5 zum Einsatz. Für die MtL wurde ein 50 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,8 verwendet. Als Substrat wurden 30 µl der ethanolischen Lösungen eingesetzt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 29 ersichtlich.

**Tabelle 29: Reaktionsansatz in Mikrotiterplatte für modifizierte Siloxane III mit Ethanol und Puffer**

	Blank Substrat	Blank Enzym	Substrat + Enzym
Puffer	135	135	120
Ethanol (99,8 %ig)	135	135	120
Substrat	30	-	30
Enzym	-	30	30

#### 2.4.3.2 Immobilisierung auf Kieselgel-Platten

Bei der Immobilisierung auf Kieselgel-Platten wurde auf die Trocknungsvariante II im Trockenschrank zurückgegriffen (siehe Kapitel 2.4.2.3). Hierfür wurden Quadrate mit der Größe von 2x 2 cm ausgeschnitten, mit 100 µl der Substrate betropft, eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 24 Stunden bei ~105 °C in den Trockenschrank gelegt.

#### 2.4.3.3 Abbau der immobilisierten Substrate mit Hilfe der Laccase von *T. hirsuta*, Laccase *M. thermophila* und Laccase von *T. villosa*

Für die Farbreaktionen der immobilisierten Substrate wurden die Blanks in 10 ml dH<sub>2</sub>O getaucht, die Proben wurden in 10 ml Enzymlösung (500 µl Enzym auf 10 ml dH<sub>2</sub>O) mit ThL, MtL und TviL (jeweils 1:1000 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt) gelegt. Die Farbreaktion wurde nach 24 Stunden beendet und alle DC-Platten wurden für eine Stunde in 10 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend erfolgte die Trocknung der Proben für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Zum Schluss konnten alle Plättchen mit dem Farbmessgerät vermessen werden. Die gefärbten Kieselgel-Platten, sowie die gemessenen  $\Delta E$ -Werte und Diskussion sind in Kapitel 3.4.3.2.1 zu finden.

#### 2.4.3.4 Abbau der immobilisierten Substrate mit Hilfe der Myeloperoxidase

Nachdem die Farbreaktion von Substrat 11 (mit dem Ausgangssubstrat Fast Blue RR) sehr gut funktioniert hat, wurde nun auch der Versuch unternommen, das Substrat mit Myeloperoxidase zu behandeln. Hierfür wurden für den Blank ein kleines Gefäß mit 1,5 ml dH<sub>2</sub>O und 1,5 µl einer 1 %igen Wasserstoffperoxid Lösung gefüllt. Für die Probe wurden 1,5 ml eines 100 mM Kaliumphosphat Puffers mit pH 7,1 und 1,5 µl einer 1 %igen Wasserstoffperoxid Lösung verwendet. Die zwei mit Substrat 11 immobilisierten Plättchen wurden daraufhin für fünf Tage in die Lösungen getaucht. Ergebnisse und Diskussion sind Kapitel 3.4.3.2.2 zu entnehmen.

### 2.4.3.5 NMR Messungen

Um sichergehen zu können, dass es sich bei den synthetisierten Substraten von der Firma Profactor auch wirklich um die vorliegenden Molekülstrukturen handelt, wurden am Institut für Organische Chemie an der TU Graz von Prof. Weber  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  Spektren mittels NMR Messungen aufgenommen.

Für ein optimales Messergebnis musste jede Probe in einer Konzentration von  $100\text{ mg ml}^{-1}$  in DMSO  $d_6$  vorliegen und das NMR-Röhrchen sollte ein Drittel mit Flüssigkeit gefüllt sein. Die genauen Einwaagen finden sich in Tabelle 30. Die aufgenommenen NMR Spektren finden sich im Anhang.

**Tabelle 30: Einwaage der Substrate und des Lösungsmittels für die NMR Messungen**

Substrat	Einwaage [mg]	DMSO $d_6$ [ $\mu\text{l}$ ]
11	60,36	600
6	60,30	600
2	60,25	600
13	60,25	600
14	60,25	600

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Enzymaktivität

##### 3.1.1 ABTS Assay

Die Aktivitäten der Enzyme TveL, HRP und MPO waren bereits bekannt und sind in Tabelle 31 zusammengefasst. Die Aktivitäten der Enzyme ThL, MtL und TviL waren nicht bekannt und wurden mit Hilfe des ABTS Assays bestimmt. Die berechneten Enzymaktivitäten finden sich in Tabelle 32.

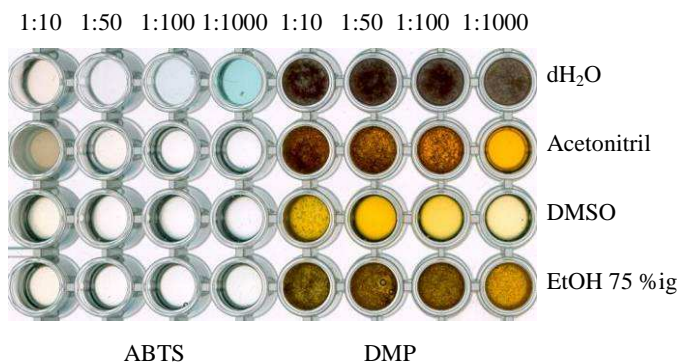
**Tabelle 31: Bekannte Enzymaktivitäten**

Enzym	Aktivität [U mg <sup>-1</sup> ]
TveL	22,4
HRP	1000
MPO	1500

**Tabelle 32: Berechnete Enzymaktivitäten**

Enzym	Steigung [Abs min <sup>-1</sup> ]	Verdünnung	Aktivität [U ml <sup>-1</sup> ]
ThL	0,8061	1:100	3,6
MtL	0,4800	1:10000	213,7
TviL	0,1424	1:10000	63,4

##### 3.1.2 Aktivität von MtL in verschiedenen Lösungsmitteln



**Abbildung 6: Aktivität von MtL in verschiedenen Lösungsmitteln**

In Abbildung 6 wurde die Aktivität von MtL in dH<sub>2</sub>O, Acetonitril, DMSO und EtOH (75 %ig) getestet. Im linken Block wurde das Enzym von der Verdünnungsstufe 1:10 bis 1:1000 mit dem Substrat ABTS umgesetzt, wobei nur in dH<sub>2</sub>O eine leichte Reaktion in Form einer Blaufärbung festgestellt werden konnte. Im rechten Block wurde das Enzym mit den gleichen Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:1000 mit dem Substrat DMP getestet. Hierbei konnte bei allen verwendeten Lösungsmitteln eine Reaktion beobachtet werden. Abhängig vom verwendeten Substrat ist das Enzym MtL in allen getesteten Lösungsmitteln zumindest mit DMP aktiv.

## 3.2 Kopplungsreaktionen

### 3.2.1 Optimierung der Menge von $H_2O_2$ bei der enzymatischen Kopplungsreaktion

Aufgrund der Tatsache, dass für die Reaktion mit HRP die Zugabe von Wasserstoffperoxid erforderlich ist,  $H_2O_2$  aber in zu hohen Konzentrationen gleichzeitig auch als Inhibitor fungieren kann, wurde 3,4-Dihydroxybenzoesäure ausgewählt, um den Prozess zu optimieren.

Bei der Anwendung von unterschiedlichen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid stellte sich heraus, dass alle Proben innerhalb von Sekunden sehr dunkel gefärbt wurden. Einzig die Probe mit  $5 \mu l H_2O_2$  war etwas heller gefärbt. Für weitere Versuche wurde daher beschlossen, mit einer 0,1%igen Wasserstoffperoxid Lösung ( $10 \mu l H_2O_2$  auf 10 ml Gesamtvolumen) zu arbeiten.

### 3.2.2 Kopplungsreaktion mit 1,4-Phenylendiamin und Horseradish Peroxidase

Abbildung 7 zeigt die Kopplungsreaktionen von 1,4-Phenylendiamin und 13 unterschiedlichen Substraten mit Horseradish Peroxidase. Die Nummern alleine stehen dabei jeweils für die Blanks, die Nummern mit dem Buchstaben „E“ stehen für die Proben mit Enzym. Optisch konnten bei den Substraten 1, 2, 8, 9, 10, und 13 leichte, bei den Substraten 3, 5, und 11 gut sichtbare Farbänderungen zwischen Blank und Probe festgestellt werden.

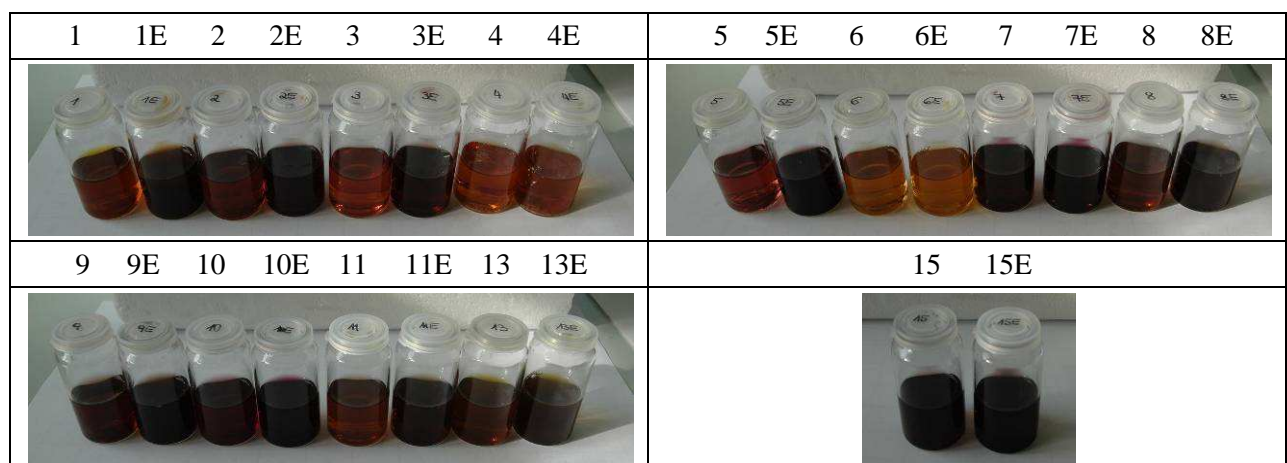


Abbildung 7: Kopplungsreaktion von 1,4-Phenylendiamin mit HRP für die Substrate 1-11, 13 und 15



### 3.2.3 Kopplungsreaktion mit 1,4-Phenylendiamin und Laccase von *T. versicolor*

In Abbildung 8 sind die Kopplungsreaktionen von 1,4-Phenylendiamin und 13 verschiedenen Substraten mit Laccase von *T. versicolor* zu sehen. Die Beschriftungen mit Nummern alleine stehen dabei jeweils für die Blanks, die Beschriftungen mit Nummern und dem Buchstaben „E“ kennzeichnen die Proben mit Enzym und die Beschriftungen mit Nummern und dem Buchstaben „M“ weisen auf Proben mit Enzym und Mediator hin.

Bei den Versuchen mit Laccase fiel sofort auf, dass die Farben der Reaktionen deutlich heller und besser zu unterscheiden waren, als bei den Versuchen mit Horseradish Peroxidase. Auch deutlich zu erkennen war, dass es keinen Unterschied zwischen den Proben mit und ohne Mediator gab. Da keine beschleunigte Reaktion durch Zugabe von HOBT festgestellt werden konnte, wurde bei weiteren Kopplungsversuchen auf die Zugabe eines Mediators verzichtet. Optisch war bei fast jedem Substrat eine deutliche Farbänderung zu erkennen, außer bei den Substraten 4, 6 und 11.

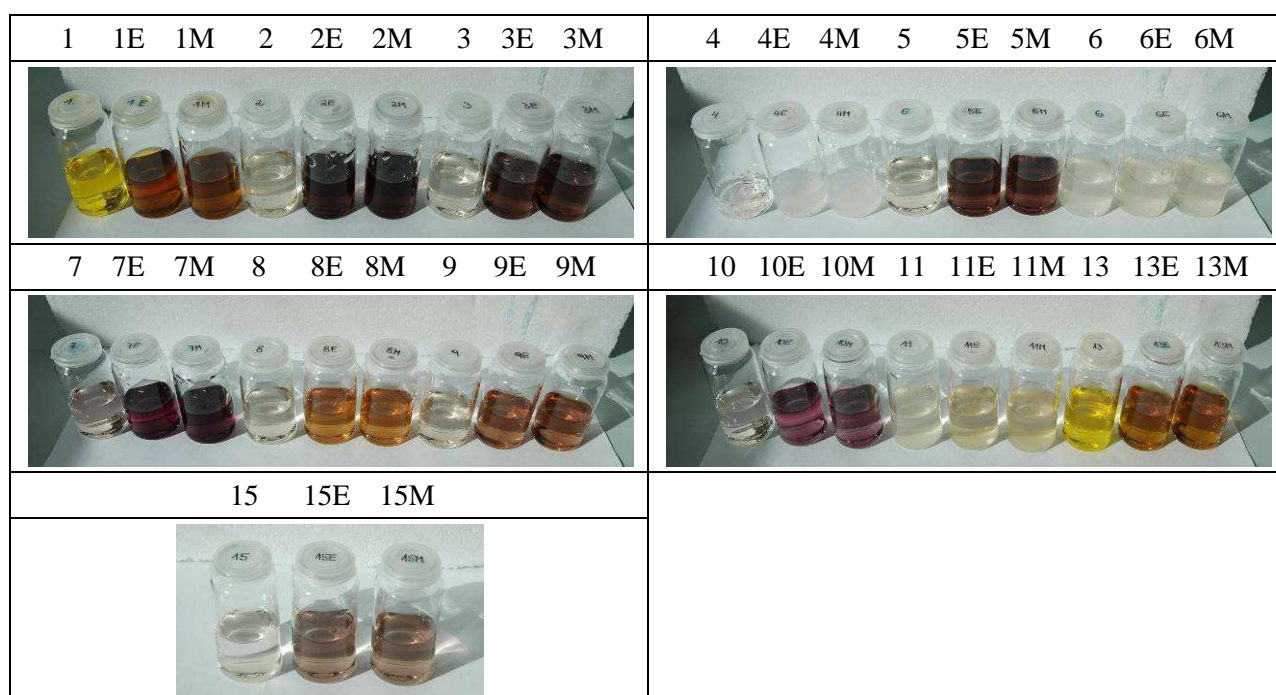


Abbildung 8: Kopplungsreaktion von 1,4-Phenylendiamin mit TveL für die Substrate 1-11, 13 und 15

### 3.2.4 Kopplungsreaktion mit Anilin und Laccase von *T. versicolor*

Die Farbreaktionen in Abbildung 9 zeigen die Kopplungsreaktionen von Anilin mit 13 Substraten durch Laccase von *T. versicolor*. Die Nummern stehen dabei jeweils wieder für die Blanks, Nummern mit dem Buchstaben „E“ zeigen die Proben mit Enzym.

Auffällig war auch hier, dass die Farbreaktionen mit Anilin sehr hell waren. Bei den Substraten 3, 6, und 17 waren keine Farbänderungen zu sehen. Bei den Substraten 1 und 13 konnte nur ein kleiner Farbunterschied festgestellt werden. Die Farbdifferenzen bei den restlichen Substraten waren sehr deutlich zu erkennen.

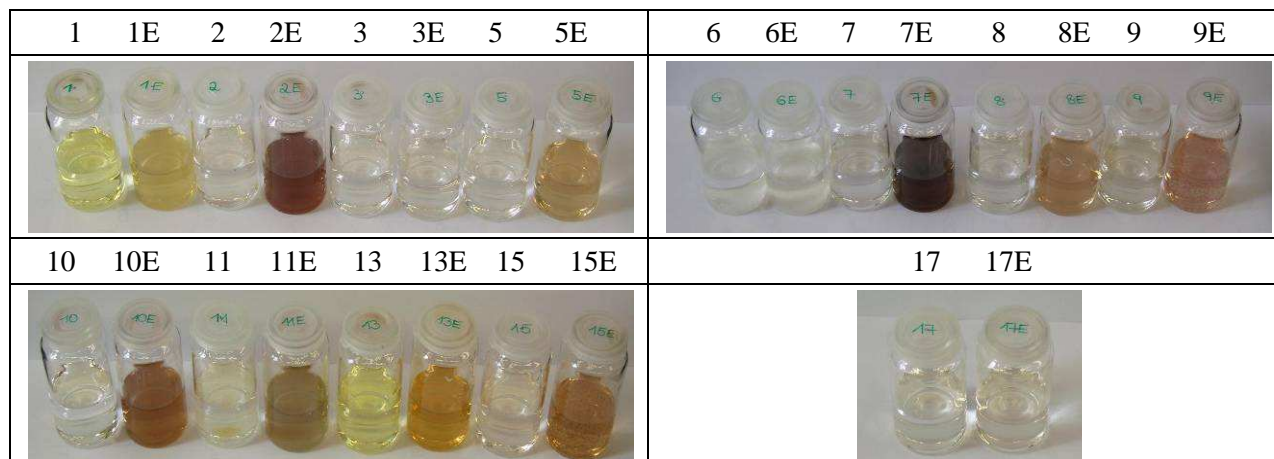


Abbildung 9: Kopplungsreaktion von Anilin durch TveL für die Substrate 1-3, 5-11, 13, 15 und 17

### 3.2.5 Immobilisierung von Ferulasäure und Kaffesäure auf APTS-Silicagel

Obwohl bei den vorne beschriebenen Kopplungsreaktionen Ferulasäure als Substrat nicht gut funktioniert hat, wurde diese dennoch für die Immobilisierung auf APTS-Silicagel ausgesucht, aufgrund der ähnlichen Molekülstruktur mit Kaffesäure und der Existenz einer Seitenkette als Spacer bei der Kopplung. Um diese Ähnlichkeit noch einmal zu verdeutlichen, sind die Strukturen der beiden Substrate in Tabelle 33 dargestellt.

Tabelle 33: Molekülstrukturen der Substrate 6 und 11

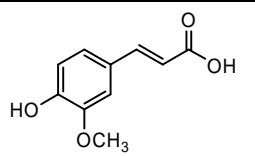
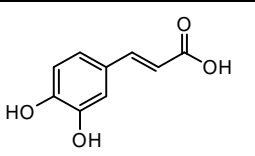
Ferulasäure (Substrat 6)	Kaffesäure (Substrat 11)
	

Abbildung 10 zeigt auf der linken Seite die Kopplungsreaktion der immobilisierten Ferula- und Kaffesäure mit Laccase von *T. versicolor*, auf der rechten Seite ist die Kopplungsreaktion der beiden immobilisierten Substrate mit Horseradish Peroxidase zu sehen. Die Beschriftung mit dem Buchstaben „F“ steht dabei für den Blank mit Ferulasäure, „F + E“ steht für die Reaktion der Ferulasäure mit dem jeweiligen Enzym. Analog dazu steht die Beschriftung mit dem Buchstaben „K“ für den Blank mit Kaffesäure, „K + E“ steht für die Reaktion von Kaffesäure mit dem jeweiligen Enzym.

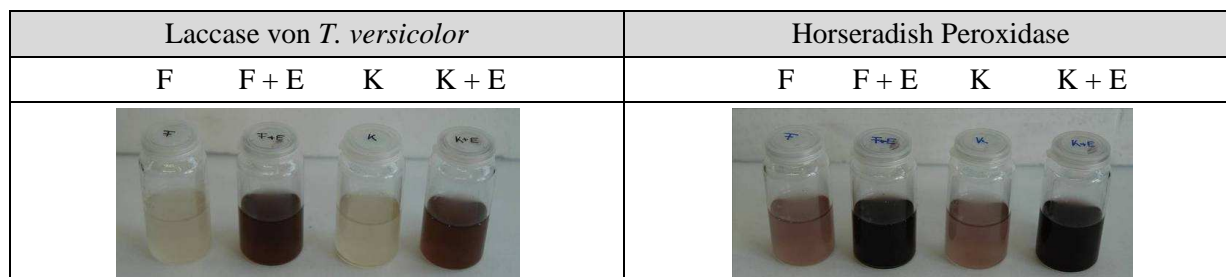


Abbildung 10: Kopplungsreaktion der immobilisierten Ferula- und Kaffesäure mit TveL und HRP nach einer Stunde

### 3.2.6 Immobilisierung von 1,4-Phenylendiamin auf APTS-Silicagel

Nachdem die Immobilisierung der zwei Substrate Ferula- und Kaffesäure gut funktioniert hat, wurde nun auch getestet, ob das Kopplungsreagenz 1,4-Phenylendiamin auf APTS-Silicagel aufgebracht und anschließend mit Enzym umgesetzt werden kann. Die Reaktionen wurden lt. Kapitel 2.2.8 durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abbildung 11 zu sehen. Bei der Beschriftung stehen die Nummern alleine für die Blanks, Nummern mit dem Buchstaben „E“ kennzeichnen die dazugehörigen Proben mit Enzym.

