فصلنامهٔ علمی – پژوهشی تحقیقات علوم چوب و کاغذ ایران
جلد ۲۷، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۹۳-۲۷۵، (۱۳۹۱)

کاربرد بیوتکنولوژی در صنایع چوب: استفاده ازآنزیم لاکاز جهت فعال‌سازی لیگنین موجود در گیاه به عنوان چسب های قابل تجدید شدن در ساخت MDF

علیرضا خرازی پور[۱] و ندا نیک وش[۲*]

۱- استاد دانشگاه جورج آگوست گوتینگن-آلمان، دپارتمان بیوتکنولوژی مولکولی چوب و تکنیکال مایکولوژی.
۲*- نویسنده مسئول، دانشجوی دکترا، رشته بیوتکنولوژی صنعتی دانشگاه جورج آگوست گوتینگن.
پست الکترونیک: nikvash_n@yahoo.com

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۰

چکیده

در این تحقیق تاثیرآنزیم فنول اکسیداز بر روی لیگنین موجود در دیواره گیاهان صنعتی مورد استفاده در صنایع چوب اروپا و امکان استفاده و بهره‌برداری از آن به‌عنوان چسب بیولوژیک مورد بررسی قرار گرفته است. ازفیبرهای نوعی کاج جنگلی(*Pinus sylvestris*) برای تولیدMDF در دو فرایند خشک و تر مورد استفاده قرارگرفت. انکوباسیون فیبرها با لاکاز صنعتی از قارچ *Trametes versicolor*، در فرایند تر در محلول سوسپانسیون صورت گرفت و در فرایند خشک آنزیم بر روی فیبرها اسپری شد. هر دو نوع آنزیم لاکاز بدون مدیاتور و با مدیاتور به‌کاررفته تأثیر اساسی بر روی بهینه‌سازی خواص فیزیکی و مکانیکی MDF تولید شده داشت و همه آنها حداقل استاندارد را کسب کردند. شرایط، شامل غلظت آنزیمی ۱۰۰ U/ml و در طی انکوباسیون آنزیم و ۱۰ mM مدیاتور٤- هیدروکسی بنزوئیک‌اسید ۹۸٪ زمان مناسب انکواسیون ۱۵-۱۰ دقیقه و اسیدیته ٥/٦ (PH=٥/٦)، شرایطی کاملاً مناسب برای تولید تخته‌هایی با دانسیته متوسط به‌شمار می‌رود بررسی از عکس‌های میکروسکوپی الکترونی حاکی از تولید پلیمرهای فنولیک حاصل از تأثیر آنزیم لاکاز بر روی لیگنین و تولید زیادتر رادیکال‌های آزاد در آن، توسط مدیاتور است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم فنول اکسیداز، چسب بیولوژیک، پلیمرهای فنولیک، خصوصیات فیزیکی ومکانیکی MDF.

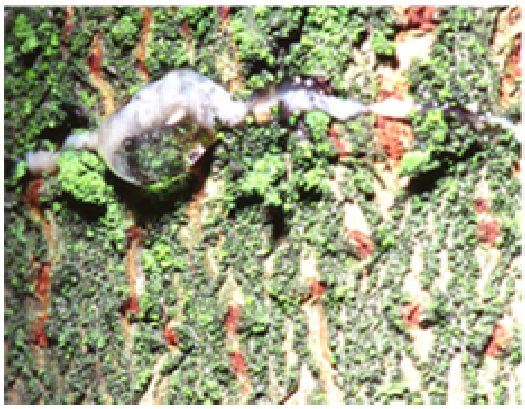
مقدمه

ظهور اولین گیاهان خشکی روی زمین در اواسط دوره پالئوزوئیک بین ۳٦۰ و ٤۸۰ میلیون سال پیش بوده است. ترک دریاها و جاگرفتن بر روی خشکی‌ها با تکامل سیستم انتقال‌دهنده گیاهان برای جابجایی آب و مواد غذائی امکان‌پذیر گردید. این سیستم به‌وسیله آوندها و دیواره سلول چوبی گیاهان که به خوبی قادر به انتقال وایجاد شکل مستقیم در گیاهان چوبی شدند، امکان‌پذیر شده است. این سیستم

سبب ایجاد ساقه راست و مستقیم در گیاهان و در نتیجه پیدایش درختان چوبی گردید. چوب یک ماده آلی است که به عنوان ماده اولیه ساقه‌ها و گیاهان چوبی شامل درخت‌ها و درختچه‌ها و... شناخته شده است(Bowyer et.al, 2003). این ماده آلی در همه گونه‌ها و جنس‌ها از سلولز، همی‌سلولز، لیگنین، مواد معدنی و استخراجی تشکیل شده و در یک ساختمان سلولی فرم گرفته‌اند. به طور طبیعی همه این پلیمرها مسئول خواص عمده مکانیکی و فیزیکی چوب هستند (Rowell, 1988; Saka, 2001). لیگنین سومین ترکیب فراوان در چوب است (Reale *et al.*, 2004) و بعداز سلولز فراوان‌ترین و مهمترین ترکیب از زیست توده گیاهی محسوب می‌شود. حدود سیصد میلیارد تن از این ماده در بیوسفر روی کره زمین وجود دارد که در این میان بیست میلیارد تن دوباره‌سازی می‌شود (Glasser & Kelly, 1987). این ماده تا به امروز، توصیف‌ناپذیر باقی‌مانده (Reale *et al.*, 2004) زیرا امکان دست نخورده ماندن آن در طی استخراج طبیعی، بدلیل روش‌های ناکافی فیزیکی و شیمیایی مقدور نیست. اگر چه همه محققین موافق‌اند که این ترکیب یک ماکرومولکول آمورف(بی‌شکل و بی‌نظم) است که اکثرا از واحدهای فنیل پروپان درست شده است و توسط اتر و باندهای کربن–کربن پیوند یافته است (Reale, *et al.*, 2004; Mohan, 2006; Sjöström, 1993). در صنعت چوب در سراسر دنیا، بیش از ۵۰ میلیون تن از لیگنین به‌طور سالانه به‌عنوان مواد زاید در تولید خمیر کاغذ بوجود می‌آید و فقط از حداکثر ده درصد آن به طور صنعتی استفاده شده و بقیه آن به منظور تولید انرژی حرارتی سوزانده می‌شود (Kharazipour *et al.*, 1991; Gosselink *et al.*, 2004). لیگنین برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ به صورت نیمه صنعتی به‌عنوان چسب در صنعت چوب و نئوپان‌سازی مورد استفاده قرار گرفت (Pedersen & Rasmussen, 1966; Roffael & Rauch, 1971). همان طور که اشاره شد، چوب ازسه ماده اصلی لیگنین، همی‌سلولز و سلولز ساخته شده است و این پلیمر نه تنها در دیواره سلولی توزیع شده است بلکه در لایه‌های مختلف دیواره سلولی آنهم در مقادیر و ترکیب‌های متفاوت وجود دارد و لاکاز از دیرباز به‌عنوان یکی از آنزیم‌های مهم و مؤثر بر تخریب پلی‌مر لیگنین در سلول گیاهی شناخته شده است.

