



Rys. 4. WPC jak materiał podłogowy [9]

meblowe, stosowane w miejscach szczególnie narażonych na zarysowania, takich jak blaty bądź biurka [5-8].

W ciągu ostatnich lat kompozyty polimerowo-drzewne cieszą się coraz większym zainteresowaniem, o czym świadczy stale wzrastająca liczba producentów zarówno granulatów, jak i wyrobów z tych materiałów [3]. WPC ze względu na swój przyjazny środowisku charakter, różnorodność właściwości oraz zastosowań, powinny stawać się z biegiem czasu coraz bardziej popularne oraz wszechobecne. Niestety, głównym czynnikiem hamującym ekspansję WPC jest ich ciągle zbyt wysoka cena w porównaniu do obecnie, powszechnie stosowanych tworzyw sztucznych. Czynnościami mającymi na celu rozwiązanie tego problemu jest podjęcie w wielu ośrodkach badań naukowych, których

zadaniem jest opracowanie nowych technologii wytwarzania kompozytów polimerowo-drzewnych.

Literatura

- [1] Syndor M., *Drewno w budowie maszyn. Historia najważniejszego tworzywa*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2011.
- [2] Klepka T., *Nowoczesne materiały polimerowe i ich przetwórstwo*, Politechnika Lubelska, Lublin 2014.
- [3] Zajchowski S., Ryszkowska J., 2009, *Kompozyty polimerowo-drzewne – charakterystyka ogólna oraz ich otrzymywanie z materiałów odpadowych*, *Polimery*, 54, 674 – 682.
- [4] Wojciechowski S., *Kompozyty*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2003.
- [5] Yongfeng L., *Wood-Polymer Composites*, w: *Advances in Composite Materials – Analysis of Natural and Man-Made Materials*, Tesinova P. (ed.), InTech, Rijeka 2011.
- [6] Sommerhuber P., Welling J., Krause A., 2015, *Substitution potentials of recycled HDPE and wood particles from post-consumer packing waste in Wood-Plastic Composites*, *Waste Management*, 46, 76-85.
- [7] Carus M., Eder A., Dammer L., Korte H., Scholz L., Essel R., Breitmayer R., 2015, *Wood-Plastic Composites (WPC) and Natural-Fibre Composites (NFC): European and Global Markets 2012 and Future Trends in Automotive and Construction*, nova-Institute GmbH.
- [8] Olakanmi E., Strydom M., 2016, *Critical materials and processing challenges affecting the interface and functional performance of wood polymer composites (WPCs)*, *Materials Chemistry and Physics*, 171, 290-302.
- [9] <https://www.architonic.com>, 18.02.17.
- [10] <http://wpcmaterials.company.frbiz.com>, 18.02.17.
- [11] <https://www.jeluplast.com>, 15.02.17.

Monika Żygo, Mirosława Prochoń

monika.zygo@dokt.p.lodz.pl

Institut Technologii Polimerów i Barwników, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka

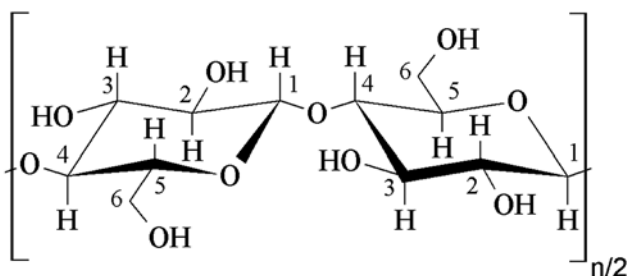
Enzymatyczne metody otrzymywania nanowłókien celulozowych

Biomasa roślinna zbudowana jest głównie z celulozy, hemicelulozy i lignin. Rocznie na Ziemi powstaje jej 200 mld ton, z czego 85% stanowią odpady ligninocelulozowe. Biomasa jest dominującym odpadem działań gospodarki takich jak rolnictwo, leśnictwo, a także różnych gałęzi przemysłu, m.in. drzewno-papierniczego. Odpady ligninocelulozowe mogą być wykorzystywane jako surowiec energetyczny, jak również jako komponent do wytwarzania wielu innych produktów. Ze względu na wysoką dostępność biomasa ligninocelulozowa jest jednym z najistotniejszych źródeł pozyskiwania włókien nanocelulozy [1].