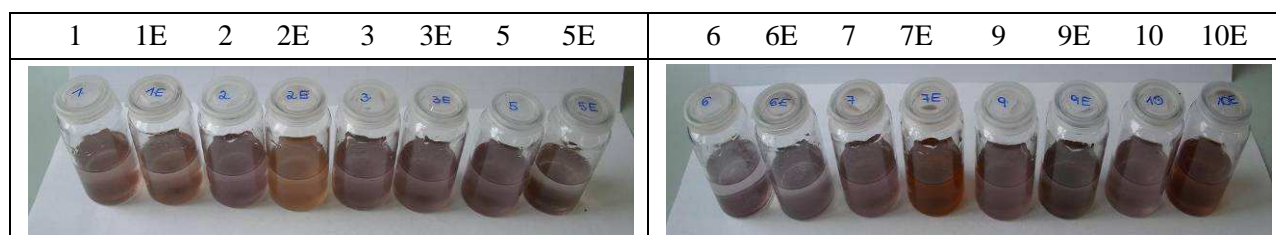
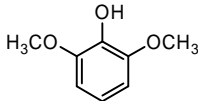
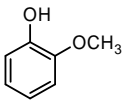
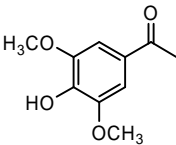


Abbildung 11: Kopplungsreaktion mit immobilisiertem 1,4-Phenylendiamin auf APTS Silicagel und TveL für die Substrate 1-3, 5-7, 9 und 10

Die Immobilisierung mit anschließender Enzymbehandlung hat bei den Substraten 2 und 10 gut funktioniert. Mit Abstand am besten war jedoch die Reaktion mit Substrat Nummer 7. Um die drei Strukturen miteinander vergleichen zu können, wurden diese zur Veranschaulichung in Tabelle 34 noch einmal dargestellt, wobei die Reaktionsfähigkeit wiederum von links nach rechts abnimmt.

Tabelle 34: Molekülstrukturen der Substrate 7, 10 und 2

2,6-Dimethoxyphenol (Substrat 7)	Guaiacol (Substrat 10)	3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon (Substrat 2)
		

### 3.3 Reaktivfarbstoffe

#### 3.3.1 Ergebnisse des Screenings

##### 3.3.1.1 Durchführung mit Laccase von *T. versicolor*

In Abbildung 12 sind die Farbreaktionen der 44 Farbstoffe mit der Laccase von *T. versicolor* dargestellt. Die Beschriftungen mit Nummern alleine stehen dabei jeweils für die Blanks, die Beschriftungen mit Nummern und dem Buchstaben „E“ kennzeichnen die Proben mit Enzym.

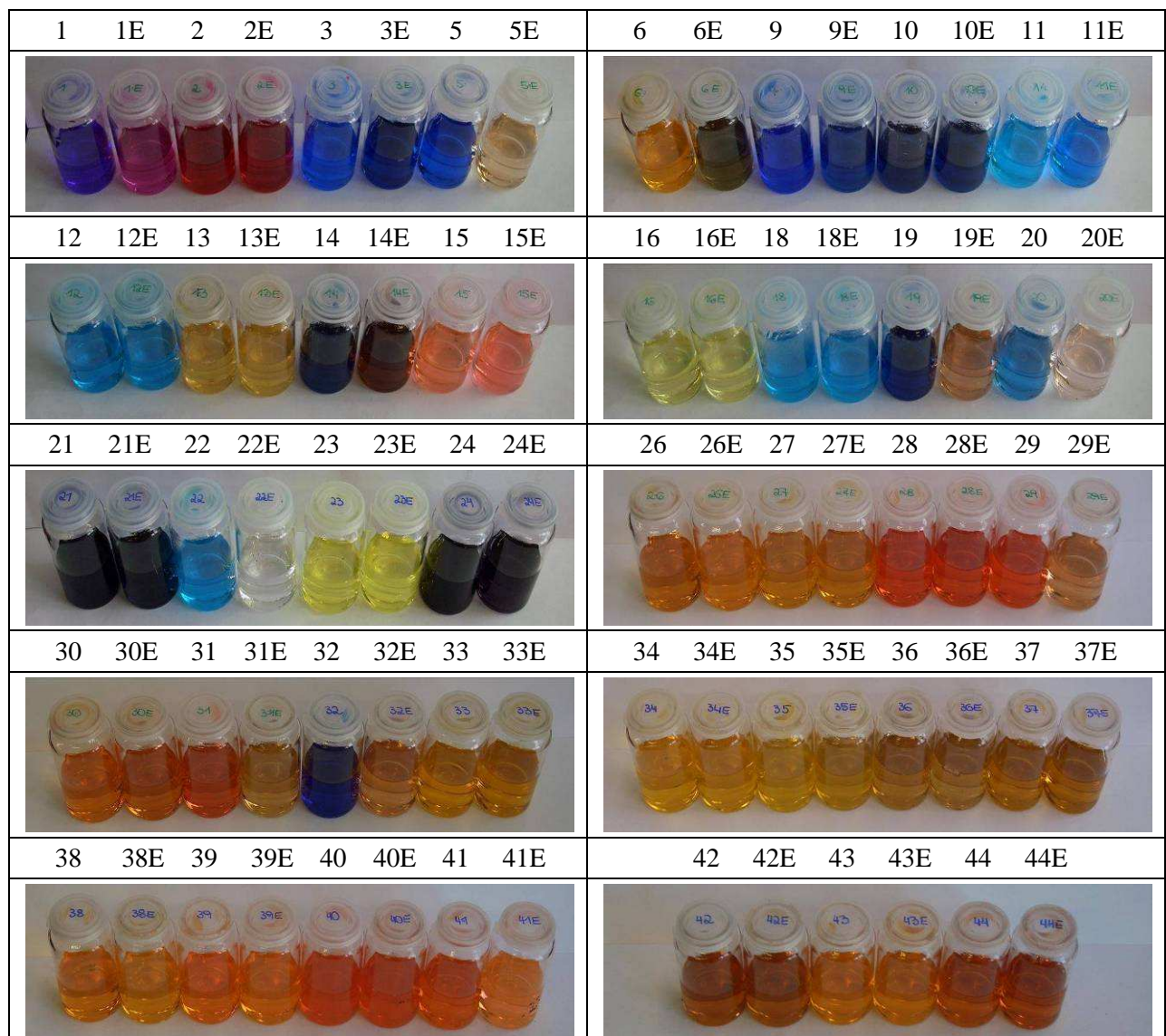


Abbildung 12: Umsetzung unterschiedlicher Farbstoffe mittels TveL

Die Versuche mit den Farbstoffen 1, 5, 6, 14, 19, 20, 22, 29, 31 und 32 haben besonders gut funktioniert. Nachfolgend finden sich in Abbildung 13 die Absorptionsspektren der Blanks für die Farbstoffe 1, 5, 6, 14 und 19. In Abbildung 14 sind die Absorptionsspektren der dazugehörigen Proben nach zwei Tagen Reaktionszeit zu sehen. Weiters sind in Abbildung 15 die Absorptionsspektren der Blanks für die Farbstoffe 20, 22, 29, 31 und 32 abgebildet, Abbildung 16 zeigt wiederum die Absorptionsspektren der dazugehörigen Proben nach zwei Tagen Reaktionszeit.

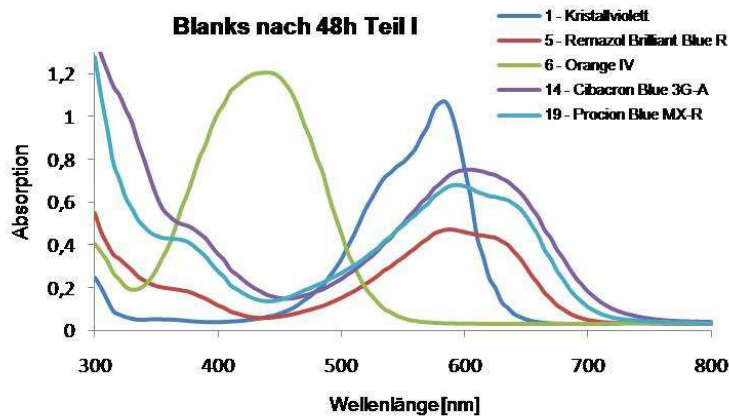


Abbildung 13: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h (Blank)

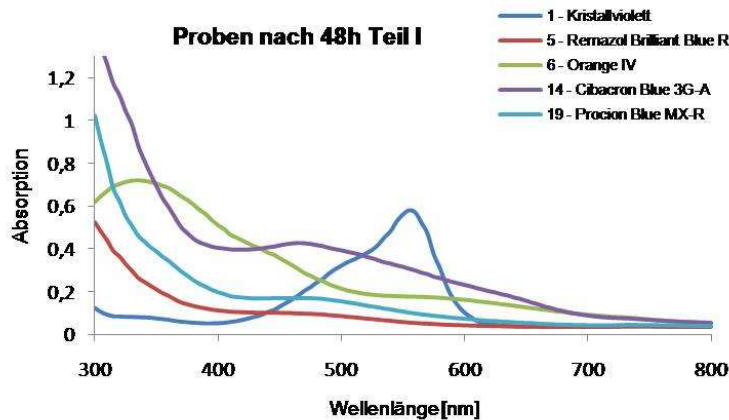


Abbildung 14: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h mit Laccase von *T. versicolor*

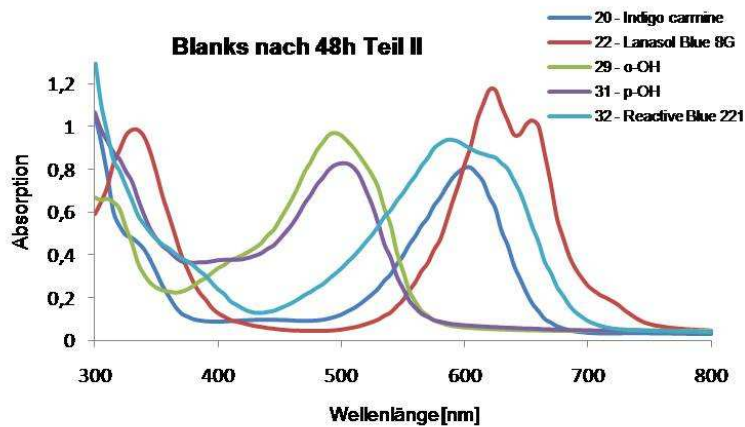


Abbildung 15: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h (Blank)

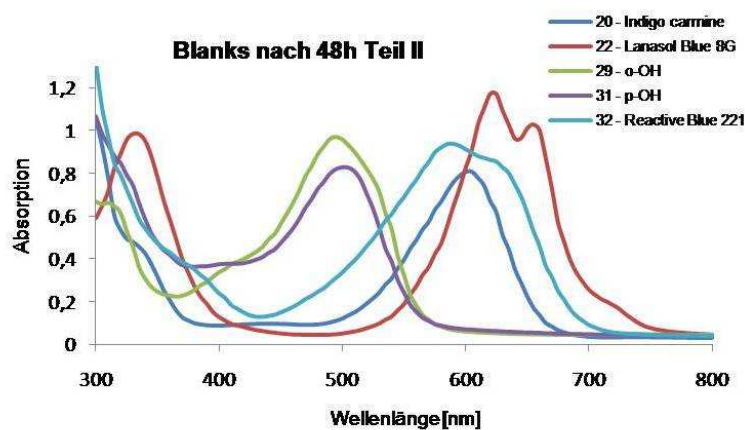


Abbildung 16: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h mit Laccase von *T. versicolor*

### 3.3.1.2 Durchführung mit Horseradish Peroxidase

Die Farbreaktionen der 44 Farbstoffe mit Horseradish Peroxidase sind in Abbildung 17 dargestellt. Die Beschriftungen mit Nummern alleine stehen dabei jeweils für die Blanks ohne  $H_2O_2$ , die Beschriftungen mit Nummern und dem Buchstaben „H“ kennzeichnen die Blanks mit  $H_2O_2$  und die Beschriftungen mit Nummern und dem Buchstaben „E“ stehen für die Proben mit Enzym. Da bei den Blanks mit und ohne  $H_2O_2$  (Farbstoffe 1-14) keine farblichen Unterschiede zu sehen waren, wurde bei allen weiteren Proben auf die Blanks ohne  $H_2O_2$  verzichtet.

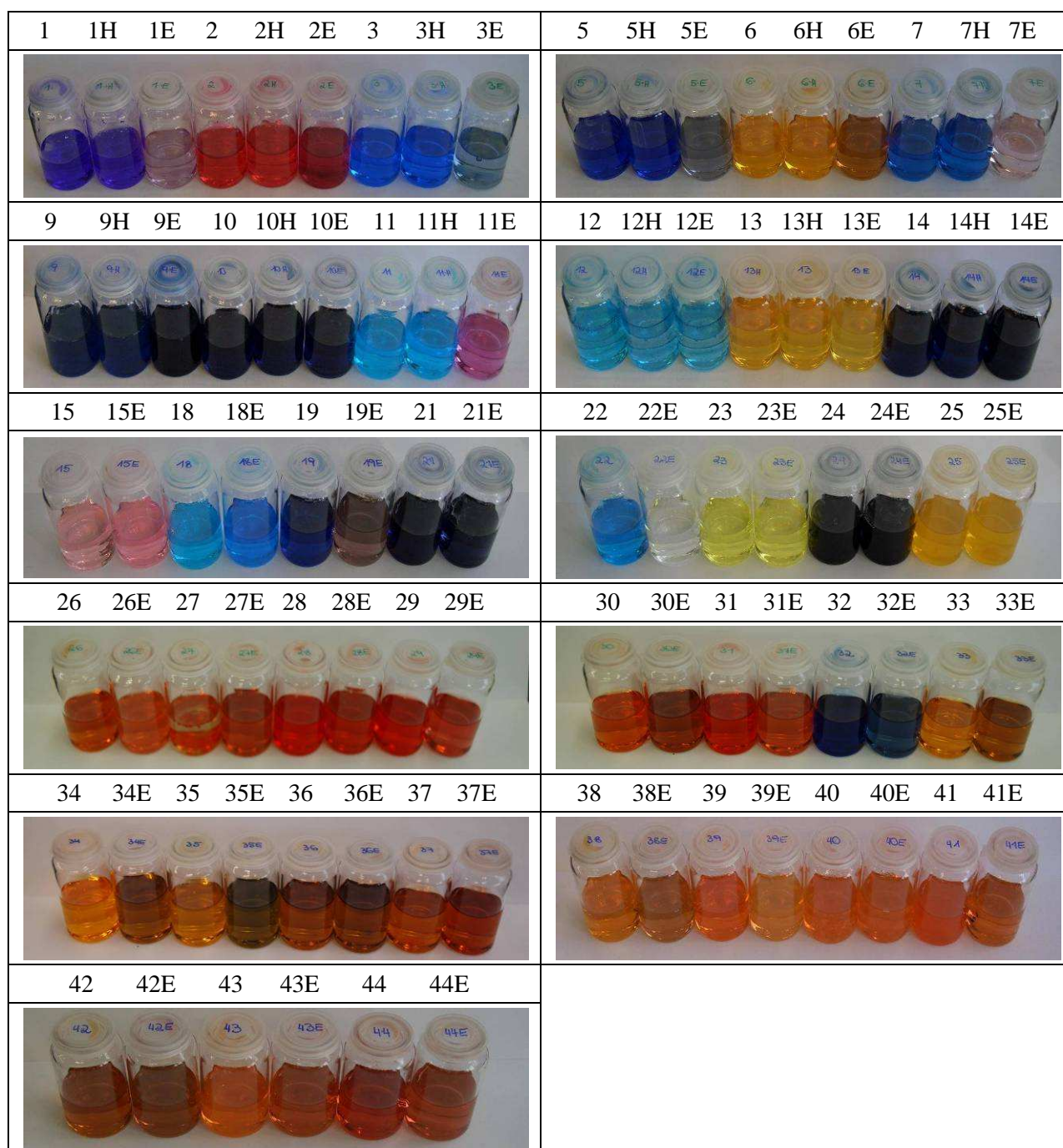


Abbildung 17: Umsetzung unterschiedlicher Farbstoffe mittels HRP

Beim Screening mit HRP haben die Farbstoffe 1, 3, 5, 7, 11, 19, 22, 29, 30 und 32 besonders gute Farbreaktionen gezeigt. Nachfolgend finden sich in Abbildung 18 die Absorptionsspektren der Blanks (mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) für die Farben 1, 3, 5, 7 und 11. In Abbildung 19 sind die Absorptionsspektren der dazugehörigen Proben nach zwei Tagen Reaktionszeit zu sehen. Weiters sind in Abbildung 20 die Absorptionsspektren der Blanks (mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) für die Farbstoffe 19, 22, 29, 30 und 32 abgebildet, Abbildung 21 zeigt wiederum die Absorptionsspektren der dazugehörigen Proben nach zwei Tagen Reaktionszeit.

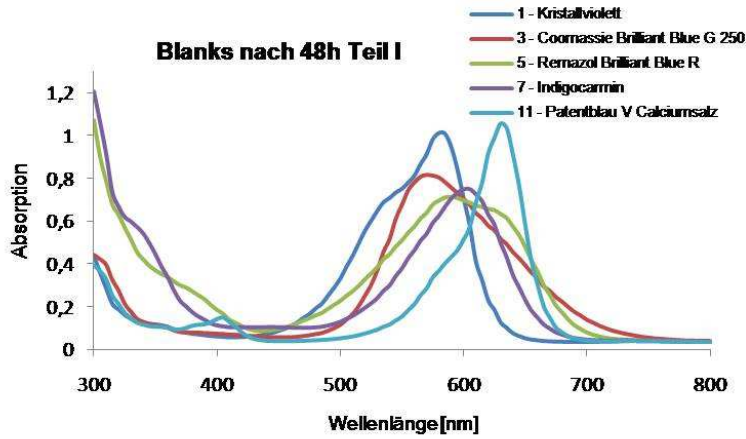


Abbildung 18: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h (Blank)

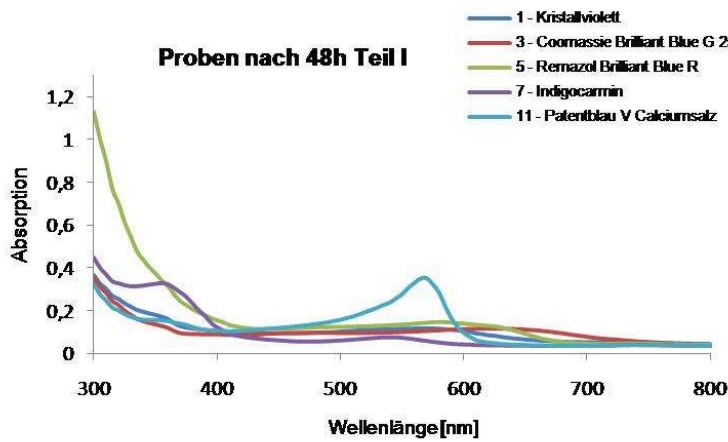


Abbildung 19: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h mit *HRP*

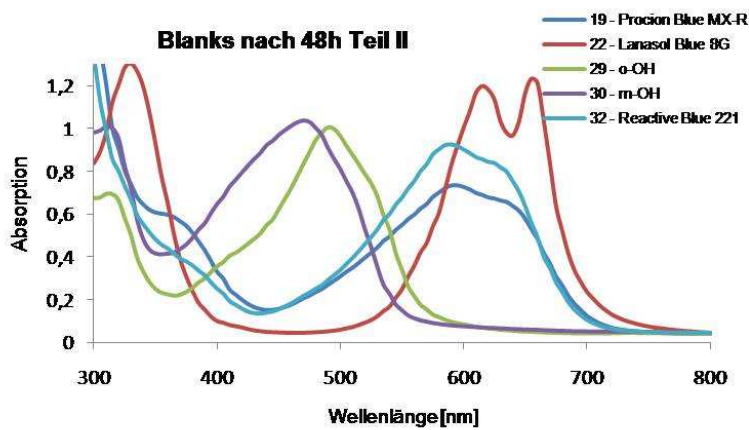


Abbildung 20: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h (Blank)



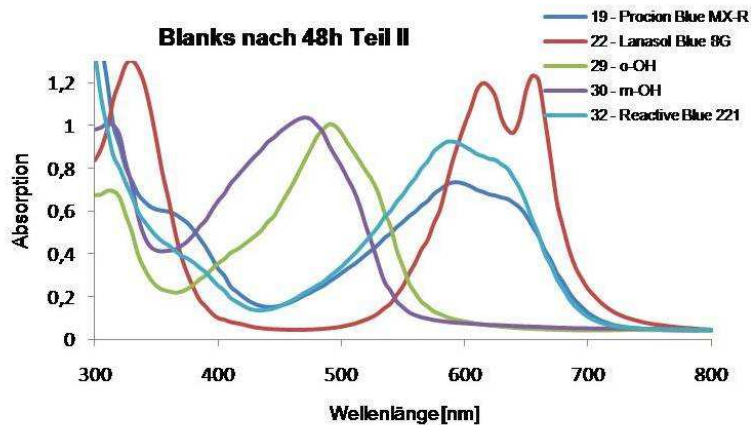


Abbildung 21: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h mit *HRP*

### 3.3.1.3 Durchführung mit Myeloperoxidase

Aufgrund der Tatsache, dass das Enzym MPO teuer ist und nur in begrenzten Mengen zur Verfügung stand, wurde das Screening in einer Mikrotiterplatte mit je 300  $\mu$ l Gesamtreaktionsvolumen durchgeführt. Insgesamt wurden neun Vorversuche gemacht, um herauszufinden, unter welchen Bedingungen (Konzentration an  $H_2O_2$ , Enzymaktivität...) die MPO am effektivsten arbeitet.