فکر اولیه فن استفاده از لاکاز، از تولید لاکور برگرفته شده که بسیار باستانی بوده و تاریخچه چندین هزار ساله دارد. به‌خصوص درآسیای جنوب شرقی عمدتاً در ژاپن این ماده بیشتردر مصارف خانگی و جهت دکوراسیون بکار می‌رفته است این فن یکی از قدیمی‌ترین فن‌های بیوتکنولوژیکی است که تاکنون شناخته شده است (Kharazipour *et al.*, 1997). از طرفی اولین بیوتکنولوژی است که برای ساختن تولیدات غیر خوراکی آنهم در دو هزار سال قبل از تولید کاغذ ازگیاه پاپیروس (از دیگر محصول‌های بیوتکنولوژی) در مصر باستان، مورد استفاده قرارگرفته است (Hüttermann *et al.*, 1995). لاک یک کمپلکس لیگنوسلولزی است که در دیواره سلولی با ترکیب کربوهیدرات و فنول با استفاده از یک آنزیم فنول – اکسیداز (Lacasse) بدست می‌آید (Watt & Ford, 1991) چینی‌ها این ماده تراوش یافته به بیرون از پوسته را از درخت لاکور (*Rhus vernicifluum*) بدست می‌آورند. تنه این درخت را جراحت داده و شیره به بیرون ترشح می‌کند. ماده مترشحه از

تنه این گیاه شامل ٦٠ تا ٦٥ درصد اروشیول (Urushiol)، ٦/٥ تا ١٠ درصد کربوهیدرات، ٠/١ تا ١ درصد آنزیم لاکاز و ٢٠ تا ٣٠ درصد آب می‌باشد (Kumanotani, 1998). اروشیول از سمی‌ترین ترکیب‌هایی پلی‌فنولی است که در گیاهان تاکنون شناخته شده است، و یک مخلوط عالی برای گیاهان جهت مقابله با حشرات، قاچ‌هاو پاتوژن‌هاست. در حضور اکسیژن هوا، ماده مترشحه جمع‌آوری شده صاف شده و روی یک سطح چوبی یا پارچه پاشیده می‌شود (Du, 1988). فرآیند خشک کردن و اکسیداسیون در حضوراکسیژن هوا و رطوبت بالا صورت می‌گیرد. اروشیول به‌وسیله دو عامل بالا اکسیده می‌گردد: بخش‌های فنولیک با لاکاز و باندهای غیر اشباع در انتهای زنجیره مستقیماً با اکسیژن هوا اکسیده می‌شود (Kumanotani, ١٩٨٨)(عکس ١ و ٢).



شکل ١- استفاده از لاکور در صنایع دستی **شکل ٢- شیره تراوش شده از تنه درخت Rhus vernicifluum**

که این نوعی پلیمرشدن لیگنین در محیط داخل موجود زنده(گیاهان) است. آنزیم‌های ردوکس بر روی لیگنین سبب ایجاد گروه‌های فعال و در نتیجه ایجاد باندهای طبیعی چسبنده در لیگنین می‌گردد. آنزیم‌های فنول اکسیداتیوهای مختلف برای فعال‌کردن لیگنین چوب مورد آزمایش قرار گرفته است. من جمله: لاکازهای مختلف، تیروزینازها از قارچ‌های مختلف، پراکسیداز گیاه خردل (*Armoracia rusticana*) وترب .لاکاز و پراکسیدازها هردو سبب تشکیل رادیکال‌های فنوکسی می‌شوند (در انکوباسیون با لیگنین). لاکاز مورد استفاده در این تحقیق قارچ *Trametes versicolor* (قارچ رنگین‌کمان) بوده است که می‌تواند با لیگنین در مرحله فیبر واکنش انجام دهد (Grönquist *et al.*, 2003; Kharazipour *et al.*, 1997; Kharazipour &Hüttermann,1998). قارچ رنگین کمان جزو قارچ‌های پوسیدگی سفید می‌باشد این قارچ‌ها به طور گسترده‌ای قادر به معدنی کردن (تبدیل به دی‌اکسیدکربن) وتخریب پلیمر لیگنین هستند. این قارچ‌ها ترکیبهای متنوعی از آنزیم‌های خارج سلولی (extra cellular) لیگنین

پراکسیداز/پراکسیداز منگنز و لاکاز را تولید می‌کند که نقش مهمی را در تخریب لیگنین دارند (Rehm & Präve, 1994). در استفاده از یک کاتالیزور به مواردی چون زیر باید توجه شود: ۱) آنزیم بایستی قابل تولید در یک ماده بسترکشت ارزان در مقیاس بالا باشد. ۲) بعد از تولید قابل نگهداری باشد بدون اینکه از میزان خواص و فعالیت آن کاسته شود. ۳) بایستی قابل استفاده در فرم خام بدون خالص‌سازی پرهزینه باشد. ٤) دارای قابلیت ثبات و پایداری قابل قبول در دمای اتاق بوده تا جهت کار و بررسی در کارخانه‌های ساخت فرآورده‌های چوب مناسب باشد. ٥) مهمترین اینکه آنزیم باید قابلیت تحمل دمای بالا را داشته تا بتواند فعالیت خود را در زمان گرم کردن با مواد فیبری حفظ کند.

در این مورد به خصوص لاکاز نسبت به پراکسیداز دارای ارجحیت است. لاکاز برای اکسیداسیون به اکسیژن نیاز دارد در حالی که پراکسیداز به H_2O_2. دمای بهینه واکنش برای پراکسیدازها بین ٤٥-۳۰ درجه است (Yang *et al.*, 2005). در صورتی که این محدوده برای لاکاز ٦۰-۵۰ درجه سلسیوس است. و قادر به تولید در مقادیر زیاد است. لاکاز در حالت خام می‌تواند در مجاورت هوا با لیگنین و ترکیب‌های لیگنینی واکنش داده (Kharazipour & Hüttermann, 1993) و بسیار پایدار است و می‌تواند برای مدت طولانی ذخیره شود (Baldrian, 2006).

اخیراً تلاش‌های زیادی برای جایگزینی چسب‌های صنعتی توسط چسب‌های بیولوژیک (زیستی) بخصوص در صنایع تولید تخته خرده‌چوب و فیبر گردیده است (Pizzi, 2000 و Kharazipour & Euring, 2006; Nikvash et al, 2010; 2010). در این تحقیق علاوه بر دنبال کردن هدف فوق به تأثیر یک مدیاتور(واسطه شیمیایی) جهت تولید گروه‌های فعال و بهبود اتصال بین فیبرها و اتصال‌های عرضی پرداخته شده و این هر دو برای تولید تخته‌فیبر متناسب با محیط زیست و کمترمتصاعد کننده فرم‌آلدئید است.

مواد و روشها

تکنیک‌های مورد استفاده از آنزیم در تهیه چسب‌های بیولوژیک

برای استفاده از آنزیم به‌عنوان چسب از دو روش استفاده می‌شود:

۱- روش یک ترکیبی (one compound method): در این روش ، تنها ترکیب اضافه شده به فیبر، آنزیم می‌باشد. لیگنین داخل ساختمان چوب در اثر آنزیم، فعال شده وتبدیل به رادیکال فنوکسی می‌شود (Widsten *et al.* 2003, 2004; Kharazipour & Hüttermann, 1993). در این تحقیق از متد یک ترکیبی استفاده شد. تخریب پلی‌مر لیگنین موجود در الیاف در مجاورت هوا و بوسیله آنزیم سبب تولید رادیکال‌های فنوکسی می‌گردد که این فنوکسی رادیکال‌ها در مرحله بعدی در اثر حرارت پرس، مجددا الیاف را با پیوند شیمیایی بهم می چسباند.

۲- روش دو ترکیبی (two compound method): لیگنین همراه با آنزیم سبب ایجاد یک ترکیب دو واحدی به‌عنوان چسب میگردد. لیگنین مورد استفاده از کارخانه

های کاغذسازی تهیه می‌شود و به‌عنوان مازاد در مرحله لیگنین‌زدایی استخراج می‌شود که به لیگنین صنعتی (سولفیت و یا سولفات لیگنین) معروف است.

برای تهیه آنزیم از کشت قارچ رنگین‌کمان (*Trametes versicolor*) در محیط کشت L1 استفاده شد. نمونه تجاری استاندارد *T.versicolor* (L: Fr. , LIoyd) نگهداری شده در آگار مالت مورد استفاده قرار گرفت.

روشها

از نمونه تجاری فوق الذکر، یک پانچ برداشته ودر بشرهای حاوی محیط کشت L1 قرار داده شدند. این بشرها به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در اتاق رشد نگهداری شدند. محیط کشت شامل مواد نشان داده شده در جدول ۱ است.