Celuloza jest liniowym biopolimerem najpowszechniej występującym na kuli ziemskiej. Usztywnia ścianę komórkową roślin, niektórych grzybów oraz glonów. Szacuje się, że jej roczna produkcja w biosferze wynosi od 10 do 100 mld ton. Około 6 mld ton jest przetwarzane przez różne gałęzie przemysłu, np. przemysł papierniczy, tekstylny, chemiczny [2, 3].

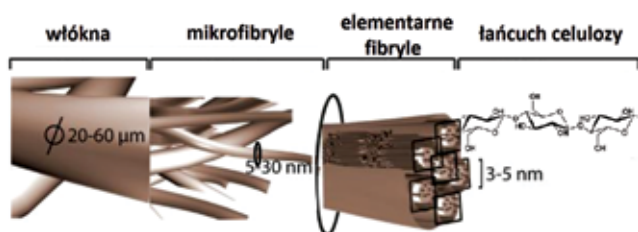
Jednostka powtarzalna celulozy złożona jest z dwóch anhydroglukozowych pierścieni ($(C_6H_{10}O_5)_n$) połączonych ze sobą kowalencyjnie poprzez atom tlenu (rys. 1). Wiązanie glikozydowe występuje między atomem tlenu węgla C1

jednego pierścienia glukozy i C4 drugiego pierścienia (typ wiązania β -1,4) [2, 3]. Każdy pierścień glukozy odwrócony jest w stosunku do poprzedniego o 180° . Pierwszorzędowe grupy hydroksylowe znajdują się po prawej lub po lewej stronie od osi łańcucha celulozy [4]. Wewnątrzłańcuchowe wiązania wodorowe pomiędzy grupami hydroksylowymi i atomami tlenu sąsiadujących reszt glukozy, stabilizują liniową strukturę celulozy. Wraz z międzyłańcuchowymi wiązaniami wpływają na dużą sztywność osiową polimeru [5].



Rys. 1. Jednostka strukturalna celulozy i system numerowania atomów węgla w anhydroglukozowej jednostce celulozy [6]

Wiązania wodorowe i oddziaływania van der Waalsa są podstawą hierarchicznej budowy włókien (rys. 2). Łańcuchy celulozy tworzą elementarne fibryle, tzw. nanowłókna o średnicy od 3 do 5 nm. Nanowłókna zawierają regiony krystaliczne i amorficzne. Obszary krystaliczne stanowią około 60-70% celulozy, cechują się równoległym i uporządkowanym ułożeniem łańcuchów. Liczne wiązania wodorowe stabilizują strukturę i sprawiają, że domeny krystaliczne są sztywne i odporne na działanie enzymów celulolitycznych. Rejonu amorficzne charakteryzuje nierównomierne ułożenie łańcuchów, a także mniejsza ilość międzyłańcuchowych wiązań wodorowych. Obszary nieuporządkowane są podatne na hydrolizę enzymatyczną. Nanowłókna agregują z hemicelulozą, tworząc mikrofibryle o średnicy od 5 do 30 nm. Na skutek oddziaływań między mikrofibrylami formują się włókna celulozowe, które złożone są z około 400 mikrowłókien [4, 7, 8].



Rys. 2. Hierarchiczna struktura włókna celulozy [8]

Technologia pozyskiwania nanocząstek celulozy zazwyczaj bazuje na technikach top-down polegających na rozdrobnieniu biomasy do rozmiarów nanometrycznych. Pierwszy etap produkcji nanocelulozy polega na usunięciu substancji niecelulozowych z biomasy. Celem drugiego etapu jest fibrylacja włókien celulozy na nanowłókna [9].

Nanowłókna otrzymuje się przy pomocy metod mechanicznych, chemicznych i biologicznych. Do procesów mechanicznych zalicza się wysokociśnieniową homogenizację, mielenie, kriokruszenie, ultrasonikację i mikrofluidyzację. Wśród metod chemicznych wyróżnia się ozonowanie, utlenianie katalizowane rodnikiem TEMPO (2,2,6,6-tetrametylopiperodyno-1-oksylowym), hydrolizę kwasową i zasadową [9].