#### Vorversuch 1

	1	2	3	5	6	7
Blank						
Blank + $H_2O_2$						
Probe						

Abbildung 22: Inkubation unterschiedlicher Farbstoffe mit MPO (Vorversuch 1)

Das Ergebnis von Vorversuch 1 war leider nicht zufrieden stellend, weil sich bei keinem der sieben Substrate eine Farbänderung bzw. eine Entfärbung gezeigt hat. Ausgehend von der Annahme, dass es sich bei den verwendeten Farben vielleicht nicht um MPO Substrate handelt, wurden in einem zweiten Test nur Farbstoffe verwendet, die bei dem Screening mit TveL und HRP sehr gute Ergebnisse geliefert haben.

Vorversuch 2

	5	14	22	29	32
Blank					
Blank + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					
Probe					

**Abbildung 23: Inkubation unterschiedlicher Farbstoffe mit MPO (Vorversuch 2)**

Für den zweiten Vorversuch wurden fünf Farbstoffe gewählt, die mit TveL und HRP einen Farbumschlag binnen weniger Minuten ergeben haben. Leider war aber das Ergebnis bei der Umsetzung mit MPO wenig zufrieden stellend. Aus diesem Grund wurde das Experiment mit der gleichen Aktivität an HRP noch einmal wiederholt, um festzustellen, ob es sich vielleicht um eine zu niedrig eingesetzte Enzymkonzentration handeln könnte.

Vorversuch 3

	5	14	22	29	32
Blank					
Blank + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					
Probe					































**Abbildung 24: Inkubation unterschiedlicher Farbstoffe mit MPO (Vorversuch 3)**

Für den Vergleich mit HRP wurden die gleichen Substrate und die gleiche Enzymaktivität verwendet wie bei Vorversuch 2. Ziel war es herauszufinden, ob die Reaktion auch mit dem wenig konzentrierten Enzym stattfinden kann. Leider konnte aber bei diesem Versuch der erwartete Farbumschlag nicht detektiert werden. Dies gab Grund zu der Annahme, dass für eine sichtbare Farbreaktion höher konzentriertes Enzym von HRP – und somit auch von MPO – eingesetzt werden muss.

Vorversuch 4

Für den Vergleich mit Laccase wurden die gleichen Substrate und die gleiche Enzymaktivität verwendet, wie bei Vorversuch 2. Ziel war es herauszufinden, ob der Umsatz auch ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stattfinden kann. Von diesem Test sind keine Bilder vorhanden, die Durchführung hat jedoch gut funktioniert.

Vorversuch 5

	5	14	22	29	32
Blank					
Blank + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					
+ 30 µl HRP					
+ 40 µl HRP					
+ 60 µl HRP					
+ 100 µl HRP					



















**Abbildung 25: Inkubation unterschiedlicher Farbstoffe mit MPO (Vorversuch 5)**

In Vorversuch 5 wurde getestet, welche Menge vom Enzym HRP mit einer Aktivität von  $15 \text{ U ml}^{-1}$  zugegeben werden muss, damit eine Umsetzung stattfinden kann. Aus Abbildung 25 ist ersichtlich, dass der Farbumschlag bei Zugabe von  $30 \mu\text{l}$  Enzym bereits leicht sichtbar und bei Zugabe von  $100 \mu\text{l}$  Enzym deutlich erkennbar ist.

Vorversuch 6 und 7

Für diese Vorversuche wurden wiederum nur die fünf gut funktionierenden Substrate 5, 14, 22, 29, und 32 verwendet. Die MPO wurde auf  $150 \text{ U ml}^{-1}$  verdünnt, wovon  $1 \times 50 \mu\text{l}$  und  $1 \times 100 \mu\text{l}$  verwendet wurden. Bei der Auswertung ist nur beim Einsatz von  $100 \mu\text{l}$  Enzym eine Absorptionsabnahme ersichtlich. Für das Screening wurden daher  $100 \mu\text{l}$  MPO mit einer Aktivität von  $150 \text{ U ml}^{-1}$  eingesetzt.







Vorversuch 8

	1	2	3	5	6	7
Blank						
Blank + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>						
Probe						

**Abbildung 26: Inkubation unterschiedlicher Farbstoffe mit MPO (Vorversuch 8)**

Da nun bekannt war, in welcher Menge und mit welcher Aktivität das Enzym MPO zugegeben werden muss, konnte der Vorversuch 1 mit der nun optimierten Methode wiederholt werden. Die Tatsache, dass sich in Abbildung 26 aber bei den Substraten 1 und 2 sowohl die Proben, als auch die Blanks farblich verändert haben, lässt darauf schließen, dass zu viel Wasserstoffperoxid eingesetzt wurde. Eine neue Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde daher berechnet und der Test wurde in Vorversuch 9 mit den Farbstoffen 1 und 2 wiederholt.

Versuch 9



































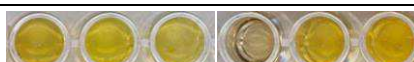

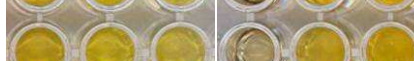

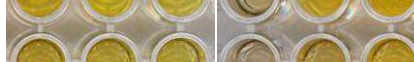



	1	2
Blank		
Blank + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
Probe		

**Abbildung 27: Inkubation unterschiedlicher Farbstoffe mit MPO (Vorversuch 9)**

Abbildung 27 zeigt, dass sich der Blank mit weniger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dieses Mal nicht verfärbt hat. Für die Hauptversuche mit dem Enzym MPO wurde daher mit der geringeren Konzentration an Wasserstoffperoxid gearbeitet.

Hauptversuche

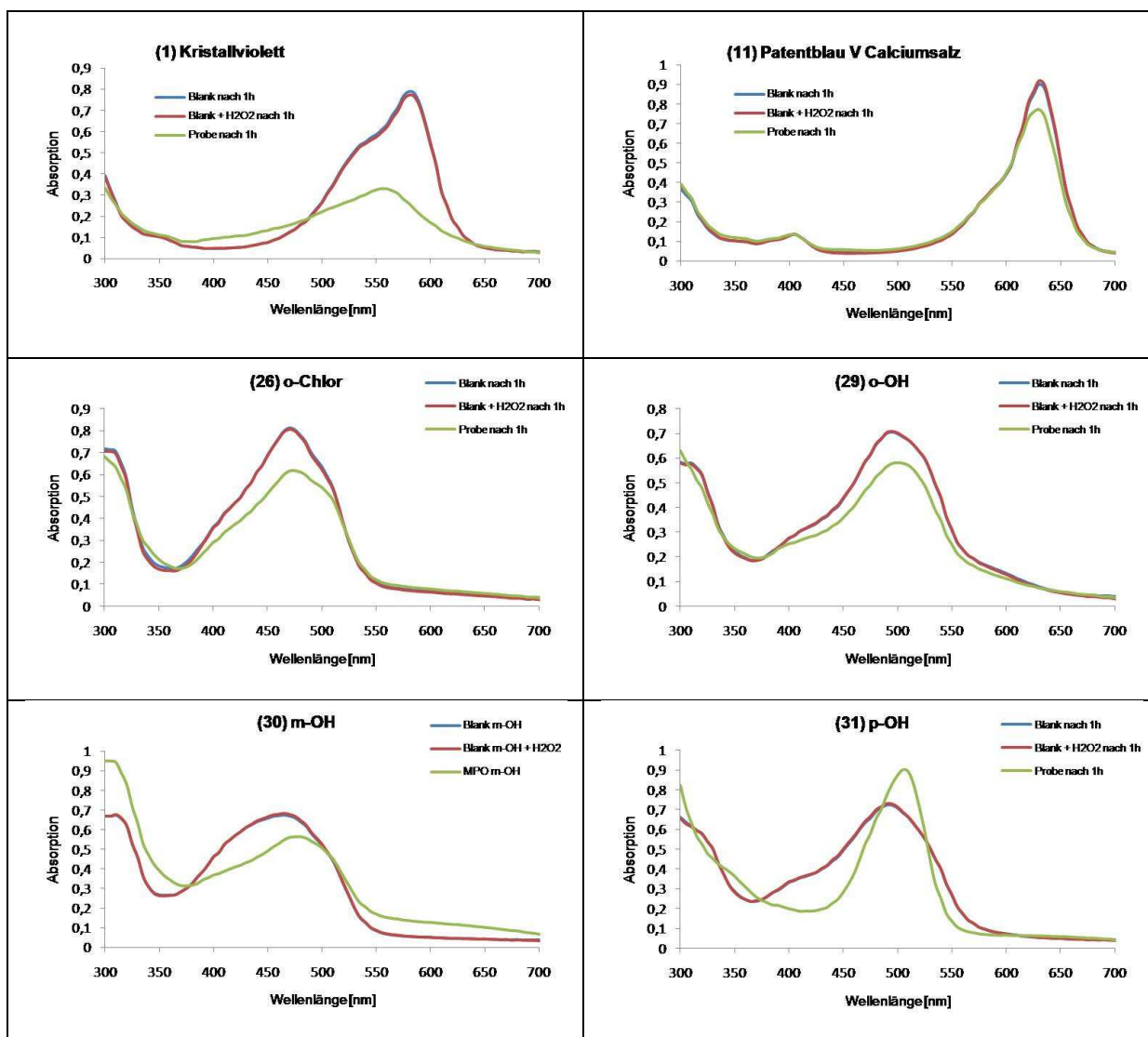
Für die Hauptversuche mit MPO wurden einige der Farbstoffe ausgewählt, die beim Screening sowohl mit dem Enzym TveL, als auch mit dem Enzym HRP gute Farbreaktionen ergeben haben. Farbstoff 2 hat zwar bei den Screenings nicht funktioniert, wurde aber dennoch untersucht, aufgrund der ähnlichen Molekülstruktur mit Farbstoff 1. Es handelte sich bei den getesteten Substanzen um die Nummern 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 15, 19 und 21. Weiters wurden alle systematisch substituierten Farbstoffe 26 – 44 (mit Ausnahme von Farbstoff 32) hinsichtlich ihrer Reaktionsfähigkeit mit MPO getestet. In Abbildung 28 sind alle durchgeführten Tests mit MPO dargestellt.

	1	2	3	5	6	7		9	11	15	19	21	
Blank							Blank						
Blank + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>							Blank + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>						
Probe							Probe						
	26	27	28	29	30	31		33	34	35	36	37	38
Blank							Blank						
Blank + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>							Blank + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>						
Probe							Probe						
	39	40	41	42	43	44							
Blank													
Blank + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>													
Probe													

**Abbildung 28: Umsetzung unterschiedlicher Farbstoffe mittels MPO**

Die Farbstoffe 40 und 41 mit methylierter metha- und para- Position haben nach einer Stunde einen Niederschlag gebildet, was eine Aufnahme des Absorptionsspektrums nicht möglich machte. Ebenso war der Farbstoff 36 mit ortho- substituiertem Fluor für eine Auswertung nicht gut geeignet, weil das Absorptionsspektrum keinen auswertbaren Peak aufwies.

Beim Screening mit MPO ließ sich optisch nur bei Farbstoff 1 ein eindeutiger Farbunterschied feststellen. Deutliche Differenzen im Absorptionsspektrum konnten allerdings bei den Farbstoffen 1, 11, 26, 29, 30, 31, 38 und 44 gemessenen werden. Die aufgenommenen Wellenlängenscans der acht Farbstoffe finden sich in nachfolgenden Abbildungen:



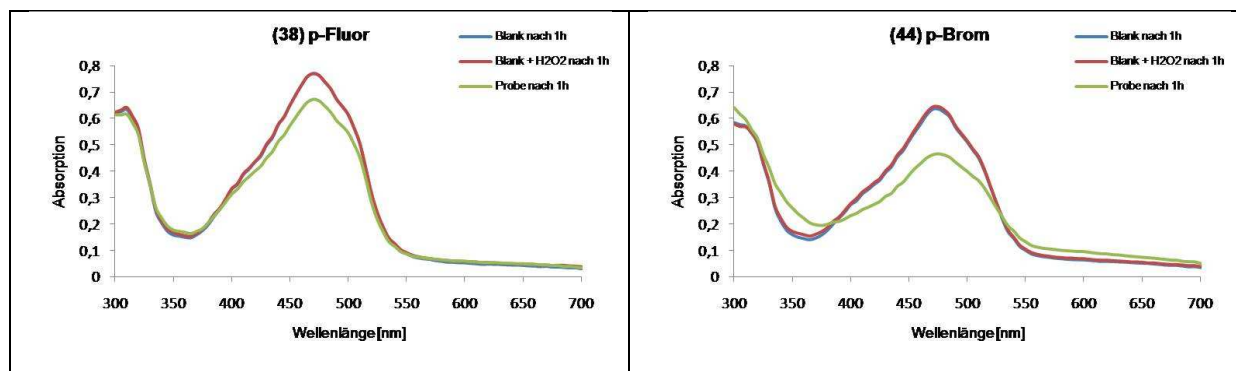


Abbildung 29: Absorptionsspektren der acht am besten funktionierenden Farbstoffe nach einer Stunde Umsatz mit dem Enzym MPO

Auffällig war, dass bei den Versuchen mit dem Enzym MPO hauptsächlich diejenigen Farbstoffe gut funktioniert haben, die das in Abbildung 30 stehende Molekül als Grundgerüst gemeinsam hatten. Diese Farbstoffe wiesen systematisch substituierte, funktionelle Gruppen in ortho-, meta- und para-Position am Benzolring auf, wobei bei den Tests mit MPO die para-substituierten Moleküle die größten Farbdifferenzen zeigten, gefolgt von den ortho-substituierten Stoffen. Bei den meta-substituierten Farbstoffen konnte nur bei der Hydroxygruppe eine Änderung im Absorptionsspektrum nachgewiesen werden, bei allen anderen Substituenten war in meta-Position keine Reaktion zu erkennen.

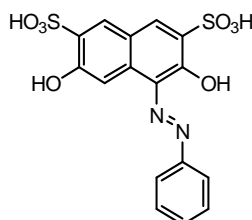
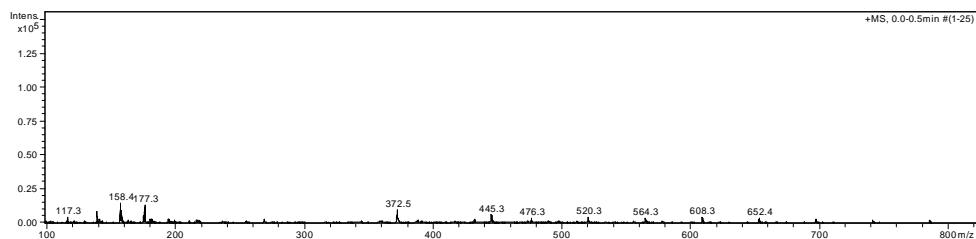


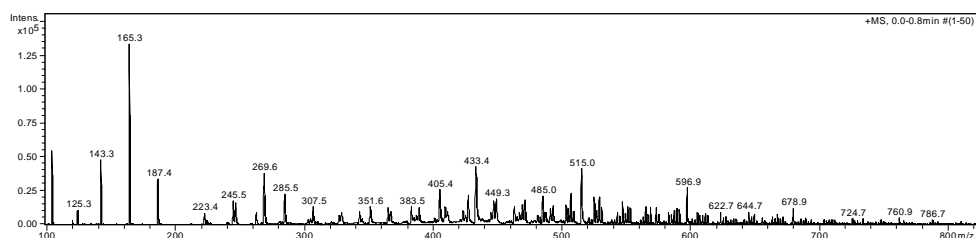
Abbildung 30: Grundgerüst der Farbstoffe 26 – 44 (mit Ausnahme von Farbstoff 32)

### 3.3.2 Messungen der Abbauprodukte von Kristallviolett mit der HPLC-MS

Die Farbreaktionen haben bei allen durchgeführten Enzymtests mit dem Farbstoff Kristallviolett am besten funktioniert. Aus diesem Grund wurde der Beschluss gefasst, die mit MPO enzymatisch behandelte Farblösung in das Massenspektrometer zu injizieren und die Spaltprodukte zu analysieren. Das Spektrum für den Blank ist in Abbildung 31 ersichtlich, das Spektrum für die enzymatisch behandelte Farbstofflösung ist in Abbildung 32 zu sehen.