جدول ۱- مقدار و مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت L1

محیط کشتL1- آگار	
آگار	۱۵ g
گلوکز	۱۰ g
L-آسپاراژین	۲/۵ g
فسفات دی هیدروژن پتاسیم	۰/۵ g
آب7،سولفات منیزیم،	۰/۵ g
فنیل آلانین -D2	۰/۱۵ g
مخمر	۰/۵ g
محلول مقادیرکم فلزات L_1	۱۰ ml
همه ترکیبات در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب به حجم میرسند	

برای تهیه مایع تلقیح، پنج دیسک (به قطر ۱ سانتیمتر) از لبه‌های میسلیوم‌های رشد یافته از بشرها جدا شده و در ارلن مایرهای ۵۰۰ میلی‌لیتری(در مجموع ۱۰ عدد) که هر کدام شامل ۲۰۰ میلی‌لیترمحیط کشت است، قرار داده شد. برای هموژنیزه کردن از دستگاه اولتراتوراکس(Typ 18/10, Fa.Janke & Kunde) با قدرت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ٦۰ ثانیه استفاده شد. سپس مستقیماً از ارلن ها به فرمانتور (بیوراکتورها- تصویر شماره ۳) که شامل ۳۰ لیتر محیط کشت با pH مساوی ۵/٦ و حاوی اکسیژن در شرایط استریل، انتقال گردید. مدت انکوباسیون ۵ روز و دمای آن ۲۵ درجه سانتیگراد بود. برای تحریک (stimulation) ترشح قارچ از ۲- ۵- اکسیلیدین با فرمول شیمیایی 2-5-DIMetylalanin Dime به مقدار 10^{-4}mM استفاده شد. فعالیت آنزیم بوسیله مونیتورینگ اکسیداسیون نمک دی آمونیوم از ۲,۲- ازینوبیس- ۳- اتیل بنزوسیازولین - ٦- سولفونیک اسید (ABTS) (Matsumura *et al.*, 1986) تعیین شد. فعالیت لاکاز در حدود (ABTS) ۲۲۰۰ U/ ml بود.

مراحل بعدی در این تحقیق شامل ساخت MDF به شرح زیر می‌باشد:

- ساخت MDF با لیگنین فعال شده توسط آنزیم لاکاز
- ساخت MDF با لیگنین فعال شده توسط آنزیم لاکاز بعلاوه مدیاتوریا واسطه های شیمیایی

شکل ۳- فرمانتور جهت تهیه لاکاز از قارچ پوسیدگی سفید در دپارتمان بیوتکنولوزی مولکولی چوب دانشگاه گوتینگن

در این مرحله از خرده چوب یک گونه کاج (*Pinus silvestris*) جهت تهیه الیاف استفاده شده است. برای تهیه فیبر از خرده چوب از روش TMP (Termo-mecanical Pulp) در دمای ۱۸۰ درجه سانتیگراد وفشارbar ۸-٦ استفاده شد به این طریق که ابتدا خرده چوب‌های مورد نظر توسط یک دستگاه بخارزن، بخارزنی شد و پس از تخلیه با استفاده از یک پالایشگر با قطر ۲۵ سانتی‌متر و دور موتور ۱٤٥۰ دور در دقیقه طی ۳ مرتبه، پالایش و تبدیل به الیاف گردیدند. الیاف مورد نظرتا رسیدن به رطوبت ٦ درصد خشک گردیدند. الیاف با لاکاز در حضور اکسیژن با سیستم اجزای یک ترکیبی فرآوری گردید: در بار اول بدون مدیاتوربا(زمان انکوباسیون طولانی ۲ ساعت) و در بار دوم با مدیاتور(مدت انکوباسیون ۱۰ الی ۱۵ دقیقه) در دو پروسه خشک و تر فیبرها کاملاً مخلوط گردیدند. برای مخلوط کردن مدیاتور٤-هیدروکسی بنزوئیک اسید با درصد خلوص ۹۸٪ محلولی با درصد ٥ گرم در یک لیتر آب تهیه گردید. در این بررسی از هر کدام تیمار لاکاز همراه و بدون مدیاتور در دو پروسه خشک و تر جمعاً ٤ تیمار حاصل و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. بعداز آبگیری شدن این تخته‌ها، کیک الیاف تشکیل شده و وارد مرحله پرس شدند. در این مرحله با استفاده از پرس گرم اقدام به فشردن کیک الیاف و ساخت تخته فیبرها در دمای ۲۰۰ درجه سلسیوس گردید. مدت پرس ۲/٥ دقیقه محاسبه شده بود و در مجموع ۱۲ تخته در مقیاس تکنیکی ساخته شدند. جدول ۱ شرایط ساخت تخته‌ها از فیبرهای تحت تیمار آنزیمی را نشان می‌دهد.

بعد از پایان مرحله پرس، برای تعیین ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی تخته‌ها مطابق استاندارد N- 622- 5 2006 نمونه‌های آزمونی تهیه گردید. مقاومت‌خمشی(MOR)، مقاومت‌چسبندگی داخلی(IB) و واکشیدگی ضخامت(TS) بعداز ۲ و ٢٤ ساعت غوطه‌وری در آب تخته‌های ساخته شده تعیین گردید.

بعد از انجام آزمایش‌های مکانیکی و فیزیکی بر روی نمونه‌های تهیه شده، نتایج حاصله در قالب طرح کامل تصادفی آزمون فاکتوریل و با استفاده از آزمون دانکن و به کمک تکنیک تجزیه واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جدول ۱- شرایط ساخت MDF از فیبرهای کاج بعد از تیمار آنزیمی در محلول آب‌دار با لاکاز قارچ (*Trametes versicolor*)

*1U=μ mol / min

گونه مورد استفاده برای تهیه الیاف (%)	زمان پرس (min/mm.)	فشار (Pa)	دانسیته (g/cm3)	ضخامت (میلیمتر)	دمای پرس (°C)	مدت انکوباسیون (min)	مقدار چسب		نوع چسب
							لاکاز U/ml	مدیاتور mM	
۱۰۰٪ کاج	۲۰	۸	۰/۸۰	۸	۲۰۰	۱۲۰	۱۰۰		لاکازبدون مدیاتور
	۲۰	۸	۰/۸۰	۸	۲۰۰	۱۰-۱۵	۱۰۰	۱۰	لاکاز با مدیاتور

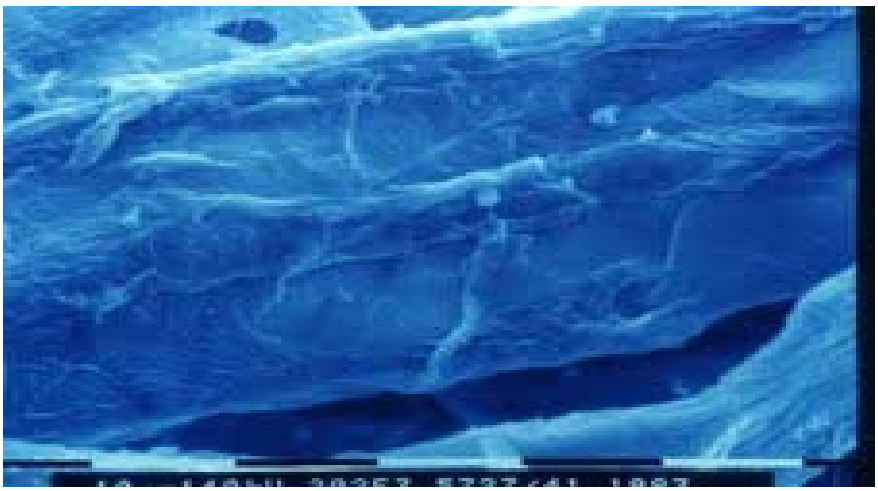
مطالعه‌های میکروسکوپی

با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، تأثیر آنزیم لاکاز بر روی فیبرها قبل و بعداز مخلوط شدن با آنزیم لاکاز *Trametes v.* مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی آناتومیکی اقدام به تهیه برش میکروتوم از فیبرها به صورت طولی گردید. بعداز تهیه برش‌ها، با میکروسکوپ الکترونی SEM انجام گرفت.

بحث

ساخت MDF در مقیاس تکنیکی در غلظت ۱۰۰ U/g با فرایند خشک و تر انجام شد و خواص تکنیکی این تخته‌ها با ضخامت ۸ میلیمتر ساخته شده از فیبرهای تیمار شده در اسیدیته مساوی ۵/٦ با لاکاز و لاکاز به‌علاوه مدیاتور ٤- هیدروکسی بنزوئیک اسید بررسی شد. در تیمار آنزیمی تخته‌ها به مدت ۲/۵ دقیقه و در دمای ۲۰۰ درجه‌سلسیوس پرس شدند. خواص فیزیکی و شیمیایی براساس (۲۰۰٦) ۵- ٦۲۲ -EN آزمایش شدند.

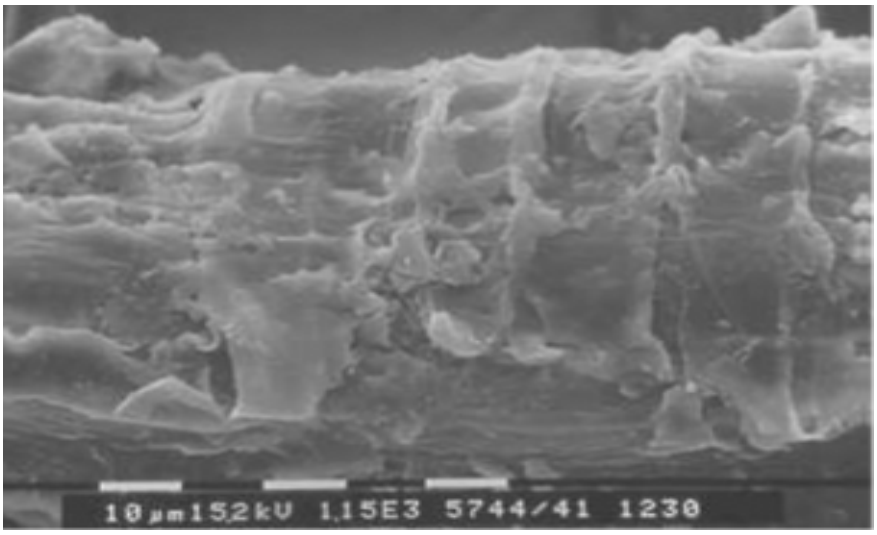
بررسی فیبرها با میکروسکوب الکترونی نشان داد که مراحل جداسازی الیاف رفاینرها در حرارت بالای پالایشگر (۱۸۰ °C) سبب ایجاد یک سطح تغییریافته بر روی فیبرها گردید. تصویر لیگنین موجود روی فیبر چوبی قبل از قرار گرفتن تحت تأثیر گرما و فشار در شکل ٤ با میکروسکوپ الکترونی نمایش داده شده است. گرما سبب پلاستیفیکاسیون لیگنین موجود در لایه میانی دیواره سلولی شده در نتیجه این ماده از روی فیبرها در زمان مراحل دفیبره شدن جدا می‌شد. بعد از خشک شدن وقتی دما از ۱۸۰ درجه به ٤۰ درجه سانتیگراد بتدریج نزول می‌یابد، لیگنین دوباره سخت شده (در صورت توقف پروسه) و یک قشر سخت و شکننده شیشه‌ای (صیقلی) بر روی سطح فیبرها ایجاد می‌نماید. علاوه بر این گرما همراه با فشار سبب یک تغییر شیمیایی روی لیگنین می‌گردد همان طور که بر روی همی‌سلولز تغییرات مشابه‌ای مشاهده می‌گردد (sun *et al.*,۱۹۹۹).



شکل ٤ – عکس میکروسکوپ الکترونی از لایه لیگنین موجود روی فیبر چوبی قبل از قرار گرفتن تحت تأثیر گرما و فشار

شکافنده‌های هیدرولیتیکی، باندهای اتر و شکافنده‌های همولیتیکی باندهای کوئووالانسی را تجزیه کرده و تولید مولکول‌هایی با وزن‌های سبکتر و قطعات کوچکتر از لیگنین و نیز جابجایی لیگنین از لایه‌های داخل سلول به سطح فیبرها می‌شوند. این لیگنین جدا شده از سطح فیبرهای ایزوله شده، امکان و شرایط مناسب برای فعالیت آنزیم‌های دخیل در واکنش را فراهم می‌آورد. استفاده از آنزیمهای ردوکس، بوسیله تشکیل گروهای فعال، قشر لیگنین را تغییر داده و می‌تواند سبب افزایش قدرت (نیروهای) چسب طبیعی لیگنین شود (شکل ٦). به‌طور مشابه، نشان داده شده که لاکازها و پراکسیدازهای مختلف، می‌توانند لیگنین را فعال کرده و باعث ایجاد رادیکال‌های فنوکسی در آن شوند (Kharazipour, 1994 & 1997).

شکل۵- زدودن کامل آنزیماتیکی لیگنین از سطح چوب بعداز انکوباسیون دراز مدت



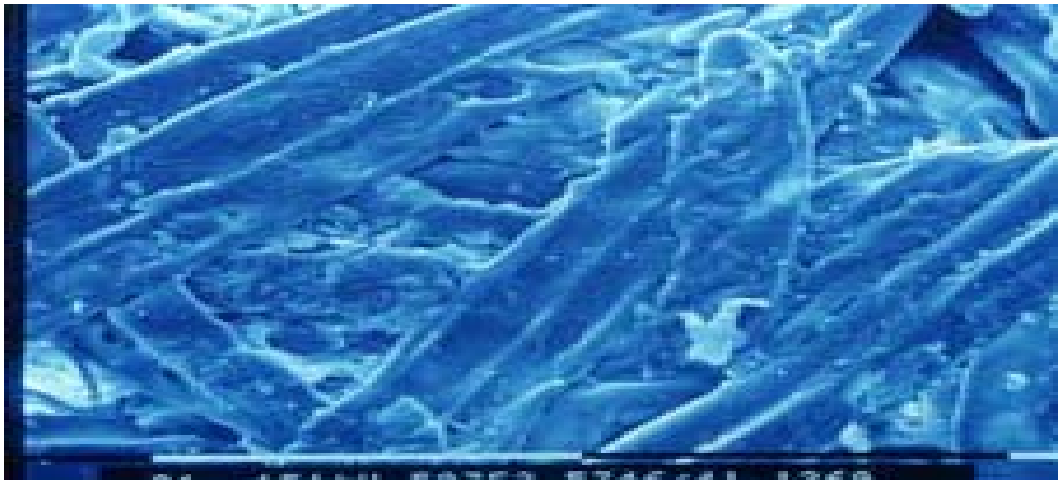
شکل ٦- پلاستیفیکاسیون و جابجایی لیگنین از لایه‌های داخل سلول به سطح فیبرها بعداز انکوباسیون کوتاه مدت

معاینه و بررسی دقیق از فیبرهای تیمارشده با لاکاز بوسیله میکروسکوپ الکترونی نشان داد که کبره‌ها یا قشرهای لیگنین بر روی سطح فیبرها نرم و شل شده بعد از چند ساعت انکوباسیون به طور کامل زدوده می‌شود (شکل ۵) ولی انکوباسیون کوتاه‌مدت تنها سبب پلاستیفیکاسیون، نرم شدن و جابجایی آن می‌گردد (شکل ٦). در منابع اشاره شده که لاکازها و پراکسیدازها وقتی با لیگنین انکوباسیون می‌شوند هردو سبب ایجاد رادیکالهای فنوکسی می‌شوند (Kharazipour, 1998 ۲۰۰۵). و نیز گزارش شده که تیمار آنزیمی فیبرهای چوبی سبب ایجاد رادیکالهای فنوکسی در بستر لیگنین می‌شوند (Euring *et al*., 2011).

برای تولید کمپوزیت‌های چوبی هدف زدودن کامل آنزیماتیکی لیگنین از سطح چوب نیست (شکل۵)، بلکه بدست آوردن حداکثر درجه نرم و شل شدن لیگنین سطح فیبرها و بدست آوردن لیگنین دپلیمره است (شکل ٦).