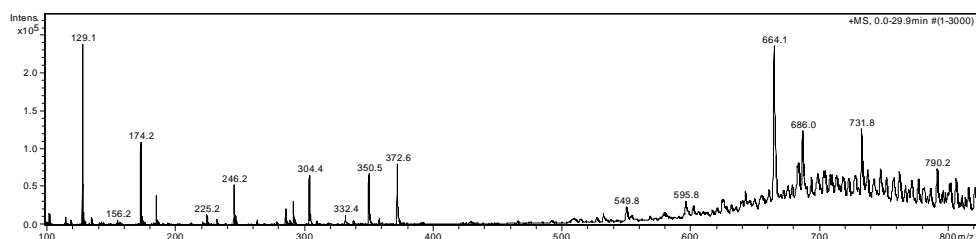


**Abbildung 31: Massenspektrum von Kristallviolett (Blank)**

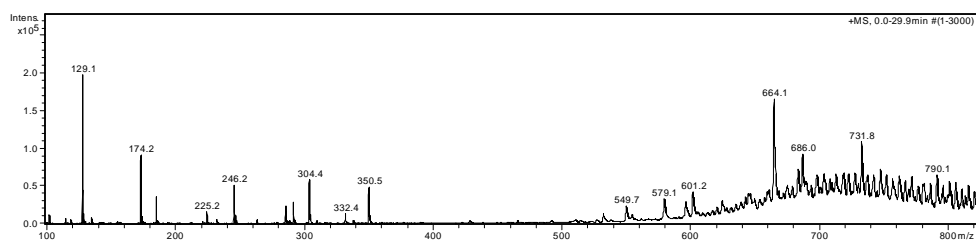


**Abbildung 32: Massenspektrum von Kristallviolett nach enzymatischer Behandlung mit MPO (Probe)**

Der charakteristische Peak von Kristallviolett mit einem Masse/Ladungs-Verhältnis von 372,5 ist beim Blank in Abbildung 31 gut ersichtlich, wohingegen der Farbstoff in Abbildung 32 nach einer Reaktionszeit von zwei Tagen nicht mehr detektiert werden konnte. Es ist offensichtlich, dass das Kristallviolett durch die enzymatische Behandlung abgebaut wurde. Um Zwischenprodukte von der Reaktion zu erhalten, wurde ein neuer Versuch gestartet, mit exakt den gleichen Reaktionsbedingungen, allerdings wurde die Reaktion nach einer Stunde, nach sechs Stunden und nach 24 Stunden gestoppt, indem die Proben auf  $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt wurden. Am nächsten Tag konnten die Farblösungen mit dem Massenspektrometer gemessen werden. Die Ergebnisse der Messungen nach 6h und 24h Reaktionszeit sind den nachfolgenden Abbildungen zu entnehmen:



**Abbildung 33: Massenspektrum von Kristallviolett (Blank nach 6h)**



**Abbildung 34: Massenspektrum von Kristallviolett nach enzymatischer Behandlung mit MPO (Probe nach 6h)**

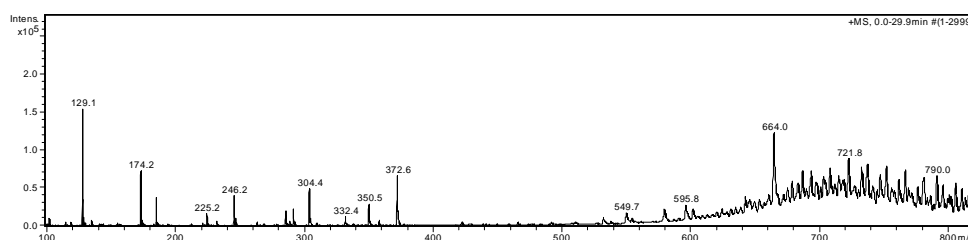


Abbildung 35: Massenspektrum von Kristallviolett nach (Blank nach 24h)

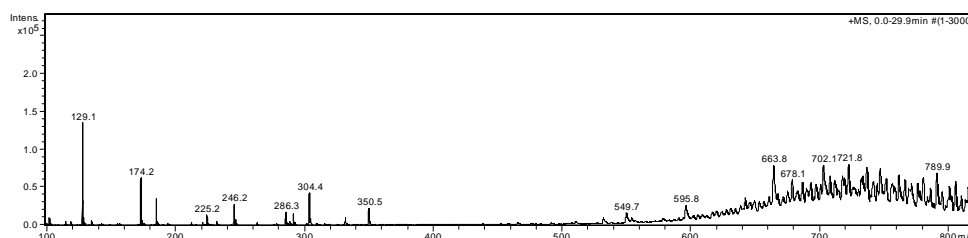


Abbildung 36: Massenspektrum von Kristallviolett nach enzymatischer Behandlung mit MPO (Probe nach 24h)

Kristallviolett zählt zu den Triphenylmethanfarbstoffen. Für den Abbau dieser Klasse von Farbstoffen mittels Laccasen gibt es Literaturhinweise, allerdings ist dieses Substrat und die Umsetzung mit MPO noch nicht beschrieben. Es konnte dabei beobachtet werden, dass durch die Enzymeinwirkung alle Methylgruppen vom Molekülgerüst nach der Reihe abgespalten werden, im späteren Reaktionsverlauf kommt es auch zur Abspaltung der Aminogruppen. Für Kristallviolett würden sich hierfür folgende Massen/Ladungs-Verhältnisse ergeben:

Tabelle 35: Massen/Ladungs-Verhältnisse von demethyliertem und deaminiertem Kristallviolett

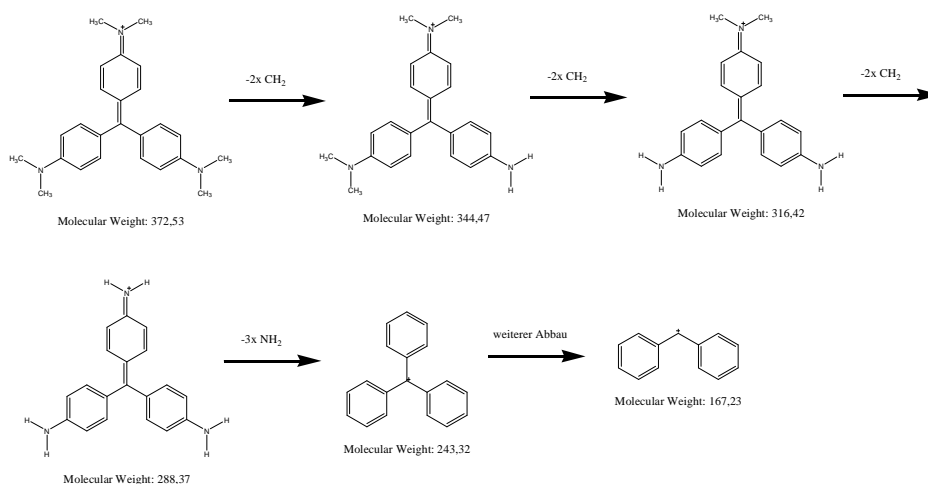
Abgespaltene Gruppen	Masse/Ladungs-Verhältnis
- 1x CH <sub>2</sub>	358-360
- 2x CH <sub>2</sub>	344-346
- 3x CH <sub>2</sub>	330-332
- 4x CH <sub>2</sub>	316-318
- 5x CH <sub>2</sub>	302-304
- 6x CH <sub>2</sub>	288-290
- 1x NH	273-275
- 2x NH	258-260
- 3x NH	243-245

In den Abbildungen 33 und 35 sind die Blanks nach 6h und 24h dargestellt. Wie erwartet ist bei beiden Spektren der charakteristische Peak des Farbstoffes Kristallviolett mit einem Masse/Ladungs-Verhältnis von 372,6 noch vorhanden und deutlich zu erkennen. Im Gegensatz dazu sind in den Abbildungen 34 und 36 die Spektren der enzymatisch behandelten Lösungen zu sehen, die den



charakteristischen Peak bei 372,6 nicht mehr aufweisen, was auf einen vollständigen Abbau des Farbstoffes hindeutet.

Bei genauerer Betrachtung ist erkennbar, dass das Spektrum in Abbildung 34 – nach 6h enzymatischer Behandlung mit MPO – einen kleinen Peak beim Masse/Ladungs-Verhältnis 332,4 aufweist, was auf ein demethyliertes und deaminiertes Molekül hinweist. In Abbildung 36 ist dieser Peak nicht mehr ersichtlich, was auf einen weiteren Abbau schließen lässt.



**Abbildung 37: Möglicher Abbauweg von Kristallviolett mit MPO**

### 3.3.3 Immobilisierung der Farbstoffe

Bei der Optimierung der Färbemethode konnte festgestellt werden, dass das Färben von normalem Druckerpapier und Overheadfolie aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit nicht gut funktioniert hat. Für weitere Testreihen wurde daher nur noch mit Whatman Filtern gearbeitet.

Beim Immobilisieren des Farbstoffes Reactive Blue 221 wurde zunächst getestet, mit welcher Farbstoffkonzentration das Färben am besten funktioniert. Es stellte sich heraus, dass eine Konzentration von 50 mg l<sup>-1</sup> eine nicht sehr intensive Blaufärbung ergab und eine Konzentration von 150 mg l<sup>-1</sup> zu stark blau färbte. Aus diesem Grund wurde der Mittelweg gewählt und das Färben weiterer Proben erfolgte für 10 min. bei einer Konzentration von 100 mg l<sup>-1</sup>. In Tabelle 36 sind die gemessenen  $\Delta E$ -Werte zwischen Blank und Probe für die unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen in Lösung mit 50 mg l<sup>-1</sup> und 150 mg l<sup>-1</sup> nach Behandlung mit ThL angeführt.

**Tabelle 36:  $\Delta E$ -Werte der unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen**

Probe	$\Delta E$ I	$\Delta E$ II	$\Delta E$ Durchschnitt
RB 221 50 mg l <sup>-1</sup>	5,53	8,39	6,95
RB 221 150 mg l <sup>-1</sup>	9,50	14,14	11,72

Danach wurde getestet, ob das Waschen mit Wasser bei Raumtemperatur oder das Waschen mit 60 °C warmem Wasser besser geeignet ist. Hierzu fand zunächst die Immobilisierung des Farbstoffes mit einer Farbstoffkonzentration von 100 mg l<sup>-1</sup> statt. Dann erfolgte das Waschen bei unterschiedlichen Temperaturen mit anschließendem Trocknen über Nacht.

Zum Abbau des aufgebracht Farbstoffes konnte das Papier am nächsten Tag wiederum in Enzymlösung mit Laccase getaucht werden. Nach erneutem Waschen und Trocknen wurden die Messungen mit dem Farbmessgerät durchgeführt. Tabelle 37 zeigt die gemessenen  $\Delta E$ -Werte zwischen Blank und Probe für das Waschen mit dH<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur und bei 60 °C. Da beim Messen kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Methoden festgestellt werden konnte, wurde das Waschen mit Wasser bei Raumtemperatur bevorzugt.

**Tabelle 37:  $\Delta E$ -Werte der unterschiedlichen Waschtemperaturen**

Probe	$\Delta E$ I	$\Delta E$ II	$\Delta E$ Durchschnitt
RB 221 100 mg l <sup>-1</sup> RT	11,98	8,57	10,53
RB 221 100 mg l <sup>-1</sup> 60 °C	9,23	9,33	9,57

Nachdem nun die optimale Färbemethode mit einer Farbstoffkonzentration von 100 mg l<sup>-1</sup> für 10 min. und anschließendem Waschen für 30 min. mit dH<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur gefunden war, konnten nun die richtigen Experimente gestartet werden. Mit der soeben beschriebenen Methode wurden Whatman Filter mit Reactive Blue 221 und Kristallviolett gefärbt, die wie im folgenden Kapitel beschrieben mit Laccase wieder entfärbt wurden.

### 3.3.4 Abbau der immobilisierten Farbstoffe mit Laccase von *T. hirsuta*

Für Reactive Blue 221 wurden Enzymlösungen mit 100  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, 1 ml und 3 ml ThL in 30 ml Natriumacetat Puffer hergestellt. Nach der Reaktionszeit von 24 Stunden wurden die Proben gewaschen, getrocknet und die Farbdifferenzen gemessen. Die L\*a\*b und  $\Delta E$ -Werte für den Abbau des Farbstoffes Reactive Blue 221 mit verschiedenen Laccase Konzentrationen sind in Tabelle 38 ersichtlich.

**Tabelle 38:  $\Delta E$ -Werte nach dem Abbau des immobilisierten Farbstoffes Reactive Blue 221 mit unterschiedlichen Konzentrationen der ThL**

	L	a	b	$\Delta E$	
Blank	74,42	-4,35	-31,66	-	
100 $\mu$ l	80,35	-5,95	-26,33	8,13	
500 $\mu$ l	81,45	-6,33	-23,32	11,09	
1 ml	81,75	-6,72	-21,81	12,50	
3 ml	82,78	-6,51	-16,6	17,36	

Für Kristallviolett wurden Enzymlösungen mit 100  $\mu$ l, 500  $\mu$ l und 1 ml ThL in 30 ml Natriumacetat Puffer hergestellt. Nach 24 Stunden wurden die Proben wiederum gewaschen, getrocknet und mit dem Farbmessgerät gemessen. Sowohl die  $L^*a^*b$  Werte, als auch die  $\Delta E$ -Werte sind in Tabelle 39 dargestellt.

**Tabelle 39:  $\Delta E$ -Werte nach dem Abbau des immobilisierten Farbstoffes Kristallviolett mit unterschiedlichen Konzentrationen der ThL**

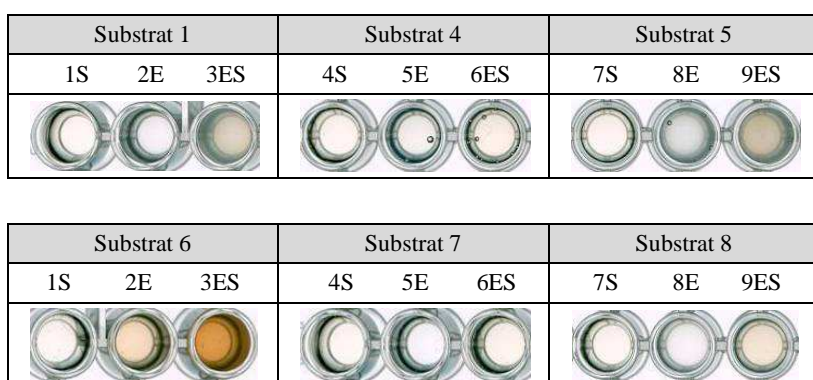
	L	a	b	$\Delta E$	
Blank	48,18	26,34	-52,71	-	
100 $\mu$ l	46,70	28,36	-51,26	2,89	
500 $\mu$ l	47,22	28,55	-47,81	5,46	
1 ml	53,42	24,63	-40,90	13,03	

## 3.4 Modifizierte Siloxane

### 3.4.1 Modifizierte Siloxane I

Im ersten Teil der Experimente mit modifizierten Siloxanen wurden von der Firma Profactor acht Substrate zur Verfügung gestellt, die teils in fester, teils in flüssiger Form vorlagen. Die Substrate 2 und 3 lösten sich in DMSO leider nicht und wurden daher nicht getestet. Mit den restlichen sechs Substanzen wurde versucht, einen gut sichtbaren Farbumschlag in flüssigem Zustand zu erreichen.

#### 3.4.1.1 Assay mit Laccase von *T. hirsuta*

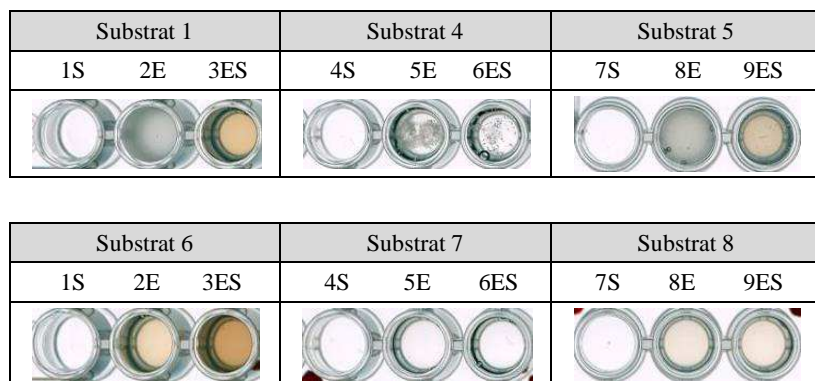


**Abbildung 38: Umsetzung der modifizierten Siloxane I mit Laccase von *T. hirsuta* (S: Substrat, E: Enzym, ES: Enzym und Substrat)**

Es wurde von den verwendeten Substraten 1, 4, 5, 6, 7 und 8 eine dreifach Bestimmung durchgeführt, wobei in Abbildung 38 nur jeweils eine Einzelbestimmung zu sehen ist. Die Reihen 1, 4 und 7 zeigen den Blank mit Substrat, in den Reihen 2, 5 und 8 sind die Blanks mit Enzym zu sehen und in den Reihen 3, 6 und 9 sind die Reaktionen von Substrat mit Enzym abgebildet.

Bei den Substraten 1 und 5 erfolgte eine Trübung bei Zugabe des Enzyms zum Substrat. Substrat 8 konnte eine leichte Verfärbung aufweisen und bei Substrat 6 konnte ein eindeutiger Farbumschlag nachgewiesen werden.

### 3.4.1.2 Assay mit Horseradish Peroxidase



**Abbildung 39: Umsetzung der modifizierten Siloxane I mit Horseradish Peroxidase (S: Substrat, E: Enzym, ES: Enzym und Substrat)**

Es wurde von den getesteten Substraten 1, 4, 5, 6, 7 und 8 eine dreifach Bestimmung durchgeführt, wobei in Abbildung 39 nur jeweils eine Einzelbestimmung zu sehen ist. Die Reihen 1, 4 und 7 zeigen den Blank mit Substrat, in den Reihen 2, 5 und 8 sind die Blanks mit Enzym zu sehen und in den Reihen 3, 6 und 9 sind die Reaktionen von Substrat und Enzym abgebildet.

Bei den Substraten 1 und 5 erfolgte wie schon beim Versuch mit der Laccase von *T. hirsuta* eine Trübung bei Zugabe des Enzyms. Substrat 4 bildete einen Niederschlag. Bei Substrat 8 konnte wiederum eine leichte, bei Substrat 6 eine eindeutige Farbänderung nachgewiesen werden.

### 3.4.1.3 Weitere Tests

In weiteren Tests wurde versucht, das Ausfallen und Trübwerden der Proben zu vermeiden und eine Farbreaktion zu erzielen. Hierfür wurden die Parameter hinsichtlich Puffer, Ethanolkonzentration und Acetonitrilkonzentration variiert. Auch der Versuch, die Reaktionen durch Zugabe eines Mediators zu beschleunigen wurde unternommen, hatte auf die Reaktionsgeschwindigkeiten jedoch keinen sichtbaren Einfluss. Da alle durchgeführten Reaktionsbedingungen nicht die gewünschten, schnellen Farbänderungen erzielen konnten, schien eine Auswertung der aufgenommenen Spektren auch nicht sinnvoll.

## 3.4.2 Modifizierte Siloxane II

Im zweiten Teil der Experimente mit modifizierten Siloxanen wurden fünf Substrate auf ihre Umsetzung mit Laccase zunächst in flüssigem Zustand, danach immobilisiert auf DC-Platten getestet. Die Substrate 1, 6 und 2 aus dem ersten Teil wurden erneut synthetisiert und getestet, zwei neue Stoffe

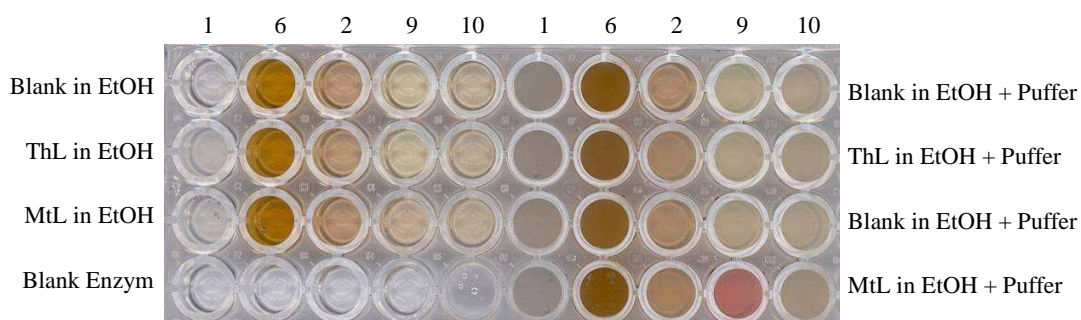
kamen hinzu. Alle fünf Substanzen lagen in ethanolischer Lösung vor, was die Handhabung erheblich erleichterte.

### 3.4.2.1 Reaktionsansatz in UV-Küvetten

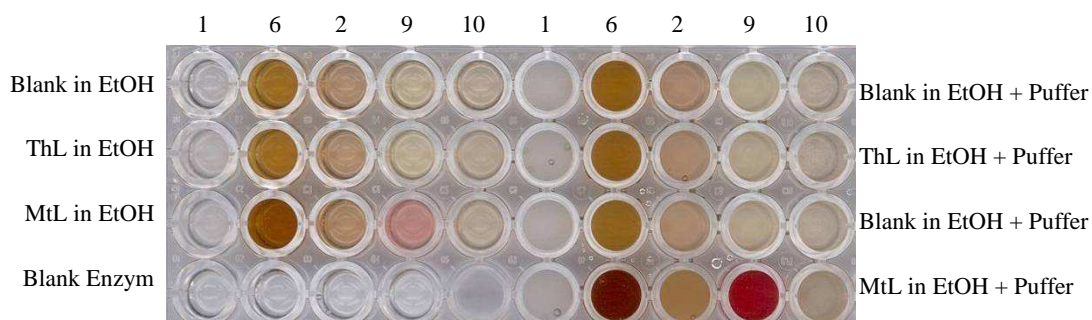
Der Reaktionsansatz der neu synthetisierten modifizierten Siloxane II in ethanolischer Lösung mit den Enzymen ThL und MtL wurde zunächst in UV-Küvetten zusammen pipettiert. Die Absorptionsspektren wurden mit dem Photospektrometer von 250 – 350 nm aufgenommen. Die Diagramme wiesen jedoch keine auswertbaren Peaks auf, da die Substrate im UV-Bereich offensichtlich nicht absorbieren. Der Farbumschlag war bei zwei Substraten aber deutlich zu erkennen, weshalb die Reaktion unter den gleichen Bedingungen in kleinerem Maßstab in einer Mikrotiterplatte wiederholt wurde.