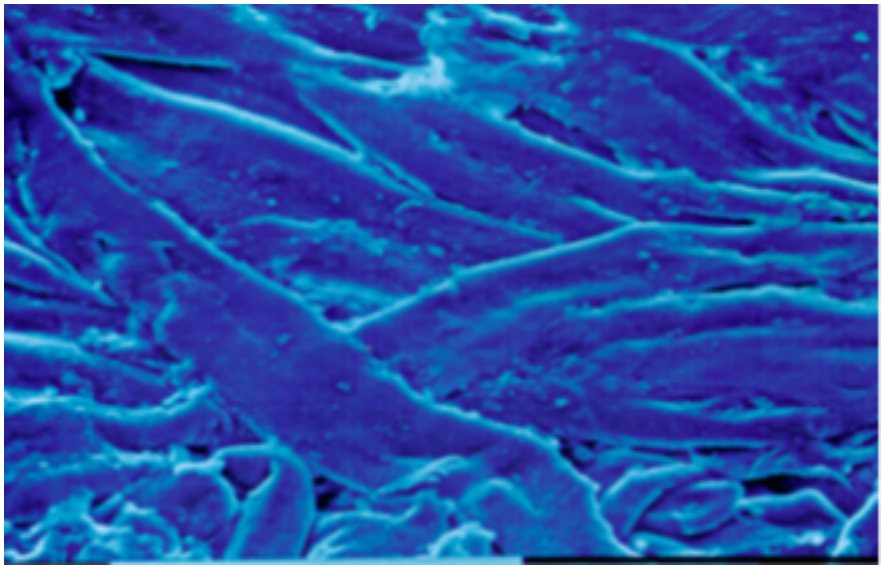
بررسی‌ها نشان داده، تیمار فیبرهای چوبی در یک بافر با لاکاز صنعتی از *Trametes versicolor* سبب آزادسازی تدریجی مقادیر بالای اکسیدازها از قطعات لیگنین به محیط محلول می‌شود (Kharazipour *et al*,1997,1998b). در این آزمایش از pH=۵/٦ استفاده شد، زیرا در این اسیدیته، قطعات لیگنین دارای وزن مولکولی کمتری (۲ کیلو دالتون) نسبت به pHهای اسیدی تر داشتند (در اسیدیته مساوی ٤/۵، وزن مولکولی بیشتر، حدود ۳/٦ کیلودالتون (kDa) می‌باشد (Kharazipour & Hütermann 1993, Grönqvist, *et al*,2005).

سرعت جدا شدن و آزادسازی لیگنین از سطح فیبرها بستگی به میزان فعالیت آنزیمی در محلول دارد، تا اجازه دهد بهترین فعالیت از نیروهای «خود چسب» (auto-adhession) در تولید تخته‌ها شکل‌گیرد. به این منظور از سیستم اجزا یک ترکیبی برای واکنش صحیح و بهینه سطح فیبرهای چوبی با لیگنین موجود در چوب طبیعی و رها شده بوسیله فعالیت پراکسیداز و لاکاز به‌عنوان کاتالیزور بیولوژیک استفاده می‌شود. در تخته‌های ساخته شده، فیبرها در تماس خیلی نزدیک شبیه تماس فیبرها در بافت طبیعی بودند (شکل۷) تصاویر میکروسکوپ الکترونی فیبرهای باند شده با آنزیم نشان می‌دهد که قشر نازک و متداومی از لیگنین در عرض فیبرها تشکیل شده است که این نشان‌دهنده ذوب شدن لیگنین در طی پرس و ایجاد غشا نازک پیوسته‌ای روی سطح فیبرها در حین خشک شدن است (Kharazipour *et al*.,1998). بسته شدن مجدد لیگنین در پروسه خشک محکمتر از پروسه‌تر بود. در حالی که دیده می‌شود تخته‌های ساخته شده از چسب‌های معمولی (چسب‌های پتروکمیکال) فقط دارای اتصالات نقطه‌ای (مقطعی) انهم در بعضی نقاط است. این مطالعه به طور قطع می‌توان استنتاج کرد که تیمار آنزیمی می‌تواند خصوصیات سطحی فیبرها را تغییر دهد هرچند که این تغییرات حتی با استفاده از تکنیک‌های حساسی مانند FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) برای تشخیص تغییرات انفرادی در توده مواد لیگنوسلولزی، به آسانی مقدور نیست (Müller *et al.* 2009).



شکل ۷- تصویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) از فایبر بردهای تولید شده از چوب کاج با لاکاز قارچ رنگین کمان (Trametes Versicolor)

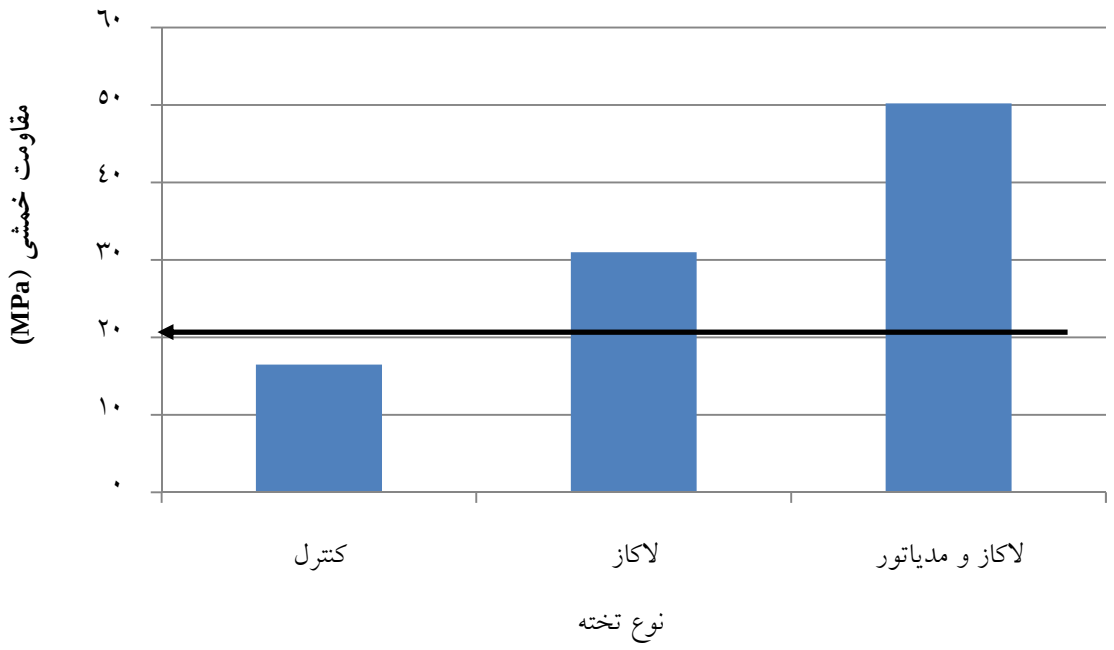
از آنجائی که مقدار رادیکالهای تولید شده لاکاز به وضوح بر روی خصوصیات تخته‌ها تأثیر می‌گذارد یک راهبرد مشخص برای اپتیمایز (بهینه) کردن شرایط،"تولید رادیکال" می‌باشد (Euring *et al.*, 2011). برای این منظور باید زمان انکوباسیون به اندازه‌ای باشد که سبب فعالیت لیگنین شده ولی نباید خیلی طولانی باشد که به حضور کافی ترکیبات لیگنین بر روی سطوح فیبر خللی وارد شود (چنانچه در شکل ۵ دیده شده نباید لیگنین کاملاً از روی فیبر زدوده شود). و استفاده از pH بهینه برای فعالیت بالای آنزیم و بهینه کردن شرایط،" تولید رادیکال لازم است. راهبرد دیگر استفاده از مدیاتورهاست. پلیمریزه کردن رادیکالی لیگنین و خارج کردن از حالت طبیعی بوسیله آنزیم‌های اکسیداتیو یک راه آلترناتیو برای پیوند انتقالی (cross linking) است. استفاده از مدیاتور(واسطه‌های شیمیایی) 4- هیدروکسی بنزوئیک اسید در این بررسی نشان داد که تعداد رادیکالهای فنوکسی بوسیله این مدیاتور سبب افزایش امکان پیوندهای شیمیایی بین مولکولهای گروههای فعال مولکول فنوکسی در قطعات لیگنین و فیبر گردیده (شکل ۸) و زمان لازم برای انکوباسیون را حدود ده برابر کوتاه می‌نماید (Euring *et al.*, 2011). یکی از معایب لاکاز قدرت ردکس پایین آن است. به همین دلیل به یک گروه فنولیک آزاد در حلقه آروماتیک لیگنین برای اکسیداسیون نیاز دارد. به طور معمول، در لیگنین، از ایجاد این محل‌ها جلوگیری می‌شود. زیرا در لیگنین طبیعی بیشتر گروه‌های فنولیک، در زمان واکنش‌های سنتز لیگنین اشغال می‌شوند (Rochefort *et al.*,2004; Leonowicz *et al.*, 2001). به همین دلیل اضافه کردن مدیاتورها یا ترکیبهای ردوکس مولکولی، لاکاز را قادر می‌سازد به اتصال‌های غیرفنولیک لیگنین حمله نموده و واکنش را تشدید و سرعت ببخشد.



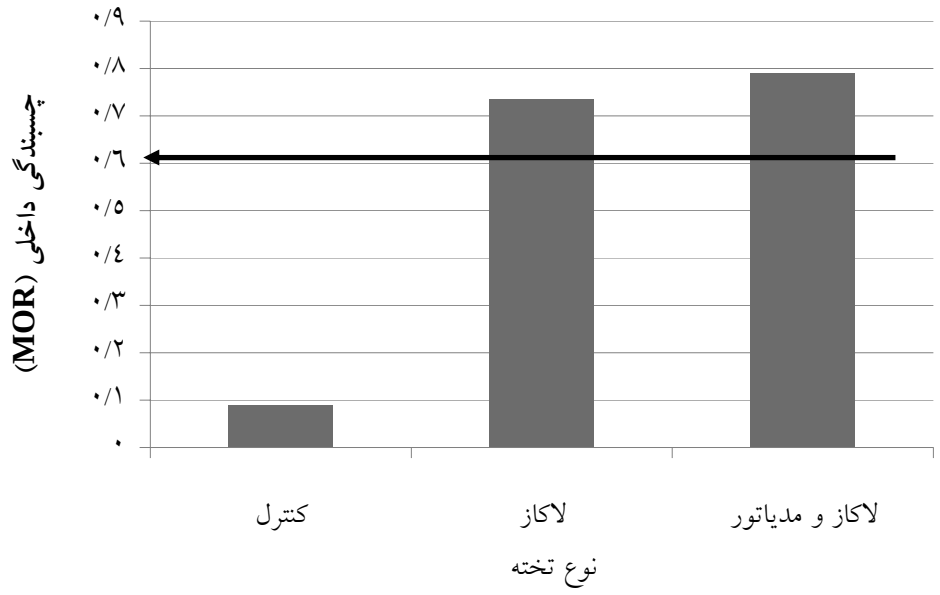
شکل ۸- عکس الکترونی از MDF ساخته شده بعد از تیمار لاکاز با مدیاتور

خواص فیزیکی و مکانیکی تخته‌های MDF ساخته شده "لاکاز" با تخته‌های لاکاز و واسطه شیمیایی" 4-هیدروکسی بنزوئیک اسید **شکل**های ۹ تا ۱۱ نشان داده شده است.

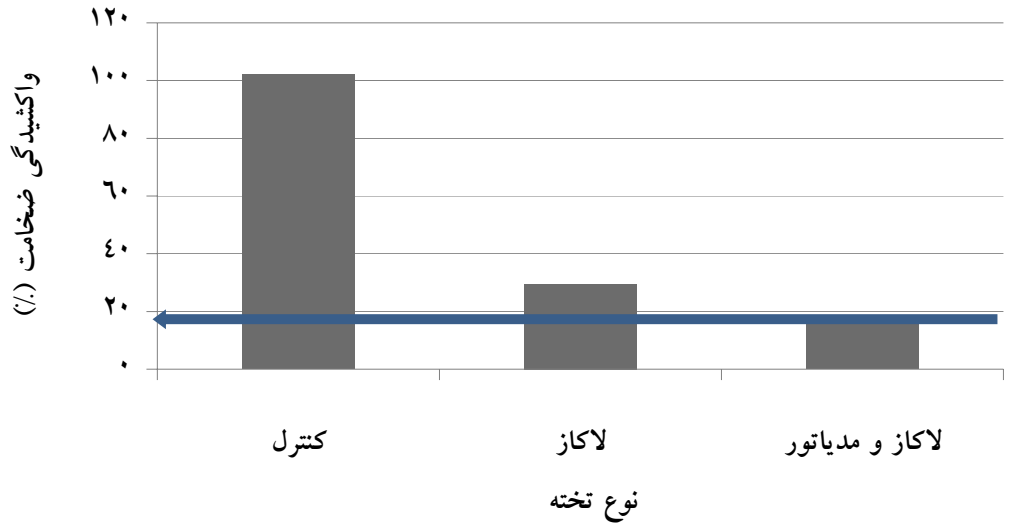
مقاومت خمشی: در هر دو گروه تخته‌ها مقدار استاندارد اروپا را کسب کرده و همان طور که مشاهده می‌شود تخته‌های ساخته شده با چسب فنول اکسیداز دارای MOR مساوی ۳۱ نیوتن بر میلیمتر مربع است که نسبت به حداقل مورد نیاز استاندارد (۲۳ نیوتن بر متر مربع) افزایش یافته است. در مقایسه با این تخته‌ها، فایبربردهای تیمار شده با لاکاز و مدیاتور با MOR=۵۰/۲ به طور فزاینده‌ای بالاتر از استاندارد و ۱۹/۲ نیوتن بر میلیمترمربع بیشتر از تخته‌های تیمار آنزیمی لاکاز (فنول اکسیداز) است (**شکل** ۹)



شکل ۹- تاثیر آنزیم فنول اکسیداز و فنول اکسیداز با مدیاتور بر مقاومت خمشی تخته‌های با ضخامت ۸ میلیمتر و دانسیته ۸۰۰ کیلوگرم بر سانتیمترمکعب



شکل ۱۰- تاثیر آنزیم فنول اکسیداز و فنول اکسیداز با مدیاتور بر مقاومت چسبندگی داخلی تخته‌های با ضخامت ۸ میلیمتر دانسیته ۸۰۰ کیلوگرم بر سانتیمتر مکعب



شکل۱۱- تاثیر آنزیم فنول اکسیداز و فنول اکسیداز با مدیاتور واکشیدگی ضخامت تخته‌های با ضخامت ۸ میلیمتر ودانسیته ۸۰۰ کیلوگرم بر سانتیمترمکعب

مقاومت چسبندگی داخلی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس چسبندگی داخلی تخته‌های ساخته شده از چسب بیولوژیک آنزیمی نشان داد که تأثیر دو عامل آنزیم فنول اکسیداز و ٤- هیدروکسی بنزوئیک اسید (مدیاتور) تأثیر تعیین‌کننده و معنی‌داری بر چسبندگی‌داخلی تخته‌های ساخته شده داشته است. هیستوگرام تغییرات مقاومت چسبندگی داخلی در **شکل** ۱۰ نشان داده شده است به طوری که در این شکل مشاهده می‌شود با جایگزین کردن آنزم فنول اکسیداز به جای چسب‌های معمول در تخته‌های شاهد به چسبندگی داخلی افزوده شده و در فایبربردهای فنول اکسیداز و مدیاتور از ۰/۷۲ نیوتن بر میلیمتر مربع متعلق به تخته‌های گروه لاکاز به ۰/۷۸ نیوتن بر میلیمترمربع، افزایش یافته است. و اینکه هر دو بالاتر از حد استاندارد اروپا (۰/٦۰ نیوتن بر میلیمتر) بوده است.