### 3.4.2.2 Reaktionsansatz in UV-Mikrotiterplatten

Abbildung 40 zeigt die Farbreaktionen der modifizierten Siloxane unmittelbar nach Zugabe der Enzyme. In Abbildung 41 ist die Umsetzung der Substrate mit den Enzymen nach sechs Stunden sichtbar.



**Abbildung 40: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen II in ethanolischer Lösung in UV-Mikrotiterplatte gleich nach Zugabe des Enzyms**



**Abbildung 41: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen II in ethanolischer Lösung in UV-Mikrotiterplatte nach sechs Stunden**

Für die Substanzen 6, 2 und 9 war beim Einsatz von EtOH + Puffer mit MtL ein deutlicher Farbunterschied zu erkennen und es wurde ein Wellenlängenscan von 300 – 700 nm mit dem Plate-Reader durchgeführt (Abbildungen 42 und 43). Bei allen drei Proben ist trotz der Trübung gut zu erkennen, dass sich die Absorptionsspektren nach sechs Stunden Reaktionszeit deutlich unterscheiden. Die Absorption hat bei Probe 6 stark zugenommen, ebenso bei Probe 2. Auch bei Probe 9 macht sich die Farbänderung bemerkbar, indem der Peak zu einem Absorptionsmaximum von 520 nm verschoben wurde.

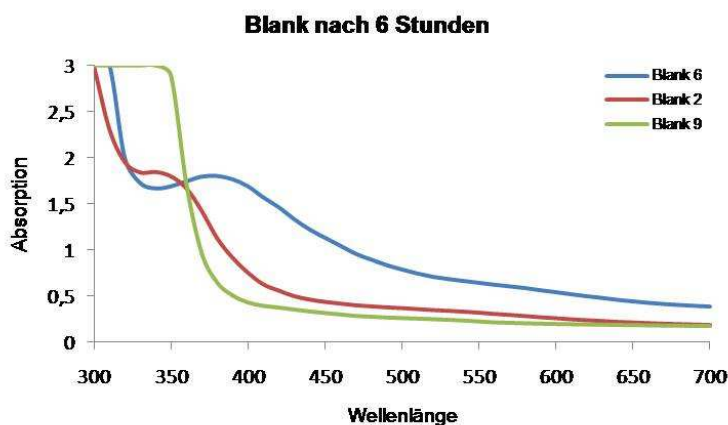


Abbildung 42: Absorptionsspektren der Substrate 6, 2 und 9 in EtOH + Puffer zum Zeitpunkt 0

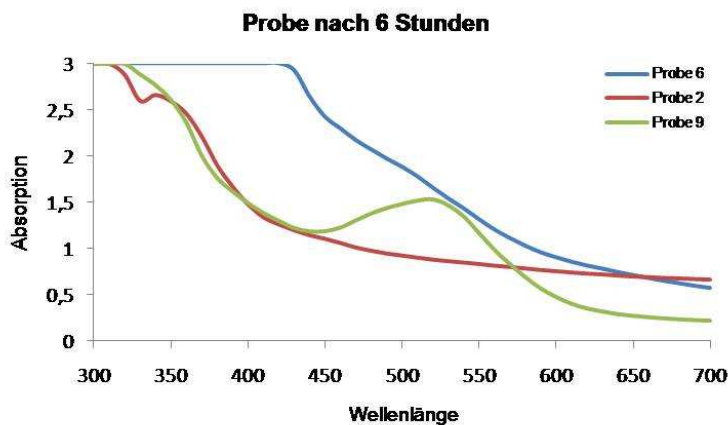


Abbildung 43: Absorptionsspektren der Substrate 6, 2 und 9 in EtOH + Puffer nach sechs Stunden

### 3.4.2.3 Immobilisierung auf Kieselgel-Platten

Für die Immobilisierung der in Ethanol gelösten Substrate kamen handelsübliche DC-Platten zum Einsatz, wobei das Kieselgel auf ein geeignetes Trägermaterial (Aluminium) aufgebracht worden ist. Freie OH-Gruppen an der Oberfläche machen das Silicagel polar und binden bevorzugt polare Moleküle mittels Wasserstoffbrückenbindungen.

### 3.4.2.3.1 Abbau der immobilisierten Substrate mit Hilfe der Enzyme ThL, MtL und TviL

#### Versuch I

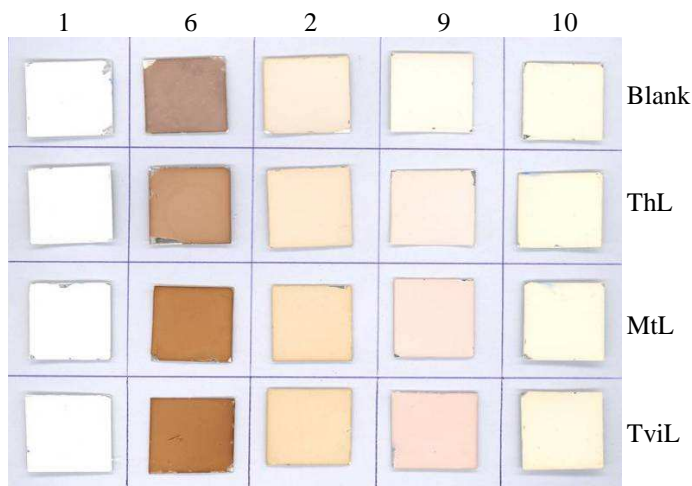


Abbildung 44: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen II auf DC-Platten mit den Enzymen ThL, MtL und TviL nach Trocknen bei Raumtemperatur

Tabelle 40: Gemessene  $\Delta E$ -Werte nach Trocknen bei Raumtemperatur

	ThL	MtL	TviL
Substrat 1	1,20	0,26	1,15
Substrat 6	9,93	20,36	20,18
Substrat 2	3,88	10,52	12,28
Substrat 9	9,78	13,54	12,29
Substrat 10	2,78	3,51	4,57

Alle immobilisierten Substrate wiesen nach dem Trocknen bei Raumtemperatur das gleiche Verhaltensmuster auf, wie bei den Versuchen in flüssigem Zustand in der UV-Mikrotiterplatte. Die Substanzen 1 und 10 zeigten im immobilisierten Zustand keinerlei Reaktion. Lediglich bei Substrat 2 waren bei Behandlung mit MtL und TviL erhöhte  $\Delta E$ -Werte zu messen. Im Gegensatz dazu konnte man bei den Substraten 6 und 9 bei allen drei enzymatischen Umsetzungen eindeutig einen Farbumschlag erkennen. Tabelle 40 gibt die gemessenen  $\Delta E$ -Werte zwischen den Blanks und den jeweiligen Proben mit ThL, MtL und TviL an. Bei den Substraten 6 und 2 erstrecken sich die  $\Delta E$ -Werte zwischen 9 und 21, was auf eine eindeutige Farbänderung hinweist.



Versuch II

**Abbildung 45: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen II auf DC-Platten mit den Enzymen ThL, MtL und TviL nach Trocknen im Trockenschrank**

**Tabelle 41: Gemessene  $\Delta E$ -Werte nach Trocknen im Trockenschrank**

	ThL	MtL	TviL
Substrat 1	2,03	1,73	2,32
Substrat 6	4,89	11,80	11,20
Substrat 2	5,30	10,77	12,87
Substrat 9	4,68	8,91	8,69
Substrat 10	0,62	2,68	1,95

Die gemessenen  $\Delta E$ -Werte zwischen den jeweiligen Blanks und den behandelten Proben mit Enzym wiesen nach dem Trocknen im Trockenschrank eine nicht so große Differenz auf, wie nach dem Trocknen bei Raumtemperatur. Dennoch waren die Unterschiede in den Zahlenwerten groß genug, um von einer Farbänderung sprechen zu können. Da diese Trocknungsmethode bei erhöhten Temperaturen bereits wissenschaftliche Anwendung gefunden hat und man nachweisen konnte, dass durch Trocknen bzw. Aushärten und Abspaltung von  $H_2O$  eine kovalente Bindung zwischen dem Kieselgel und den Substraten entsteht, wurde für weitere Tests auf diese Trocknungsmethode zurückgegriffen.

Auch bei dieser Trocknungsmethode kann gesagt werden, dass mit den Substraten 1 und 10 kein Umsatz erzielt werden konnte, weil keine sichtbaren Farbänderungen zu sehen waren und keine großen  $\Delta E$ -Werte gemessen wurden. Die Substanzen 6 und 9 lieferten ebenfalls wieder gute Resultate, die größte Farbdifferenz war jedoch bei Substrat 2 zu beobachten. Bei der Messung mit dem Farbmessgerät konnten hier die größten  $\Delta E$ -Werte festgestellt werden.

Versuch III

**Abbildung 46: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen II auf DC-Platten mit den Enzymen ThL, MtL und TviL nach Trocknen im Exsikkator**

**Tabelle 42: Gemessene  $\Delta E$ -Werte nach Trocknen im Exsikkator**

	ThL	MtL	TviL
Substrat 1	0,84	0,31	0,42
Substrat 6	8,46	14,17	17,72
Substrat 2	1,12	1,38	1,08
Substrat 9	6,90	11,24	10,71
Substrat 10	4,32	9,75	10,57

Bei der Trocknung im Exsikkator sind die Unterschiede der  $\Delta E$ -Werte tendenziell größer ausgefallen, als beim Trocknen im Trockenschrank, wobei aber nicht für eine kovalente Bindung zwischen dem Kieselgel und dem Substrat garantiert werden kann. Auch in diesem Fall war bei Substrat 1 keine Reaktion sichtbar, bei den Stoffen 6 und 9 hingegen konnten wieder Farbreaktionen mit hohen  $\Delta E$ -Werten nachgewiesen werden. Auffällig war, dass im Gegensatz zu den anderen beiden Methoden Substrat 2 diesmal fast keine Reaktion zeigte und Substrat 10 sehr große Unterschiede in den Zahlenwerten aufweisen konnte.

#### **3.4.2.3.2 Abbau des immobilisierten Substrats 9 mit Hilfe der Myeloperoxidase**

Um Substrat 9 – mit dem Ausgangsstoff Sinapinsäure – kovalent auf Kieselgel-Platten zu binden, wurde das Trocknen im Trockenschrank angewandt. Für das richtige Verhältnis von Wasserstoffperoxid zu Enzymlösung wurde für den Abbau der immobilisierten Sinapinsäure auf die Kriterien der Tests mit den Reaktivfarbstoffen zurückgegriffen. Der Versuch wurde nach fünf Tagen beendet, die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle dargestellt:

**Tabelle 43: Abbau des immobilisierten Substrats 9 mit Hilfe der Myeloperoxidase nach 1, 3 und 5 Tagen**

Blank	Probe
Tag 1	
Tag 3	
Tag 5	

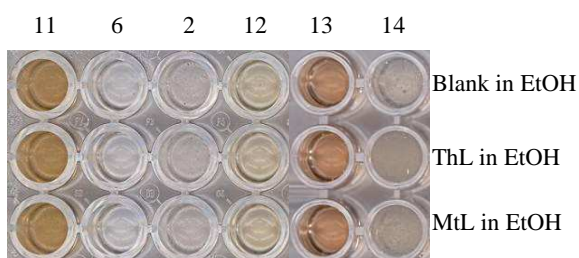
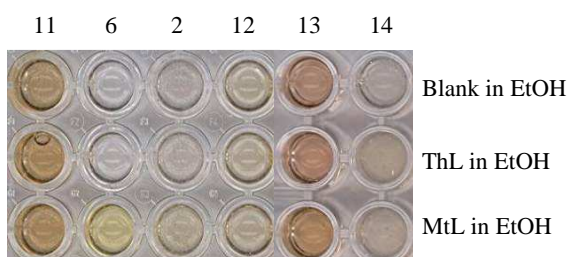
Leider war der Abbau des immobilisierten Substrats 9 mit Hilfe der MPO nicht so erfolgreich. Es sind zwar an den Tagen 1, 3 und 5 immer Farbunterschiede zwischen Blank und Probe zu erkennen, gesamt betrachtet, hat sich aber auch der Blank über den Zeitraum von fünf Tagen farblich verändert.

### 3.4.3 Modifizierte Siloxane III

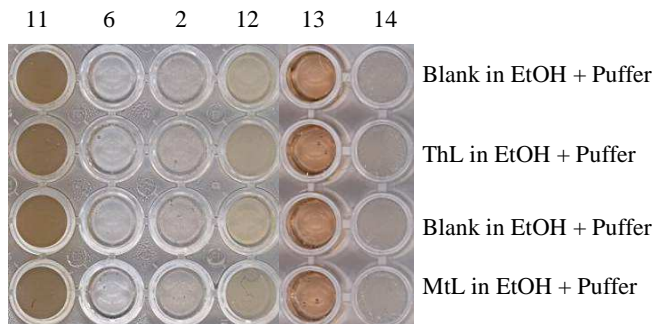
Im dritten Teil der neu synthetisierten Siloxane handelte es sich um die zwei bereits bekannten Substrate 6 und 2 und um vier noch nicht getestete, neue Substanzen. Die Produkte wurden zwei Mal umkristallisiert und gesäult und lagen nun in sehr reiner Form vor.

#### 3.4.3.1 Reaktionsansatz in Mikrotiterplatten

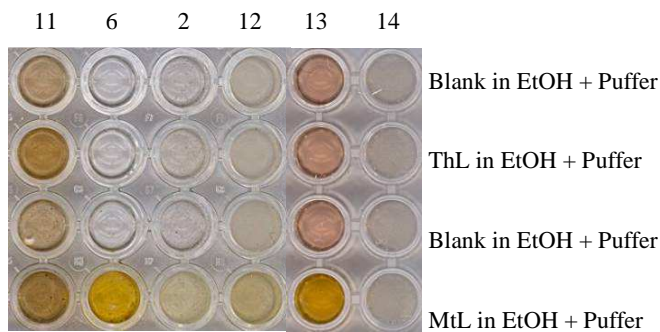
In den Abbildungen 47 und 48 sind die Farbreaktionen der sechs Substrate in reinem Ethanol dargestellt. Abbildung 47 zeigt die modifizierten Siloxane gleich nach Zugabe der Enzyme, Abbildung 48 zeigt die Substanzen nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden.

**Abbildung 47: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen in EtOH zum Zeitpunkt 0****Abbildung 48: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen in EtOH nach 24 Stunden**

Die Abbildungen 49 und 50 zeigen die Farbreaktionen der Substrate im Ethanol-Puffer-Gemisch. In Abbildung 49 sind die Farbreaktionen gleich nach Zugabe der Enzyme ersichtlic, in Abbildung 50 ist die Umsetzung der Substrate mit den Enzymen nach 24 Stunden sichtbar.



**Abbildung 49: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen in EtOH + Puffer zum Zeitpunkt 0**

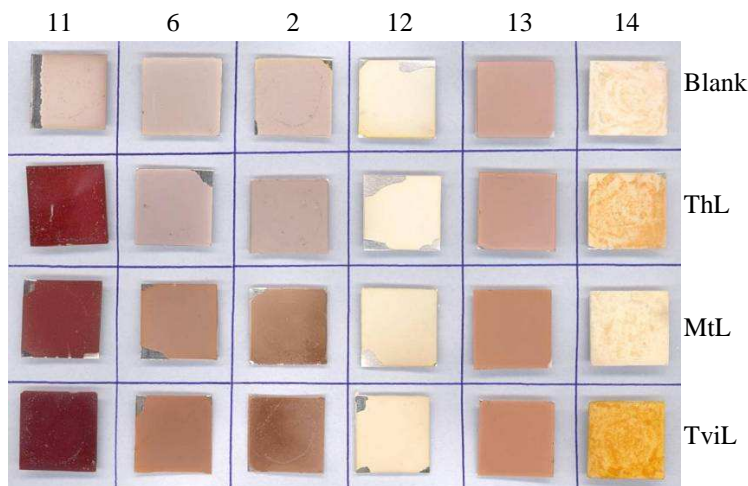


**Abbildung 50: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen in EtOH + Puffer nach 24 Stunden**

Auch bei den Versuchen mit den modifizierten Siloxanen III ist deutlich zu erkennen, dass die Proben in EtOH klar geblieben sind, wohingegen die meisten Proben in EtOH + Puffer trüb wurden. Die Farbreaktionen sind im Ethanol-Puffer-Gemisch wieder deutlich besser zu erkennen, was vermutlich an den für die Enzyme besseren Reaktionsbedingungen liegt. Der Umsatz mit dem Enzym MtL hat ebenfalls wieder um einiges besser funktioniert, als mit dem Enzym ThL, was auf die höhere Enzymaktivität zurückzuführen ist. Demzufolge konnten die Substrate im Zeitraum von 24 Stunden viel besser umgesetzt werden.

### 3.4.3.2 Immobilisierung auf Kieselgel-Platten

#### 3.4.3.2.1 Abbau der immobilisierten Substrate mit Hilfe der Enzyme ThL, MtL und TviL



**Abbildung 51: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen III auf DC-Platten mit den Enzymen ThL, MtL und TviL nach Trocknen im Trockenschrank**

**Tabelle 44: Gemessene  $\Delta E$ -Werte nach Trocknen im Trockenschrank und enzymatischer Behandlung mit den Enzymen ThL, MtL und TviL**

	ThL	MtL	TviL
Substrat 11	46,21	41,85	47,44
Substrat 6	6,4	16,15	24,34
Substrat 2	9,98	20,4	31,03
Substrat 12	4,49	3,81	4,45
Substrat 13	2,15	12,67	14,35
Substrat 14	12,33	2,91	40,4

Der Vergleich der Substrate 6 und 2 zeigte, dass die neu synthetisierten Stoffe nach Behandlung mit den drei Enzymen – im Gegensatz zu den Versuchen mit modifizierten Siloxanen II – viel größere Zahlenwerte aufweisen konnten. Dies bestätigte unsere Annahme, dass die Versuche mit den modifizierten Siloxanen III besser funktionieren werden, da die Substanzen in sehr reiner Form vorlagen. Das Umkristallisieren und Säulen der Proben hat sich somit gelohnt und erzielte bessere Ergebnisse bei den Farbreaktionen.

#### 3.4.3.2.2 Abbau des immobilisierten Substrats 11 mit Hilfe der Myeloperoxidase

Bei Substrat 11 – mit dem Ausgangsstoff Fast Blue BB – wurde das Trocknen im Trockenschrank angewandt, um den Stoff kovalent auf die Kieselgel-Platten binden zu können. Für das richtige Verhältnis von  $H_2O_2$  zu Enzymlösung wurde auch hier auf die Tests mit den Reaktivfarbstoffen

zurückgegriffen. Die Umsetzung erfolgte wie schon zuvor fünf Tage lang, das Ergebnis ist in nachfolgender Tabelle ersichtlich.

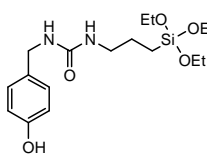
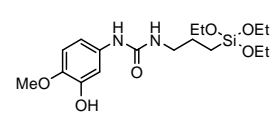
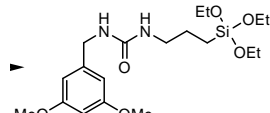
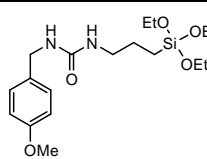
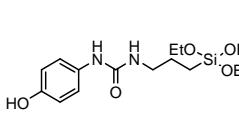
**Tabelle 45: Abbau des immobilisierten Substrats 11 mit Hilfe der Myeloperoxidase nach 1, 3 und 5 Tagen**

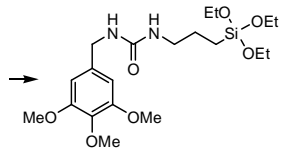
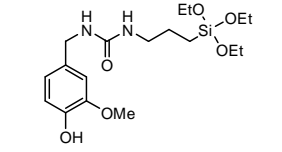
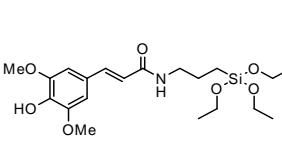
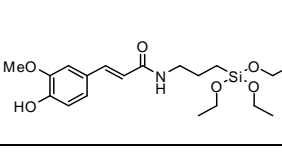
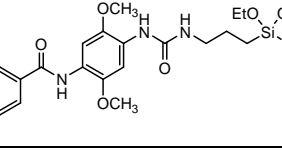
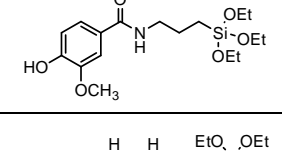
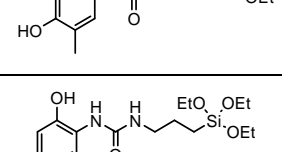
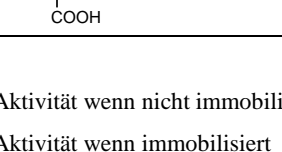
Blank	Probe
Tag 1	
Tag 3	
Tag 5	

Tabelle 45 zeigt, dass bereits am ersten Tag nach wenigen Stunden eine Rotfärbung der Probe beobachtet werden konnte. Im darauffolgenden Zeitraum von fünf Tagen waren sowohl der Blank, als auch die Probe stabil und es kam zu keiner weiteren Farbänderung. Der Abbau des immobilisierten Substrats 11 mit Hilfe der MPO war somit erfolgreich.