واکشیدگی ضخامت: نتایج حاصل از تجزیه واریانس واکشیدگی ضخامت بعد از ٢٤ ساعت غوطه‌وری در آب تخته‌های ساخته شده از چسب بیولوژیک آنزیمی، نشان داد، اگرچه بکار بردن بیوچسب لاکاز مقدار واکشیدگی تخته‌ها را از ۱۰۲ درصد در تخته‌های شاهد به ۲۹/۵ درصد کاهش داده ولی تنها در صورت استفاده از واسطه شیمیایی ٤- هیدروکسی بنزوئیک اسید تخته‌ها قادر به بدست آوردن استاندارد مورد نیاز (TS=٪۱۷ : (۲۰۰٦) ٥- ٦٢٢) شدند. این نتایج در مورد تخته‌های ساخته شده بالاکاز و مواد واسطه شیمیایی مشابه (Bourbonnais *et al.* 1995; Gutierrez *et al.*, 2005; Hakala *et al.*, 2007; Kharazipour and Euring ,2010; Vivekanand *et al.*,2008) تطابق دارد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی تخته‌های ساخته شده از لاکاز (فنول اکسیداز) به تنهایی و این آنزیم به همراه مدیاتور نشان داد که در شرایط تهیه آنزیم و انکوباسیون (جدول ۱) حداکثر مقاومت خمشی در تخته‌های لاکاز و مدیاتور ایجاد شده است. استفاده از آنزیم لاکاز در سیستم اجزای یک ترکیبی (لاکاز- مدیاتور- سیستم) به دلیل پلیمریزه شدن بیشتر لیگنین سبب بهبود مقاومت خمشی شده علاوه بر این با افزایش رادیکالهای فنولیک توسط مدیاتور در این تحقیق سبب افزایش امکان پیوندهای شیمیایی بین مولکولهای گروههای فعال فنوکسی در قطعات لیگنین و فیبر و در نتیجه اتصال کارآمد در سطوح و ضخامت تخته شده و این افزایش تعداد اتصالات و استحکام بین ذرات نه تنها سبب بهبود مقاومت خمشی بلکه افزایش چسبندگی داخلی شده است (**شکل ۱۰**).

از سوی دیگر، افزایش سطوح تماس گروههای آزاد فنولیک در مولکول لیگنین، توسط اثر واسطه ٤- هیدروکسی بنزوئیک اسید با تغییر شیمیایی بر روی فیبرها و بلوکه کردن انتهای هیدروفیل آنها سبب کاهش واکشیدگی ضخامت تخته و همان طور که عکس‌های میکروسکوپ الکترونی بیان می‌کنند لیگنین با اتصال‌های کوولانسی تبدیل به بتونی محکم در بین فیبرها گردیده است (شکل۸).

لذا در یک نتیجه‌گیری کلی، می‌توان بیان داشت که با ساخت تخته‌هایی در سیستم اجزای یک ترکیبی شامل ماده طبیعی لیگنین داخل چوب و لاکاز، بدلیل دارا بودن ویژگی پلیمریزاسیون مولکولی و توانایی برقرار کردن واکنش بیولوژیک و شیمیایی همزمان، قادر به ساخت تخته فیبر با دانسیته متوسط شد. و با توجه به نتایج، استفاده از مدیاتور در انکوباسیون کوتاه۱۰ تا ۱۵ دقیقه، سبب بهبود هرچه بیشتر نه تنها خصوصیات فیزیکی بلکه حاصل کردن استاندارد مورد نیاز در واکشیدگی ضخامت نیز شده است.

منابع مورد استفاده

- Baldrian P (2006) Fungal laccase – occurence and properties. FEMS Microbiology Reviews, 30, 215-242
- Bourbonnais R, Paice M G, Reid I D, Lanthier P and Yaguchi M (1995) Lignin oxidation by laccase isozymes from Trametes versicolor and role of the mediator 2, 2'-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in Kraft lignin depolymerization. Appl. Environ. Microbiol. 61 (5), pp. 1876-1880
- Bowyer RT, Van Ballenberghe V, Kie JG (2003) Moose Alces alces. In: Feldhamer GA, Thompson BC, Chapman JA, editors. Wild mammals of North America: biology, management, and conservation. 2nd ed. Baltimore (MD): John Hopkins University Press. p. 931–964
- DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (1999) Holzfaserplatten, Spanplatten, Sperrholz: Normen, Richtlinien. 6. Auflage. Beuth, Berlin, Germany
- Du Y (1988) the production and use of Chinese raw urushi and the present state of research. In: Brommelle NS,Smith P (eds)Urushi:proceeding of the Uroshi study Group.Getty Conservation Institute,Mariana del Rey,pp 189-197
- Euring, M (2008) Einsatz von Mediatoren bei der enzymatischen Aktivierung der fasereigenen Bindekräfte zur Herstellung von enzymgebundenen, bindemittelfreien Holzwerkstoffe. Dissertation, Fakultät für Forstwissenschaften und Waldökologie, Georg-August Universität Göttingen, 211 Seiten.
- Euring M, Rühl M, Ritter N, Kües U, Kharazipour A (2011) Laccase mediator system for eco-friendly production of medium dencity fiberboard on a pilot scale: physicochemical

wood composite production,in chapture 9 of Enzime applications in fiber processing .Pp103, American chemical society, 1998

- Kharazipour A, Schindel K, Hüttermann A (1998) Enzimatic activation of wood fibers for wood composite production,in chapture 9 of Enzime applications in fiber processing .Pp103, American chemical society, 1998
- Kharazipour A (1996) Enzyme von Weißfäulepilzen als Grundlage für die Herstellung von Bindmitteln für Holzwerkstoffe. Sauerländer´s Verlag Frankfurt/Main
- Kharazipour A (2004) Holz als Werkstoff. In: Jahrbuch 2004/2005. Nachwachsende Rohstoffe, Wirtschaftsfaktor Biomasse. C.A.R.M.E.N. e.V. (Centrales Agrar-Rohstoff-Marketing- und Entwicklungs-Netzwerk e.V.), Straubing, Germany, pp. 325-337
- Kharazipour A (2005) *Skript zur Vorlesung „Biotechnologie der Holzwerkstoffe“ im SS 2005*. Institut für Forstbotanik. Georg-August-Universität Göttingen
- Kharazipour A, Euring M (2010) Verwendung von Mediatoren bei der Herstellung von Faserplatten. Patent DE 10 2008 038 398 A1
- Kharazipour A, Euring M (2010) Verwendung von Mediatoren bei der Herstellung von Faserplatten. Patent DE 10 2008 038 398 A1
- Kharazipour A, Euring M (2010) Verwendung von Mediatoren bei der Herstellung von Faserplatten. Patent DE 10 2008 038 398 A1
- Kharazipour A, Hüttermann A (1993) Enzymatische Behandlung von Holzfasern als Weg zu vollständig bindemittelfreien Holzwerkstoffen. In Hüttermann, A., Kharazipour, A (Herausgeber): Die pflanzliche Zellwand als Vorbild für Holzwerkstoffe, naturorientierte Herstellung von Span- und Faserplatten. Stand der Technik und Perspektiven. Pp. 83 – 98, J. D. Sauerländer´s Verlag, Frankfurt/Main
- Kharazipour A, Hüttermann A (1993) Enzymatische Behandlung von Holzfasern als Weg zu vollständig bindemittelfreien Holzwerkstoffen. In Hüttermann, A., Kharazipour, A (Herausgeber): Die pflanzliche Zellwand als Vorbild für Holzwerkstoffe, naturorientierte Herstellung von Span- und Faserplatten. Stand der Technik und analysis of the reaction mechanism, biotechnology journal
- European standard EN 622-5 (2006) Fibreboards – Specifications – Part 5: Requirements for dry process boards (MDF). European Committee for Standardization, Brussels, Belgium
- Glasser WG, Kelley SS (1987) Lignin. In: Mark HF (ed) Encyclo-pedia of polymer science and engineering, 2nd edn,vol 8.Wiley,New York,pp 795-852
- Gosselink RJ A, de Jong E , Guran B & Abacherli A (2004) Co-ordination network for lignin – standardisation, production and applications adapted to market requirements (EUROLIGNIN). Industrial Crops and Products, 20, 121-129
- Grönqvist S, Nika-Paavola ML, Viikari L, Orlandi M, Banevali C & Buchert J (2005) Oxidation of milled wood lignin with laccase, tyrosinase and horseradish peroxidase. Applied Microbiology and Biotechnology, 67, 489-494
- Grönqvist S, Suurnaki A, Nika-Paavola, ML, Kruus K, Buchert J & Viikari L (2003) Lignocellulose processing with oxidative enzymes: applications of enzymes to lignocellulosics. ACS Symposium Series, 855, 46-65
- Gutiérrez A, Rencoret J, Ibarra D, Molina S, Camarero S, Romero J, Del Rio JC, Martínez AT (2007) Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. Environmental Science & Technology, 41, 4124-4129
- Hakala TK, Lundell T, Galkin S, Maijala P, Kalkkinen N, Hatakka A (2005) Manganese peroxidises, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus Physisporinus rivulosus grown on spruce wood chips. Enzyme and Microbial Technology 36, pp. 461-468
- Hüttermann A, Fastenrath M, Kharazipour A, Schindel U (1995) Making of papyrus – an ancient biotechnology or: Pliny was right indeed. Naturwissenschaften 82:4144-416
- Kharazipour A, Hüttermann A, Lüdemann, HD (1997) Enzymatic activation of wood fibres as a mean for the production of wood composites, J. Adhes, Sci. Technol. 11, pp. 419–427
- Kharazipour A, Schindel K, Hüttermann A (1998) Enzimatic activation of wood fibers for