### 3.4.4 Ergebnisse in Tabellenform

**Tabelle 46: Zusammenfassung aller getesteten Substrate mit unterschiedlichen Enzymen**

Struktur	Nr	Enzym	Frei I	Frei II	Immo II	Frei III	Immo III
	1	ThL MtL TviL HRP	T * * +	- - * *	- - - *		
	2	ThL MtL TviL	* * *	+ + *	- - -	- - *	- + +
	4	ThL HRP	- N				
	5	ThL HRP	T T				
	6	ThL MtL TviL HRP	+++ * * +++	- +++ * *	- + + *	- +++ * *	- + + *

	7	ThL HRP	- -				
	8	ThL HRP	+ +				
	9	ThL MtL TviL MPO		- +++ * *	+ ++ ++ +		
	10	ThL MtL TviL		- - *	- - -		
	11	ThL MtL TviL MPO				++ ++ * -	+++ +++ +++ +++
	12	ThL MtL TviL				- + *	- - -
	13	ThL MtL TviL				- +++ *	- + +
	14	ThL MtL TviL				- - *	++ - +++

Frei Aktivität wenn nicht immobilisiert

Immo Aktivität wenn immobilisiert

+++ hohe Aktivität

++ mäßige Aktivität

+ niedrige Aktivität

- keine Aktivität

\* nicht getestet

T Trübung

N Niederschlag

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war einerseits, ein groß angelegtes Screening Experiment durchzuführen, bei dem unterschiedliche Kopplungsreagenzien und Farbstoffe auf ihre Reaktionsfähigkeit mit Laccasen und Peroxidasen in Lösung getestet wurden. Andererseits lag der Fokus bei den immobilisierten Substraten. Hier wurden verschiedene Enzymsubstrate über funktionalisierte Siloxane bzw. direkte kovalente Bindungen an geeignete Trägermaterialien gebunden. Im Anschluss daran wurden die immobilisierten Substrate zunächst mit Laccasen und danach mit MPO getestet. Nachfolgend findet sich die detaillierte Diskussion der einzelnen Kapitel.

### 4.1 Zusammenfassung der Kopplungsreaktionen

Die Kopplungsreaktionen unterschiedlicher Substrate durch das Enzym Laccase von *T. versicolor* lieferten nur eine schwache Färbung. Im Gegensatz dazu sind die Reaktionsansätze in denen HRP eingesetzt wurde sowohl bei den Blanks, als auch bei den Proben insgesamt sehr stark gefärbt ausgefallen, was auf die Zugabe von Wasserstoffperoxid zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kopplungsreaktionen bei allen durchgeführten Versuchen mit den unterschiedlichsten Reaktionsbedingungen (1,4-Phenylendiamin, Anilin, HRP, TveL) bei drei Substraten überhaupt nicht, bei vier Substraten mittelmäßig und bei einem Substrat sehr gut funktioniert haben. Bei den restlichen Substanzen ist das Reaktionsverhalten völlig unterschiedlich, abhängig davon, welches Substrat und welches Enzym verwendet wurde. Ein eindeutiger Trend ist jedoch nicht erkennbar.

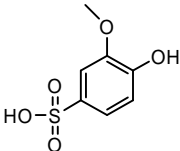
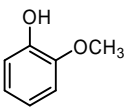
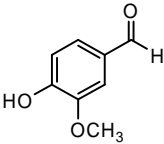
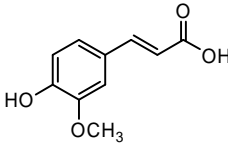
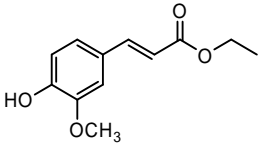
Bei den Stoffen 4, 6 und 17 war bei keiner der drei Kopplungsreaktionen eine Farbänderung zu beobachten. Bei Substrat 4 liegt die Vermutung nahe, dass die Reaktion mit einem Ester im Seitenarm nicht stattfinden kann, ebenso wie bei Substrat 17, das ein primäres Amin in der Seitenkette aufweist. Schwierig zu erklären ist die Tatsache, dass Substrat 6 (Ferulasäure) nicht in Frage kam, da sich Substrat 11 (Kaffesäure) nur in einem Substituenten unterscheidet und die Umsetzung mit Kaffesäure eigentlich sehr gut funktioniert hat.

Prinzipiell haben auch die Substrate 2, 8, 9 und 10 einen Farbumschlag gezeigt. Alle vier Substanzen wiesen jedoch beim Versuch mit dem Enzym Horseradish Peroxidase nur leichte Farbänderungen auf und wurden daher, was die Umsetzung betrifft, als nicht perfekt eingestuft.



Unter den Substraten befanden sich fünf Moleküle, die alle Guaiacol als Grundstruktur hatten. Um die Reaktionseigenschaften zu verdeutlichen, sind in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** diese Substrate zum Vergleich noch einmal dargestellt, wobei die Reaktionsfähigkeit von links nach rechts abnimmt. Dies bedeutet, dass beim Umsatz von Guaiacolsulfonsäure eine gut sichtbare Reaktion stattgefunden hat, wohingegen bei Ethyl-4-hydroxy-3-methoxyzimtsäure keine Farbreaktion zu beobachten war.

**Tabelle 47: Vergleich der fünf Moleküle mit der Grundstruktur von Guaiacol**

Guaiacolsulfonsäure (Substrat 5)	Guaiacol (Substrat 10)	Vanillin (Substrat 1)	Ferulasäure (Substrat 6)	Ethyl-4-hydroxy-3-methoxyzimtsäure (4)
				

Guaiacolsulfonsäure hat bei allen Experimenten sehr gut funktioniert und zeigte einen eindeutigen Farbumschlag. Die Molekülstruktur konnte sowohl von dem Enzym HRP, als auch von der Laccase gut verwertet werden, was vermutlich auf die am Benzolring angehängte Sulfongruppe zurückzuführen ist. Guaiacol selbst schnitt bei den Versuchen als Zweitbestes ab, gefolgt von Vanillin. Überhaupt nicht funktioniert haben die Substrate Ferulasäure und Ethyl-4-hydroxy-3-methoxyzimtsäure, was eventuell auf die konjugierte Doppelbindung in der Seitenkette zurückzuführen ist.

Bei der Immobilisierung von Ferula- und Kaffesäure auf APTS-Silicagel ist bei beiden Substraten sowohl beim Umsatz mit TveL, als auch beim Umsatz mit HRP ein eindeutiger Farbumschlag zu erkennen. Die Immobilisierung mit anschließender enzymatischer Behandlung war somit erfolgreich. Die Tatsache, dass die Reaktion mit Ferulasäure als Substrat nun doch funktioniert hat, lässt sich wohl auf die vorangegangene Immobilisierung auf das APTS-Silicagel zurückführen.

Beim Versuch der Immobilisierung von 1,4-Phenyldiamin auf APTS-Silicagel ist deutlich zu erkennen, dass alle drei gut funktionierenden Substrate die gleiche Grundstruktur, nämlich Guaiacol mit Hydroxy- und Methoxygruppen als funktionelle Gruppen aufweisen. Die für die Laccase günstigste Konstellation ergibt sich, nach den Ergebnissen der Experimente zu urteilen, für 2,6-Dimethoxyphenol, bei denen die beiden Methoxygruppen in ortho-Position zur Hydroxygruppe stehen. Bei Guaiacol fehlt eine dieser beiden Methoxygruppen und bei 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon befindet sich in para-Position noch zusätzlich eine Methylketongruppe, weshalb bei diesen zwei Substraten die Reaktion wahrscheinlich nicht so gut funktioniert hat.

Stellt man die beiden Immobilisierungsversuche vergleichend gegenüber, kann festgestellt werden, dass mit beiden Strategien gute Resultate erzielt werden konnten. Das Aufbringen der beiden Substrate Ferula- und Kaffesäure auf APTS-Silicagel hat sehr gute optische Unterschiede hervorgebracht. Auch bei der Immobilisierung von 1,4-Phenylendiamin konnte bei drei Substraten eine eindeutige Farbdifferenz festgestellt werden.

## 4.2 Zusammenfassung des Farbstoff-Screenings

Die Farbstoffe 4, 8 und 17 wurden in den Screenings mit den Enzymen TveL, HRP und MPO nicht verwendet, da sich diese drei Farbstoffe in Wasser nicht gelöst haben. Weiters haben die Farbstoffe 2, 12, 13, 16, 23, 25, und 40 mit den getesteten Enzymen wenig bis keine Farbreaktionen gezeigt.

Beim Screening mit TveL haben die Farbstoffe 1, 5, 6, 14, 19, 20, 22, 29, 31 und 32 ein optimales Reaktionsverhalten gezeigt, beim Umsatz mit dem Enzym HRP haben die Farbstoffe 1, 3, 5, 7, 11, 19, 22, 29, 30 und 32 die besten Ergebnisse erzielt. Bei den Farbreaktionen mit MPO haben die Farbstoffe 1, 11, 26, 29, 30, 31, 38 und 44 am besten funktioniert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nur die zwei Farbstoffe 1 und 29 – nämlich Kristallviolett und p-OH – bei allen drei Tests schnelle und gute Farbreaktionen ergeben haben.

Für alle nicht erwähnten Farbstoffe gilt, dass die Umsetzung mit den drei Enzymen entweder zu wenig intensiv oder die Reaktion zu langsam war. Keiner dieser Farbstoffe war in der Lage, eine gute und schnell funktionierende Farbänderung zu erzielen.

Beim Vergleich der Farbstoffe 1 und 2 ist sowohl beim Screening mit TveL und HRP, als auch beim Screening mit dem Enzym MPO auffällig, dass Kristallviolett einen sehr guten und schnellen Farbumsatz erzielen konnte, wohingegen das nicht-methylierte Pendant Pararosanilin fast keine Reaktion zeigte. Dies ist im ersten Moment aufgrund des gleichen Molekülgerüsts (Triphenylmethan) und der Ähnlichkeit der Strukturen verwunderlich. Die Laccase hat jedoch bei Pararosanilin nicht die Möglichkeit die Methylgruppen abzubauen und die Hydroxygruppe dürfte aufgrund sterischer Hinderung nicht für das Enzym zugänglich sein, was den schlechten Reaktionsverlauf erklärt. In einer Studie von A. Kandelbauer [3] wurde ebenfalls festgestellt, dass sich beim Umsatz von Kristallviolett und Pararosanilin mit Laccase *T. modesta* die beiden Moleküle ganz unterschiedlich verhalten. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Methylgruppen bei Kristallviolett als Elektronendonatoren fungieren und die Laccase das Substrat dadurch leichter oxidieren kann, als bei Pararosanilin.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Reaktion mit dem Farbstoff Kristallviolett das beste Resultat erzielt hat. Hier konnte sowohl optisch, als auch beim Wellenlängenscan eine eindeutige Abnahme des Farbstoffes nachgewiesen werden. Auch bei den Farbstoffen 29, 30 und 31 mit der Hydroxygruppe als Substituent, konnte in ortho-, para- und sogar in meta- Position ein Farbumschlag detektiert werden. Beim Substituenten Chlor konnte in ortho- Position die größte Reaktivität nachgewiesen werden. Die Farbreaktion in meta- Stellung war kaum merklich und bei der Messung in para- Stellung war der Blank nicht stabil. Für die beiden Substituenten Fluor und Brom hat sich die para- Stellung als günstigste Position herausgestellt. Bei beiden funktionellen Gruppen hat die Umsetzung mit dem Enzym MPO wahrscheinlich aufgrund sterischer Hinderung in der von der Azobindung am weitesten entfernt liegenden Position am besten funktioniert. Keine Reaktion war hingegen bei den Molekülen mit Methyl und Trifluormethan als funktionelle Gruppe zu sehen.

Bei der Immobilisierung der beiden Farbstoffe Reactive Blue 221 und Kristallviolett hat die gewählte Färbemethode mit einer Konzentration von  $100 \text{ mg l}^{-1}$  für 10 min. mit anschließendem Waschen bei Raumtemperatur sehr gut funktioniert. Auch die Behandlungen mit ThL war mit beiden Farbstoffen erfolgreich. Die Farbintensitäten waren ebenfalls optimal, um einen schönen Farbkontrast nach dem enzymatischen Abbau sehen zu können. An den  $\Delta E$ -Werten ist auch gut zu erkennen, dass die Farbintensitäten mit steigender Enzymkonzentration abnehmen. Die Immobilisierung der beiden Farbstoffe mit anschließendem Abbau mit Hilfe des Enzyms ThL war somit erfolgreich.

### **4.3 Zusammenfassung der Versuche mit Modifizierten Siloxanen**

#### **4.3.1 Modifizierte Siloxane I**

Die Ergebnisse der Experimente mit den ersten acht modifizierten Siloxanen waren zufriedenstellend. Die beiden Substanzen 2 und 3 waren in DMSO leider nicht löslich und konnten daher nicht getestet werden. Auch die Spektren der Substrate 1 und 5 konnten aufgrund der Trübung nicht interpretiert werden. Substrat 4 fiel bei Zugabe des Enzyms HRP aus und zeigte bei Zugabe des Enzyms ThL keine Reaktion. Dafür konnte bei Substrat 8 ein guter und bei Substrat 6 ein sehr guter Farbumschlag beobachtet werden. Für die sehr intensive Farbgebung des Aminophenol-Derivates dürfte die direkte Harnstoffbindung verantwortlich sein. Bei allen anderen Substanzen befindet sich nämlich zwischen dem Phenolring und der Harnstoffgruppe noch ein zusätzliches Kohlenstoffatom (siehe Tabelle 9).

### 4.3.2 Modifizierte Siloxane II

Auf den ersten Blick ist in den Abbildungen 40 und 41 deutlich zu erkennen, dass die Proben in reinem Ethanol klar geblieben sind, wohingegen die Proben im 1:1 Ethanol-Puffer Gemisch trüb wurden. Der Farbumschlag ist allerdings im Alkohol-Puffer Gemisch viel besser zu erkennen, da die Enzyme in diesem Gemisch eine bessere, gepufferte Umgebung vorfinden.

Bei den Substraten 1 und 10 ist weder beim Einsatz von ThL, noch bei der Verwendung von MtL eine Farbänderung über den Zeitraum von sechs Stunden zu erkennen, wohingegen man bei den Proben 6, 2 und 9 sehr wohl einen Farbumschlag beobachten kann. Weiters ist ersichtlich, dass die Reaktion mit ThL nicht, die Umsetzung mit MtL gut funktioniert hat. Dies liegt vermutlich daran, dass MtL eine ~ 60fach größere Aktivität besitzt und in nur sechs Stunden Reaktionszeit die Substrate viel besser umsetzen kann.

Der Vergleich von Blank und Proben nach den verschiedenen Trocknungsmethoden mit den verschiedenen Enzymbehandlungen zeigte, dass Substrat 1 weder optisch, noch bei den Messungen mit dem Farbmessgerät gute Ergebnisse erzielen konnte. Die Farbreaktionen blieben bei allen drei Trocknungsversuchen aus, auch die Differenzen der  $\Delta E$ -Werte waren sehr gering. Ebenso war bei Substrat 10 weder nach dem Trocknen bei Raumtemperatur, noch nach dem Trocknen im Trockenschrank eine Farbreaktion ersichtlich. Lediglich das Trocknen im Exsikkator hat bei Substrat 10 recht gute Ergebnisse erzielt. Bei Substanz 2 waren die beiden Trocknungsmethoden bei Raumtemperatur und bei erhöhter Temperatur erfolgreich, wohingegen die Trocknungsmethode im Exsikkator versagte.

Im Gegensatz dazu waren die Farbänderungen zwischen Blank und Proben bei den immobilisierten Substraten 6 und 9 bei allen drei Trocknungsmethoden sehr gut ersichtlich. Prinzipiell hat Substrat 9 mit einem durchschnittlichen  $\Delta E$ -Wert von 9,64 (bezogen auf alle drei Trocknungsversuche und alle verwendeten Enzyme) recht gut funktioniert, wurde jedoch von Substrat 6 mit einem durchschnittlichen  $\Delta E$ -Wert von 13,19 geschlagen. Da bei Substrat 9 der Farbunterschied optisch besser zu erkennen war, wurde beschlossen, dieses Substrat mit dem Ausgangsstoff Sinapinsäure mit dem Enzym MPO abzubauen.

Generell kann gesagt werden, dass die Reaktionen mit ThL nicht so gut funktioniert haben, wie die Reaktionen mit den Enzymen MtL und TviL. Dies liegt vermutlich daran, dass die Aktivität des Enzyms ThL um einiges niedriger ist, als die Aktivitäten der beiden anderen Enzyme. Aufgrund der starken Eigenfärbung wurde der Versuch, das Enzym höher konzentriert einzusetzen, aber nicht unternommen.

Aus Sicht der Molekülstrukturen ist das Reaktionsverhalten der modifizierten Siloxane II nur schwer zu erklären. Die Stoffe 6 und 2 sind sich prinzipiell sehr ähnlich, weil die beiden Ausgangsstoffe über eine direkte Harnstoffbindung mit den Siloxanen verbunden sind. Die Unterschiede in den Substituenten sind ebenfalls nur gering und sollten mit dem Enzym Laccase eigentlich gut umsetzbar sein. Die gemessenen  $\Delta E$ -Werte sind – bis auf das Trocknungsverfahren im Trockenschrank – vergleichsweise aber sehr verschieden. Auch die Erwartung, dass sich die beiden Substrate 9 und 10 ähnlich verhalten, war aufgrund der ähnlichen Molekülstrukturen groß (Sinapinsäure unterscheidet sich nämlich nur durch eine zusätzliche Methylgruppe am Phenolring von Ferulasäure). Doch auch hier stimmten die gemessenen  $\Delta E$ -Werte nur bei der Trocknungsmethode im Exsikkator halbwegs überein.

Der Abbau des immobilisierten Substrats 9 mittels Myeloperoxidase war insofern leider nicht so erfolgreich, als dass sich sowohl die Probe als auch der Blank innerhalb von fünf Tagen stark verfärbt haben.

### 4.3.3 Modifizierte Siloxane III

Im dritten Teil der Testreihen wurden alle verwendeten Substrate zwei Mal umkristallisiert und gesäult, wodurch die Substanzen in sehr reiner Form vorlagen. In Lösung ist bei den Tests in reinem EtOH ist mit freiem Auge lediglich bei Substrat 6 ein Farbumschlag zu erkennen. Eventuell lässt sich auch bei den Substraten 2 und 14 eine leichte Farbänderung erahnen, ein eindeutiger Farbumschlag ist jedoch nicht zu sehen. Die Substanzen 11, 12 und 13 zeigen bei der Umsetzung mit den beiden Enzymen in reinem Ethanol keinerlei Reaktion. Im Gegensatz dazu konnten bei den Versuchen mit EtOH + Puffer sehr gut sichtbare Farbänderungen erzielt werden. Bei Substrat 6 konnte mit dem Enzym MtL ein eindeutiger Farbumschlag von durchsichtig auf gelb nachgewiesen werden. Auch Substrat 13 zeigte eine merkliche Farbänderung, gefolgt von Substrat 11. Bei genauem Hinsehen kann man auch bei Probe 12 eine minimale Farbdifferenz feststellen. Die beiden Substanzen 2 und 14 zeigten im Ethanol-Puffer-Gemisch keine Reaktion.

Der Vergleich der Farbreaktionen in der Mikrotiterplatte und immobilisiert auf den DC-Platten lieferte für die modifizierten Siloxane III völlig unterschiedliche Ergebnisse. In flüssigem Zustand erzielte eindeutig Substrat 6 die besten Ergebnisse, gefolgt von den Substraten 13, 11, 12 und 2. Substrat 14 zeigte keine Reaktion. Im immobilisierten Zustand konnte eindeutig Substrat 11 die besten Ergebnisse erzielen, gefolgt von Substrat 2, 6, 13 und 12. Bei Substrat 14 konnte zwar ebenfalls eine gut sichtbare Farbreaktion nachgewiesen werden, die Substanz war jedoch beim Auftragen auf die DC-Platten nicht homogen und wurde daher in der Auswertung nicht berücksichtigt. Zusammenfassend kann gesagt

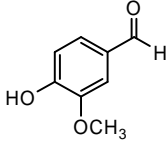
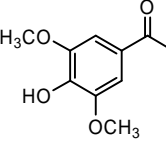
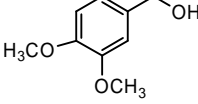
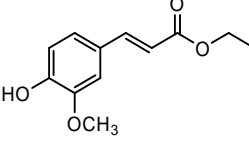
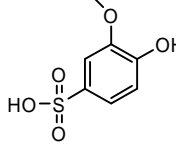
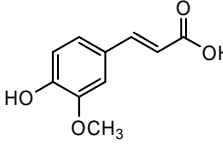
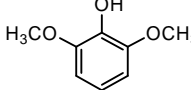
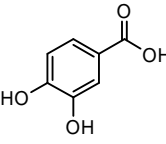
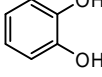
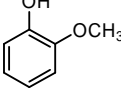
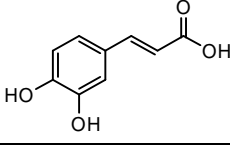
werden, dass die Eigenschaften der Substrate und somit auch das Reaktionsverhalten davon abhängig sind, ob die Stoffe im flüssigen oder im immobilisierten Zustand vorliegen.

Bei der Immobilisierung auf Kieselgel-Platten hat Probe 12 keine Reaktion bei der enzymatischen Umsetzung gezeigt. Die Substrate 6, 2 und 13 konnten mit den Enzymen MtL und TviL große Unterschiede in den Zahlenwerten erlangen, Substrat 14 hat ebenfalls gut funktioniert. Leider war die Probe 14 in Ethanol jedoch nicht gut löslich und das Substrat konnte nicht homogen auf das Kieselgel aufgebracht werden. Das mit Abstand beste Ergebnis konnte mit Substrat 11 erzielt werden. Der Blank blieb stabil, wohingegen sich die Proben dunkelrot färbten und hohe  $\Delta E$ -Werte gemessen werden konnten. Aus diesem Grund wurde auch beschlossen, erneut einen Abbauersuch mit diesem immobilisierten Substrat und dem Enzym MPO zu starten.

Der Abbau des an Kieselgel gebundenen Substrats 11 mittels Myeloperoxidase hat sehr gut und schnell funktioniert. Binnen weniger Stunden hat sich die Probe dunkelrot gefärbt, wohingegen der Blank stabil geblieben ist. Auch nach fünf Tagen haben sich weder beim Blank noch bei der Probe Farbdifferenzen ergeben. Die Immobilisierung und der anschließende enzymatische Abbau war somit ein voller Erfolg.

## 5. Anhang

**Tabelle 48: Verwendete Substrate für Kopplungsreaktionen**

Nummer	Name	Struktur
1	Vanillin	
2	3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon	
3	3,4-Dimethoxybenzylalkohol	
4	Ethyl-4-hydroxy-3-methoxyzimtsäure	
5	Guaiacolsulfonsäure	
6	Ferulasäure	
7	2,6-Dimethoxyphenol	
8	3,4-Dihydroxybenzoesäure	
9	Katechol	
10	Guaiacol	
11	Kaffeensäure	

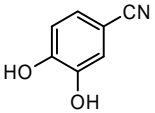
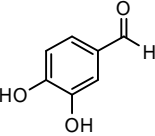
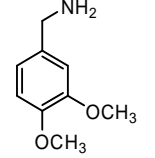
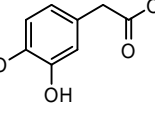
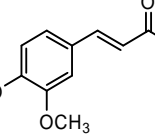
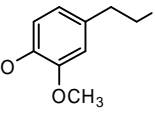
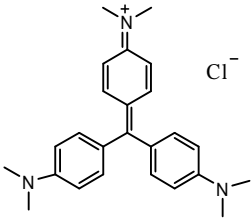
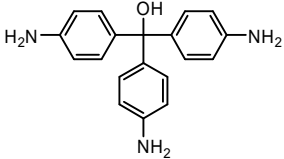
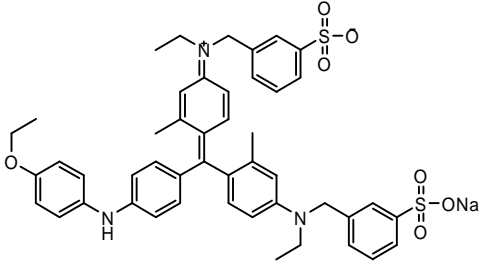
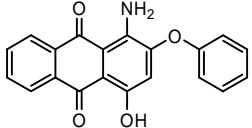
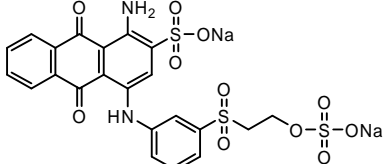
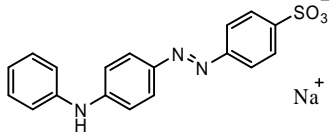
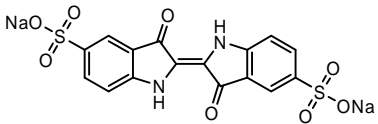
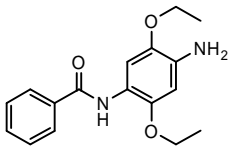
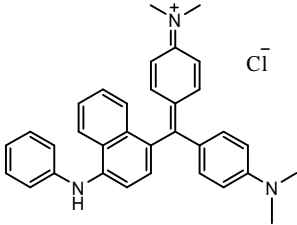
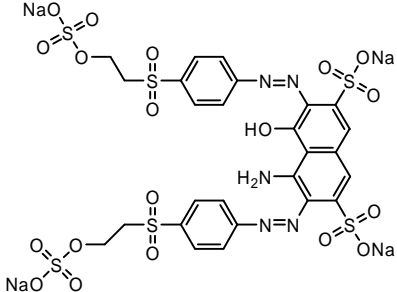
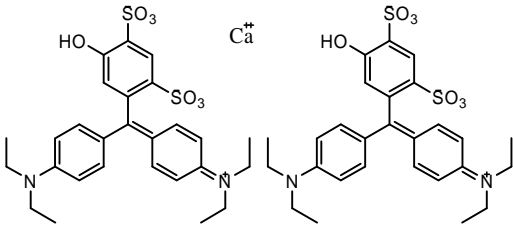
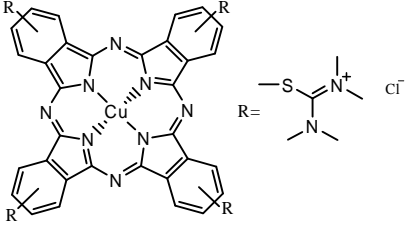
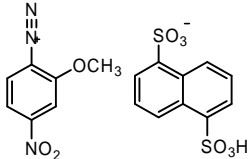
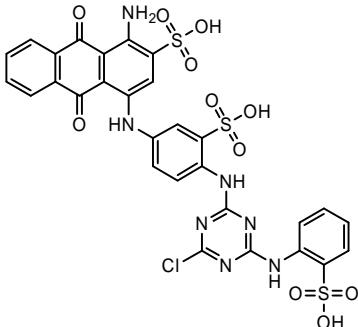
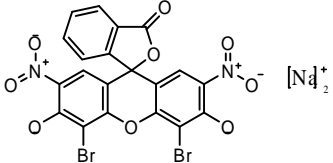
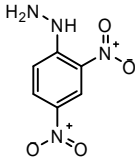
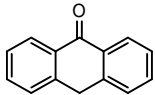
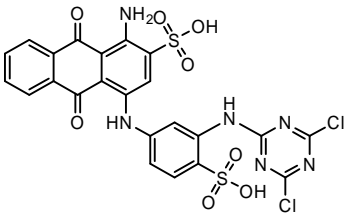
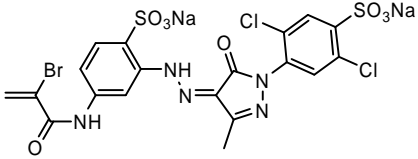
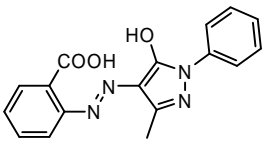
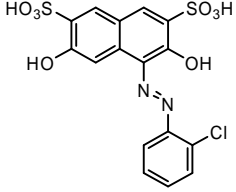
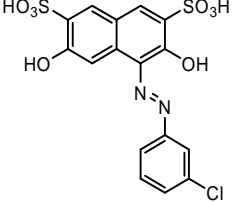
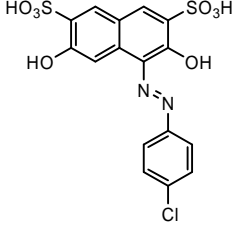
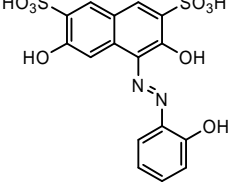
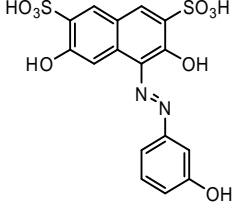
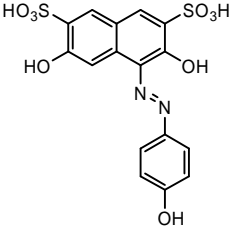
12	3,4-Dihydroxybenzonnitril *	
13	3,4-Dihydroxybenzaldehyd	
14	3,4-Dimethoxybenzylamin *	
15	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	
16	4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäurealdehyd *	
17	3,4-Dimethoxyphenethylamin	

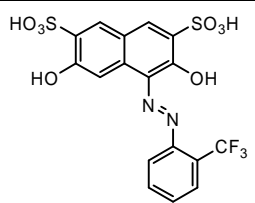
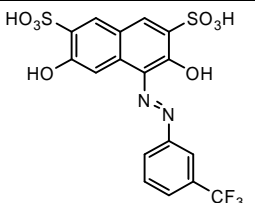
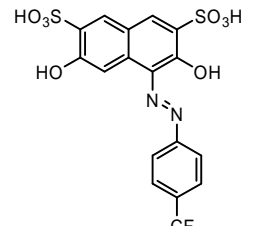
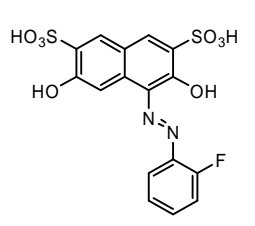
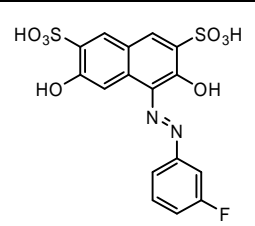
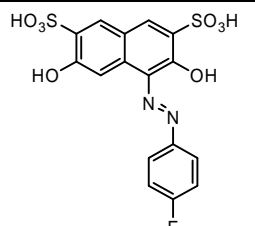
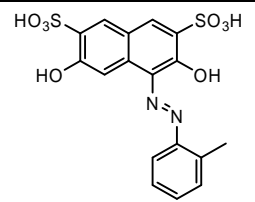
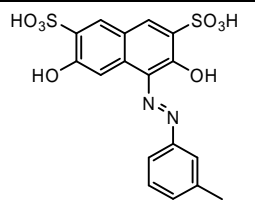
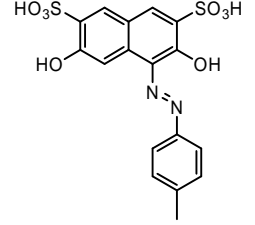
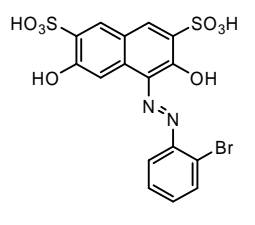
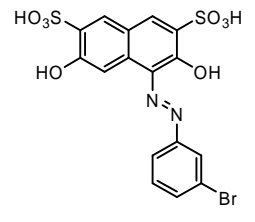
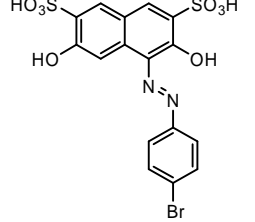
Tabelle 49: Verwendete Reaktivfarbstoffe

1 Kristallviolett	2 Pararosanilin
	
3 Coomassie Brilliant Blue G 250	4 Disperse Red 60
	
5 Remazol Brilliant Blue R	6 Orange IV
	



7 Indigocarmin	8 Fast Blue BB Base
	
9 Victoria Blue B	10 Reactive Black 5
	
11 Patentblau V Calciumsalz	12 Alcian Blue 8GX
	
13 Fast Red B Salt	14 Cibacron Blue 3G-A
	
15 Eosin B (bläulich)	16 2,4-Dinitrophenylhydrazin
	
17 Anthron	18 Astrazon Blau BG 200% 01
	<p style="text-align: center;">*</p>

19 Procion Blue MX-R	20
	*
21 Lanaset Marine R	22 Lanaset Blue 8G
*	*
23 Lanaset Yellow 4G	24 Lanaset Grey G
	*
25 Irgalan Yellow 2GL	26 o-Chlor
	
27 m-Chlor	28 p-Chlor
	
29 o-OH	30 m-OH
	
31 p-OH	32 Reactive Blue 221
	

<b>33 o-CF<sub>3</sub></b> 	<b>34 m-CF<sub>3</sub></b> 
<b>35 p-CF<sub>3</sub></b> 	<b>36 o-F</b> 
<b>37 m-F</b> 	<b>38 p-F</b> 
<b>39 o-CH<sub>3</sub></b> 	<b>40 m-CH<sub>3</sub></b> 
<b>41 p-CH<sub>3</sub></b> 	<b>42 o-Br</b> 
<b>43 m-Br</b> 	<b>44 p-Br</b> 

\* Struktur nicht bekannt

**Tabelle 50: Konzentrationen der Farbstoffe mit TveL**

Farbstoff	M [g mol <sup>-1</sup> ]	Einwaage [mg]	Zugabe [μl]	c [mol l <sup>-1</sup> ]
1	407,98	14,99	100	2,45·10 <sup>-5</sup>
2	305,37	15,83	700	2,42·10 <sup>-4</sup>
3	854,02	15,39	300	3,60·10 <sup>-5</sup>
4	331,33	15,90	-	-
5	626,54	15,55	1000	1,65·10 <sup>-4</sup>
6	375,38	15,83	300	8,43·10 <sup>-5</sup>
7	466,35	15,88	300	6,81·10 <sup>-5</sup>
8	-	15,57	-	-
9	506,10	15,14	200	3,99·10 <sup>-5</sup>
10	991,82	15,10	500	5,07·10 <sup>-5</sup>
11	579,71	15,36	100	1,77·10 <sup>-5</sup>
12	-	14,68	1000	-
13	467,43	15,62	4000	8,91·10 <sup>-4</sup>
14	774,16	14,92	2000	2,57·10 <sup>-4</sup>
15	624,09	15,35	500	8,20·10 <sup>-5</sup>
16	-	15,38	1300	-
17	194,23	15,19	-	-
18	-	15,57	150	-
19	637,43	14,97	2200	3,44·10 <sup>-4</sup>
20	-	15,16	500	-
21	-	15,37	1700	-
22	-	15,09	700	-
23	-	15,78	1200	-
24	-	15,65	1400	-
25	-	15,18	1800	-
26	457,96	14,51	600	1,27·10 <sup>-4</sup>
27	457,96	15,28	1300	2,89·10 <sup>-4</sup>
28	457,96	15,80	1200	2,76·10 <sup>-4</sup>
29	440,40	16,12	800	1,95·10 <sup>-4</sup>
30	440,40	16,22	1300	3,19·10 <sup>-4</sup>
31	440,40	15,15	1900	4,36·10 <sup>-4</sup>
32	1014,00	16,11	1900	2,01·10 <sup>-4</sup>
33	492,40	15,09	1500	3,06·10 <sup>-4</sup>
34	492,40	14,75	3500	6,99·10 <sup>-4</sup>
35	492,40	16,03	3500	7,60·10 <sup>-4</sup>
36	442,40	16,50	4000	9,95·10 <sup>-4</sup>
37	442,40	15,32	2500	5,77·10 <sup>-4</sup>
38	442,40	14,93	600	1,35·10 <sup>-4</sup>
39	438,43	15,06	700	1,60·10 <sup>-4</sup>

40	438,43	15,64	1400	$3,33 \cdot 10^{-4}$
41	438,43	16,53	800	$2,01 \cdot 10^{-4}$
42	503,30	15,63	800	$1,66 \cdot 10^{-4}$
43	503,30	16,17	700	$1,50 \cdot 10^{-4}$
44	503,30	15,13	1400	$2,81 \cdot 10^{-4}$

**Tabelle 51: Konzentrationen der Farbstoffe mit HRP**

Farbstoff	M [g mol <sup>-1</sup> ]	Einwaage [mg]	Zugabe [μl]	c [mol l <sup>-1</sup> ]
1	407,98	14,99	100	$2,45 \cdot 10^{-5}$
2	305,37	15,83	700	$2,42 \cdot 10^{-4}$
3	854,02	15,39	300	$3,60 \cdot 10^{-5}$
4	331,33	15,90	-	-
5	626,54	15,55	1700	$2,81 \cdot 10^{-4}$
6	375,38	15,83	300	$8,43 \cdot 10^{-5}$
7	466,35	15,88	500	$1,14 \cdot 10^{-4}$
8	-	15,57	-	-
9	506,10	15,14	2300	$4,59 \cdot 10^{-4}$
10	991,82	15,10	800	$8,12 \cdot 10^{-5}$
11	579,71	15,36	100	$1,77 \cdot 10^{-5}$
12	-	14,68	1700	-
13	467,43	15,62	4000	$8,91 \cdot 10^{-4}$
14	774,16	14,92	2000	$2,57 \cdot 10^{-4}$
15	624,09	15,35	400	$6,56 \cdot 10^{-5}$
16	-	15,38	-	-
17	194,23	15,19	-	-
18	-	15,57	150	-
19	637,43	14,97	2500	$3,91 \cdot 10^{-4}$
20	-	15,16	-	-
21	-	15,37	1500	-
22	-	15,09	700	-
23	-	15,78	1200	-
24	-	15,65	1300	-
25	-	15,18	1700	-
26	457,96	14,51	600	$1,27 \cdot 10^{-4}$
27	457,96	15,28	1300	$2,89 \cdot 10^{-4}$
28	457,96	15,80	1200	$2,76 \cdot 10^{-4}$
29	440,40	16,12	800	$1,95 \cdot 10^{-4}$
30	440,40	16,22	1300	$3,19 \cdot 10^{-4}$
31	440,40	15,15	1900	$4,36 \cdot 10^{-4}$
32	1014,00	16,11	1900	$2,01 \cdot 10^{-4}$

33	492,40	15,09	1500	$3,06 \cdot 10^{-4}$
34	492,40	14,75	3500	$6,99 \cdot 10^{-4}$
35	492,40	16,03	3500	$7,60 \cdot 10^{-4}$
36	442,40	16,50	4000	$9,95 \cdot 10^{-4}$
37	442,40	15,32	2500	$5,77 \cdot 10^{-4}$
38	442,40	14,93	600	$1,35 \cdot 10^{-4}$
39	438,43	15,06	700	$1,60 \cdot 10^{-4}$
40	438,43	15,64	1400	$3,33 \cdot 10^{-4}$
41	438,43	16,53	800	$2,01 \cdot 10^{-4}$
42	503,30	15,63	800	$1,66 \cdot 10^{-4}$
43	503,30	16,17	700	$1,50 \cdot 10^{-4}$
44	503,30	15,13	1400	$2,81 \cdot 10^{-4}$