- Nikvash N, Kraft R, Kharazipour A and Euring M (2010) Comparative properties of bagasse, canola and hemp particle boards. European Journal of Wood and wood Product, published online with open access at Springerlink.com, 2010-07-23
- Pedersen AHF & Rasmussen JJ (1966) Manufacture of chipboard and the like. Canadian patent 743861.
- Pizzi, A. (2000). Tannery row – the story of some natural and synthetic wood adhesives. Wood Science and Technology, 34, 277-316
- Pizzi A (2006) Recent developments in eco-efficient bio-based adhesives for wood bonding: opportunities and issues. Journal of Adhesion Science and Technology, 20, 829-846.
- Reale, S., *et al.*, 2004. *Mass spectrometry in the biosynthetic and structural investigation of lignins*. Mass Spectrometry Reviews, 23(2): p. 87-126
- Rochefort D, Leech D, Bourbonnais R (2004) Electron transfer mediator systems for bleaching of paper pulp. Green Chem. 6, pp. 14 – 24
- Roffael E & Rauch W (1971) Production of particleboards using black liquor as binder. 2. New and fast method for production of particleboards. Holzforschung, 25, 112-116
- Rowell R M (1988) *Can the cell wall be stabilized?* Dans Suchsland, O. (ed.). Wood Science Seminar. Stabilization of the Cell Wall. East Lansing, Mich.: Michigan State University. p. 53-63
- Saka S and Kusdiana D (2001) Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. *Fuel* 80: 225-231
- Sjöström, E (1993) Wood chemistry. 2nd ed., Academic Press, New York.
- Vivekanand V, Dwivedi P, Sharma A, Sabharwal N, Singh R P (2008) Enhanced delignification of mixed wood pulp by Aspergillus fumigatus laccase mediator system. World Journal of Microbiology & Biotechnology 24, pp. 2799-2804
- Widsten P, Qvintus-Leino P, Tuominen S & Laine J E (2003) Manufacture of fiberboard from wood fibers activated with Fenton´s reagent (H2O2/FeSO4). Holzforschung, 57, 447-452

Perspektiven. Pp. 83 – 98, J. D. Sauerländer´s Verlag, Frankfurt/Main

- Kharazipour A, Hüttermann A (1993) Enzymatische Behandlung von Holzfasern als Weg zu vollständig bindemittelfreien Holzwerkstoffen. In Hüttermann, A., Kharazipour, A (Herausgeber): Die pflanzliche Zellwand als Vorbild für Holzwerkstoffe, naturorientierte Herstellung von Span- und Faserplatten. Stand der Technik und Perspektiven. Pp. 83 – 98, J. D. Sauerländer´s Verlag, Frankfurt/Main
- Kharazipour A, Hüttermann A (1998) Biotechnological production of wood composites. In Bruce, A. and Palfreyman, J. W. (Eds.), Forest products biotechnology. Taylor and Francis, London, pp. 141 – 150
- Kharazipour A, Hüttermann A (1998) Biotechnological production of wood composites. In Bruce A and Palfreyman J W (Eds.), Forest products biotechnology. Taylor and Francis, London, pp. 141 – 150
- Kharazipour A, Hüttermann A, Kühne G, Rong M (1994) Verfahren zum Verkleben von Holzfragmenten und nach dem Verfahren hergestellte Formkörper. EU-Patent 94103099.
- Kumanotani J (1988) The chemistry of Oriental lacquer (*Rhus vernicifula*) In: brommelle NS,Smith P (eds) Urushi: Proceedings of the Urushi Study Group.Getty Conservation Institute, Marina del Rey,pp 243-251
- Lenowicz A, Cho N-S, Luterek J, Wilkolazka A, Woitas-Wasilewska M, Matuzewskas A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J (2001) Fungal Laccase: Properties and activity on lignin. J. Basic Microbiol. 41, pp. 185 – 227
- Mohan D, Pittman CU, and Steele P H (2006) *Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review*. Energy & Fuels, 20(3): p. 848-889
- Müller G, Schöpper C, Vos H, Kharazipour A, Polle A (2009) FTIR-ATR spectroscopic analyses of changes in wood properties during particle- and fibreboard production of hard- and softwood trees. International Journal of Materials and Product Technology (IJMPT), Vol. 36, Issue 1-4, pp. 189-199

– Widsten P, Qvintus-Leino P, Tuominen S & Laine J E (2004) The influence of high defibration temperature on the properties of medium-density fiberboard (MDF) made from laccase-treated hardwood fibers. Wood Science and Technology, 38, 521-528

– Yang J S, Yuan H L, Wang H X & Chen W X (2005) Purification and characterization of lignin peroxidases from *Penicillium decumbens* P6. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21, 435-440

Biotechnology Application in Wood Industry: Utilization of Phenol Oxidase Enzyme as a Renewable Binder in MDF Manufacture

Kharazipour, A.[1] and Nikvash, N[2*]

1- Professor, Wood and Paper Science, Georg-August University of Goettingen, Department of Molecular Wood Biotechnology & Technical Mycology.
2*- Corresponding author, PhD. student, Department of Wood and Paper Science, Georg-August University of Goettingen.
Email: nikvash_n@yahoo.com

Received: Oct., 2011 Accepted: March, 2012

Abstract

Enzymatic activation of lignin on pinewood TMP (Thermo-Mechanical Pulp) fibers for MDF production was investigated using electronic microscopic technique. Two systems: laccase mediator and laccase without mediator were used. MDF was made with laccase as biological catalysts in both wet and dry process. Incubation of fibers with commercially available *Trametes versicolor* laccase was performed in aqueous solution (wet process) or the enzyme was sprayed onto the fiber (dry process). Both laccase mediator and laccase without mediator imparted major impact on the optimization of physico-mechanical properties to achieve minimum requirement of standard. Boards produced with fiber-treated with laccase were found to have higher mechanical strength than non-treated binder-free control boards. Best board properties (bending strength, internal bond strength and swelling) were observed after an incubation of 10-15 min at pH 5.6 and a concentration of 100 U/ml laccase with a mediator (4-Hydroxy benzoic acid 98%) concentration of 10 mM added at 3 min intervals . Electron-microscopic micrographs of enzyme-bonded fibers showed that the application of mediator enhances laccase reaction and, most importantly, the substrate spectrum of the enzymes broadens dramatically. Laccase (phenol oxidase enzymes) serves as an activator of lignin by radical production. Certainly it can be deduced from these studies, that enzymatic treatment altered the surface properties of the fibers. Laccase mediator treated fibers showed a marked increase in the hydrophobicity.

Keywords: Enzymatic activation, Thermo-Mechanical Pulp, Hydroxy benzoic acid, phenol oxidase enzymes.