Tabelle 52: Konzentrationen der Farbstoffe mit MPO

Farbstoff	M [g mol <sup>-1</sup> ]	Einwaage [mg]	Zugabe [μl]	c [mol l <sup>-1</sup> ]
1	407,98	15,71	50	$1,28 \cdot 10^{-5}$
2	305,37	15,02	800	$2,62 \cdot 10^{-4}$
3	854,02	16,41	350	$4,48 \cdot 10^{-5}$
5	626,54	14,61	1600	$2,49 \cdot 10^{-4}$
6	375,38	16,27	300	$8,67 \cdot 10^{-5}$
7	466,35	16,29	300	$6,99 \cdot 10^{-5}$
9	506,10	14,77	1500	$2,92 \cdot 10^{-4}$
11	579,71	15,96	70	$1,28 \cdot 10^{-5}$
15	624,09	16,16	200	$3,45 \cdot 10^{-5}$
19	637,43	14,95	2400	$3,75 \cdot 10^{-4}$
21		15,96	1400	
26	457,96	14,92	600	$1,30 \cdot 10^{-4}$
27	457,96	14,49	1400	$2,95 \cdot 10^{-4}$
28	457,96	16,23	1000	$2,36 \cdot 10^{-4}$
29	440,40	14,70	800	$1,78 \cdot 10^{-4}$
30	440,40	14,96	1100	$2,49 \cdot 10^{-4}$
31	440,40	14,84	1100	$2,47 \cdot 10^{-4}$
32	1014,00	15,70	1400	$1,45 \cdot 10^{-4}$
33	492,40	15,30	1800	$3,73 \cdot 10^{-4}$
34	492,40	15,37	2000	$4,16 \cdot 10^{-4}$
35	492,40	15,07	2000	$4,08 \cdot 10^{-4}$
36	442,40	15,26	4000	$9,20 \cdot 10^{-4}$
37	442,40	14,67	1800	$3,98 \cdot 10^{-4}$
38	442,40	15,16	500	$1,14 \cdot 10^{-4}$
39	438,43	15,36	500	$1,17 \cdot 10^{-4}$

40	438,43	15,12	800	$1,84 \cdot 10^{-4}$
41	438,43	15,37	1200	$2,80 \cdot 10^{-4}$
42	503,30	14,31	800	$1,52 \cdot 10^{-4}$
43	503,30	15,48	700	$1,44 \cdot 10^{-4}$
44	503,30	15,88	1000	$2,10 \cdot 10^{-4}$

## 5.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des COMB Systems .....	1
Abbildung 2: Kristallstruktur der Laccase von <i>Trametes versicolor</i> [5].....	4
Abbildung 3: 1,4-Phenylendiamin (links) und Brenzkatechin (rechts).....	11
Abbildung 4: Fließschema zur Optimierung der Menge von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bei der enzymatischen Kopplungsreaktion .....	12
Abbildung 5: Polymerisationsreaktion von Silanen auf Hydroxy-Oberflächen.....	32
Abbildung 6: Aktivität von MtL in verschiedenen Lösungsmitteln.....	38
Abbildung 7: Kopplungsreaktion von 1,4-Phenylendiamin mit HRP für die Substrate 1-11, 13 und 15 .....	40
Abbildung 8: Kopplungsreaktion von 1,4-Phenylendiamin mit TveL für die Substrate 1-11, 13 und 15 .....	41
Abbildung 9: Kopplungsreaktion von Anilin durch TveL für die Substrate 1-3, 5-11, 13, 15 und 17.....	42
Abbildung 10: Kopplungsreaktion der immobilisierten Ferula- und Kaffesäure mit TveL und HRP nach einer Stunde.....	43
Abbildung 11: Kopplungsreaktion mit immobilisiertem 1,4-Phenylendiamin auf APTS Silicagel und TveL für die Substrate 1-3, 5-7, 9 und 10.....	43
Abbildung 12: Umsetzung unterschiedlicher Farbstoffe mittels TveL .....	44
Abbildung 13: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h (Blank).....	45
Abbildung 14: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h mit Laccase von <i>T.</i> <i>versicolor</i> .....	45
Abbildung 15: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h (Blank).....	46
Abbildung 16: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h mit Laccase von <i>T.</i> <i>versicolor</i> .....	46
Abbildung 17: Umsetzung unterschiedlicher Farbstoffe mittels HRP .....	47
Abbildung 18: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h (Blank).....	48
Abbildung 19: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h mit <i>HRP</i> .....	48
Abbildung 20: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h (Blank).....	48
Abbildung 21: Spektrum unterschiedlicher Farbstoffe nach Inkubation für 48h mit <i>HRP</i> .....	49
Abbildung 22: Inkubation unterschiedlicher Farbstoffe mit MPO (Vorversuch 1) .....	49
Abbildung 23: Inkubation unterschiedlicher Farbstoffe mit MPO (Vorversuch 2) .....	50
Abbildung 24: Inkubation unterschiedlicher Farbstoffe mit MPO (Vorversuch 3) .....	50
Abbildung 25: Inkubation unterschiedlicher Farbstoffe mit MPO (Vorversuch 5) .....	51
Abbildung 26: Inkubation unterschiedlicher Farbstoffe mit MPO (Vorversuch 8) .....	51
Abbildung 27: Inkubation unterschiedlicher Farbstoffe mit MPO (Vorversuch 9) .....	52
Abbildung 28: Umsetzung unterschiedlicher Farbstoffe mittels MPO .....	52
Abbildung 29: Absorptionsspektren der acht am besten funktionierenden Farbstoffe nach einer Stunde Umsatz mit dem Enzym MPO.....	54

Abbildung 30: Grundgerüst der Farbstoffe 26 – 44 (mit Ausnahme von Farbstoff 32).....	54
Abbildung 31: Massenspektrum von Kristallviolett (Blank) .....	55
Abbildung 32: Massenspektrum von Kristallviolett nach enzymatischer Behandlung mit MPO (Probe) .....	55
Abbildung 33: Massenspektrum von Kristallviolett (Blank nach 6h).....	55
Abbildung 34: Massenspektrum von Kristallviolett nach enzymatischer Behandlung mit MPO (Probe nach 6h).....	55
Abbildung 35: Massenspektrum von Kristallviolett nach (Blank nach 24h) .....	56
Abbildung 36: Massenspektrum von Kristallviolett nach enzymatischer Behandlung mit MPO (Probe nach 24h).....	56
Abbildung 37: Möglicher Abbauweg von Kristallviolett mit MPO.....	57
Abbildung 38: Umsetzung der modifizierten Siloxane I mit Laccase von <i>T. hirsuta</i> (S: Substrat, E: Enzym, ES: Enzym und Substrat).....	60
Abbildung 39: Umsetzung der modifizierten Siloxane I mit Horseradish Peroxidase (S: Substrat, E: Enzym, ES: Enzym und Substrat).....	61
Abbildung 40: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen II in ethanolischer Lösung in UV-Mikrotiterplatte gleich nach Zugabe des Enzyms .....	62
Abbildung 41: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen II in ethanolischer Lösung in UV-Mikrotiterplatte nach sechs Stunden.....	62
Abbildung 42: Absorptionsspektren der Substrate 6, 2 und 9 in EtOH + Puffer zum Zeitpunkt 0.....	63
Abbildung 43: Absorptionsspektren der Substrate 6, 2 und 9 in EtOH + Puffer nach sechs Stunden..	63
Abbildung 44: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen II auf DC-Platten mit den Enzymen ThL, MtL und TviL nach Trocknen bei Raumtemperatur.....	64
Abbildung 45: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen II auf DC-Platten mit den Enzymen ThL, MtL und TviL nach Trocknen im Trockenschrank.....	65
Abbildung 46: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen II auf DC-Platten mit den Enzymen ThL, MtL und TviL nach Trocknen im Exsikkator.....	66
Abbildung 47: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen in EtOH zum Zeitpunkt 0 .....	67
Abbildung 48: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen in EtOH nach 24 Stunden .....	67
Abbildung 49: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen in EtOH + Puffer zum Zeitpunkt 0 .....	68
Abbildung 50: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen in EtOH + Puffer nach 24 Stunden.....	68
Abbildung 51: Farbreaktionen von modifizierten Siloxanen III auf DC-Platten mit den Enzymen ThL, MtL und TviL nach Trocknen im Trockenschrank.....	69

## 5.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema zur Bestimmung der Enzymaktivitäten mittels ABTS Assay.....	9
Tabelle 2: Pipettierschema für MtL in verschiedenen Lösungsmitteln.....	10
Tabelle 3: Kopplungsreaktion mit 1,4-Phenylendiamin und HRP .....	13
Tabelle 4: Kopplungsreaktion mit 1,4-Phenylendiamin und TveL.....	13
Tabelle 5: Kopplungsreaktion mit Anilin und TveL.....	14
Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für Vorversuche .....	18
Tabelle 7: Pipettierschema zur Messung der Abbauprodukte von Kristallviolett und p-OH.....	20
Tabelle 8: Optimierung der Färbemethode .....	22
Tabelle 9: Synthese der modifizierten Siloxane I .....	24
Tabelle 10: Reaktionsansatz für modifizierte Siloxane I mit ThL .....	26
Tabelle 11: Reaktionsansatz für modifizierte Siloxane I mit HRP .....	26



Tabelle 12: Ansätze für verbesserte Reaktionsbedingungen der modifizierte Siloxane .....	27
Tabelle 13: Versuch 1 – Reaktionsansatz für EtOH 75 %ig .....	27
Tabelle 14: Versuch 2 – Reaktionsansatz für 50 % EtOH in Endkonzentration .....	27
Tabelle 15: Versuch 3 – Reaktionsansatz für 80 % Acetonitril in Endkonzentration + Phosphatpuffer.....	27
Tabelle 16: Versuch 4 – Reaktionsansatz für 80 % Acetonitril in Endkonzentration + dH <sub>2</sub> O.....	27
Tabelle 17: Versuch 5 – Reaktionsansatz für Benzaldehyd .....	28
Tabelle 18: Versuch 6 – Reaktionsansatz für Mediator + EtOH.....	28
Tabelle 19: Versuch 7 – Reaktionsansatz für Mediator + Acetonitril.....	28
Tabelle 20: Versuch 8 – Reaktionsansatz für Mediator + DMSO .....	28
Tabelle 21: Synthese der modifizierten Siloxane II .....	29
Tabelle 22: Reaktionsansatz in UV-Küvetten für modifizierte Siloxane II mit Ethanol.....	30
Tabelle 23: Reaktionsansatz in UV-Küvetten für modifizierte Siloxane II mit Ethanol und Puffer.....	30
Tabelle 24: Reaktionsansatz in UV-Mikrotiterplatte für modifizierte Siloxane II mit Ethanol .....	31
Tabelle 25: Reaktionsansatz in UV-Mikrotiterplatte für modifizierte Siloxane II mit Ethanol und Puffer .....	31
Tabelle 26: Synthese der modifizierten Siloxane III.....	34
Tabelle 27: Einwaage der Substrate für modifizierte Siloxane III .....	35
Tabelle 28: Reaktionsansatz in Mikrotiterplatte für modifizierte Siloxane III mit EtOH.....	35
Tabelle 29: Reaktionsansatz in Mikrotiterplatte für modifizierte Siloxane III mit Ethanol und Puffer.....	36
Tabelle 30: Einwaage der Substrate und des Lösungsmittels für die NMR Messungen.....	37
Tabelle 31: Bekannte Enzymaktivitäten.....	38
Tabelle 32: Berechnete Enzymaktivitäten.....	38
Tabelle 33: Molekülstrukturen der Substrate 6 und 11 .....	42
Tabelle 34: Molekülstrukturen der Substrate 7, 10 und 2 .....	43
Tabelle 35: Massen/Ladungs-Verhältnisse von demethyliertem und deaminiertem Kristallviolett .....	56
Tabelle 36: ΔE-Werte der unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen .....	58
Tabelle 37: ΔE-Werte der unterschiedlichen Waschttemperaturen.....	58
Tabelle 38: ΔE-Werte nach dem Abbau des immobilisierten Farbstoffes Reactive Blue 221 mit unterschiedlichen Konzentrationen der ThL .....	59
Tabelle 39: ΔE-Werte nach dem Abbau des immobilisierten Farbstoffes Kristallviolett mit unterschiedlichen Konzentrationen der ThL .....	59
Tabelle 40: Gemessene ΔE-Werte nach Trocknen bei Raumtemperatur .....	64
Tabelle 41: Gemessene ΔE-Werte nach Trocknen im Trockenschrank.....	65
Tabelle 42: Gemessene ΔE-Werte nach Trocknen im Exsikkator .....	66
Tabelle 43: Abbau des immobilisierten Substrats 9 mit Hilfe der Myeloperoxidase nach 1, 3 und 5 Tagen .....	67
Tabelle 44: Gemessene ΔE-Werte nach Trocknen im Trockenschrank und enzymatischer Behandlung mit den Enzymen ThL, MtL und TviL.....	69
Tabelle 45: Abbau des immobilisierten Substrats 11 mit Hilfe der Myeloperoxidase nach 1, 3 und 5 Tagen .....	70
Tabelle 46: Zusammenfassung aller getesteten Substrate mit unterschiedlichen Enzymen .....	70
Tabelle 47: Vergleich der fünf Moleküle mit der Grundstruktur von Guaiacol.....	73
Tabelle 48: Verwendete Substrate für Kopplungsreaktionen.....	79
Tabelle 49: Verwendete Reaktivfarbstoffe.....	80
Tabelle 50: Konzentrationen der Farbstoffe mit TveL.....	84
Tabelle 51: Konzentrationen der Farbstoffe mit HRP.....	85
Tabelle 52: Konzentrationen der Farbstoffe mit MPO.....	86

## 6. Verwendete Materialien

### 6.1 Chemikalien

Name	MW [g mol <sup>-1</sup> ]	Hersteller
2,4-Dinitrophenylhydrazin	198,14	MERCK
2,6-Dimethoxyphenol	154,16	SIGMA-ALDRICH
3,4-Dihydroxybenzaldehyd	138,12	SIGMA-ALDRICH
3,4-Dihydroxybenzoesäure	154,12	SIGMA-ALDRICH
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	168,15	
3,4-Dimethoxybenzylalkohol	168,19	SIGMA-ALDRICH
3,4-Dimethoxyphenethylamin	181,23	SIGMA-ALDRICH
3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon	196,20	SIGMA-ALDRICH
ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)	548,68	
Alcian Blue 8GX		Polyscience
Anthron	194,23	MERCK
Astrazon Blau BG 200% 01		DyStar
Catechol	110,11	SIGMA-ALDRICH
Cibacron Blue 3G-A	774,16	SIGMA-ALDRICH
Coomassie Brilliant Blue G 250	854,02	SERVA
Disperse Red 60	331,331	DyStar
Eosin B (bläulich)	624,09	MERCK
Ethyl-4-hydroxy-3-methoxycinnamate	222,24	SIGMA-ALDRICH
Fast Blue BB Base	300,35	SIGMA-ALDRICH
Fast Red B Salt	467,43	SIGMA-ALDRICH
Ferulasäure	194,18	ROTH
Guaiacol	124,14	SIGMA-ALDRICH
Guaiacolsulfonsäure	242,30	SIGMA-ALDRICH
Indigocarmin	466,35	MERCK
Kaffesäure	180,16	
Kristallviolett	407,98	SIGMA-ALDRICH
Orange IV	375,38	SIGMA-ALDRICH
Pararosanilin	305,37	SIGMA-ALDRICH
Patentblau V Calciumsalz	579,71	SIGMA-ALDRICH
Procion Blue MX-R	637,43	SIGMA-ALDRICH
Reactive Black 5	991,82	SIGMA-ALDRICH
Remazol Brilliant Blue R	626,54	SIGMA-ALDRICH
Vanillin	152,15	MERCK

Victoria Blue B	506,10	SIGMA-ALDRICH
TRIS HCl Ultra Quality		ROTH
Natriumacetat		
HOBT		
APTS		
Kaliumdihydrogenphosphat		ROTH
Dinatriumhydrogenphosphat wasserfrei		ROTH
Laccase		FLUKA
HRP		SIGMA
DMSO trocken		
DMP		
DMAP		
DCC		
AMTES		

## Reference List

- [1] How An Enzyme Works. Blair A. H. *Clinical Biochemistry*. 1976. 155-159
- [2] Application of biotechnology in textiles. Muthu Manickam M and Ganesh Prasad J. *Colourage*. 2005. 41-48
- [3] Study of dye decolorization in an immobilized laccase enzyme-reactor using online spectroscopy. Kandelbauer A., Maute O., Kessler R. W., Erlacher A. and Gübitz G. M. *Biotechnol. Bioeng.* 2004. 552-563
- [4] Laccase-catalyzed decolorization of the synthetic azo-dye Diamond Black PV 200 and of some structurally related derivatives. Kandelbauer A., Erlacher A., Cavaco-Paulo A. and Guebitz G. M. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2004. 331-339
- [5] Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-angstrom resolution containing a full complement of coppers. Piontek K., Antorini M. and Choinowski T. *Journal of Biological Chemistry*. 4-10-2002. 37663-37669
- [6] Mechanism of horseradish peroxidase-catalyzed heme oxidation and polymerization (beta-hematin formation). Trivedi V., Chand P., Maulik P. R. and Bandyopadhyay U. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*. 25-5-2005. 221-228
- [7] Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. Veitch N. C. *Phytochemistry*. 2004. 249-259
- [8] Two-electron reduction and one-electron oxidation of organic hydroperoxides by human myeloperoxidase. Furtmuller P. G., Burner U., Jantschko W., Regelsberger G. and Obinger C. *Febs Letters*. 3-11-2000. 139-143
- [9] Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. Podrez E. A., Abu-Soud H. M. and Hazen S. L. *Free Radical Biology and Medicine*. 15-6-2000. 1717-1725
- [10] The Halide-Complexes of Myeloperoxidase and the Mechanism of the Halogenation Reactions. Bakkenist A. R. J., Deboer J. E. G., Plat H. and Wever R. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1980. 337-348
- [11] Biodegradation of crystal violet by a *Shewanella* sp NTOU1. Chen C. H., Chang C. F., Ho C. H., Tsai T. L. and Liu S. M. *Chemosphere*. 2008. 1712-1720
- [12] Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase. Casas N., Parella T., Vicent T., Caminal G. and Sarra M. *Chemosphere*. 2009. 1344-1349
- [13] Biodegradation of triphenylmethane dyes. Azmi W., Sani R. K. and Banerjee U. C. *Enzyme and Microbial Technology*. 15-2-1998. 185-191
- [14] Enzymatic reduction and oxidation of fibre-bound azo-dyes. Pricelius S., Held C., Sollner S., Deller S., Murkovic M., Ullrich R., Hofrichter M., Cavaco-Paulo A., Macheroux P. and Guebitz G. M. *Enzyme and Microbial Technology*. 1-6-2007. 1732-1738
- [15] Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517. Shedbalkar U., Dhanve R. and Jadhav J. *Journal of Hazardous Materials*. 15-9-2008. 472-479
- [16] Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K. H., Cavaco-Paulo A. and Guebitz G. M. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. 3357-3362
- [17] Influence of structure on dyedegradation with laccase mediator systems. Almansa E., Kandelbauer A., Pereira L., Cavaco Paulo and Guebitz G. M. *Biocatal. Biotransform.* 2004. 315-324

- [18] Degradation of azo dyes by oxidative processes - Laccase and ultrasound treatment. Tauber M. M., Gubitz G. M. and Rehorek A. *Bioresource Technology*. 2008. 4213-4220
- [19] Potential applications of peroxidases. Hamid M. and Khalil ur R. *Food Chemistry*. 15-8-2009. 1177-1186
- [20] Enzymatic coating of lignocellulosic surfaces with polyphenols. Schroeder Marc, Aichering Nina, Guebitz G. M. and Kokol Vanja *Biotechnol.J.* 2006. 334-341
- [21] Ligninolytic enzymes of white-rot fungus *Phlebia radiata*. Niku-Paavola M. L., Karhunen E., Salola P. and Raunio V. *Biochem J.* 1988. 877-884
- [22] Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis. Le Berre V., Trevisiol E., Dagkessamanskaia A., Sokol S., Caminade A. M., Majoral J. P., Meunier B. and Francois J. *Nucleic Acids Research*. 15-8-2003.
- [23] Comparative Studies of Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate) by Enzymes and Chemical Methods. Brückner T. 2007.