Najbardziej ekologiczną i stosunkowo tanią metodą otrzymywania nanowłókien celulozy jest biorafinacja enzymatyczna. W podejściu tym materiał ligninocelulozowy poddaje się działaniu kompleksów enzymatycznych degradujących celulozę, ligniny, hemicelulozę i pektyny. Najpierw biomasę traktuje się enzymami, takimi jak ligninazy, hemicelulazy i pektynazy w celu usunięcia niecelulozowych substancji. Następnie używa się enzymów, które hydrolizują celulozę do nanowłókien. Dzięki hydrolizie enzymatycznej celulozy można otrzymać większy stopień rozdrobnienia materiału w porównaniu z hydrolizą kwasową. Hydroliza enzymatyczna może być przeprowadzana w łagodniejszych warunkach niż hydroliza kwasowa. Ponadto jest bardziej ekonomiczna od chemicznej hydrolizy ze względu na mniejsze nakłady energii [1].

Lignina złożona jest z jednostek fenylopropanowych (monolignoli), takich jak alkohol p-kumarylowy, alkohol koniferylowy i alkohol synapinowy [10]. Lignina nie zawiera wiązań ulegających hydrolizie, dlatego do jej degradacji są wymagane enzymy oksydacyjne.

Do enzymów zaangażowanych w degradację ligniny należą [11]:

- peroksydazy ligninowe (ligninazy, LiPs, EC 1.11.1.14);
- peroksydazy manganowe (manganozależne peroksydazy, MnPs, EC 1.11.1.13);
- lakaza (benzenodiol: tlen oksydoreduktaza, Lacc, EC1.10.3.2).

Dodatkowymi enzymami współdziałającymi są enzymy uczestniczące w produkcji nadtlenu wodoru [11]:

- oksydaza glioksalu (tlen : glioksal oksydoreduktaza, GLOX, EC 1.2.3.5);
- oksydaza alkoholu arylowego (alkohol arylowy: tlen oksydoreduktaza, AAO, EC 1.1.3.7).

Lakaza jest oksydazą zawierającą cztery atomy miedzi w centrum aktywnym. Utlenia związki z pierścieniami



fenolowymi do rodników fenoksylowych. W obecności mediatora ABTS (2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu)) lub hydroksybenzotriazolu posiada również zdolność utleniania związków niefenolowych [11, 12].

Peroksydazy ligninowa (LiP) i manganowa (MnP) pomagają do swojego działania nadtlenu wodoru jako utleniacza. LiP jest glikoproteina, która zawiera grupę hemu w centrum aktywnym. Peroksydaza ligninowa katalizuje depolimeryzację fenolowych i niefenolowych lignin, utlenia także aminy, aromatyczne etery i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Degradacja lignin odbywa się poprzez przeniesienie elektronu i utworzenie kationu rodnika.

Peroksydaza manganowa utlenia jony Mn^{2+} do jonów Mn^{3+} . Następnie kationy Mn^{3+} biorą udział w utlenianiu pierścieni fenolowych do rodników fenoksylowych, co prowadzi do rozkładu związków fenolowych. MnP ma znaczącą rolę w depolimeryzacji lignin i chlorolignin, a także ich demetylacji. Posiada niższy potencjał redoks niż peroksydaza ligninianowa, z tego względu nie jest w stanie katalizować reakcji degradacji lignin niefenolowych [11, 13 – 16].

Enzymy degradujące ligninę są głównie wytwarzane przez grzyby białej zgnilizny. Lakazę produkują takie organizmy jak np. *Ceriporiopsis subvermispora*, *Coriolus versicolor*, *Panus tigrinus*, a peroksydazę ligninową i manganową – *Phanerochaete chrysosporium* i *Bjerkandera adusta* [11, 13 – 15, 17].

W skład hemicelulozy wchodzi polisacharydy takie jak: ksylany, mannany, glukany, glukuronoksylany, arabinoksylany, glukomannany, galaktomannany, galaktoglukomannany, ksyloglukany. Hemiceluloza jest biodegradowana do monocukrów i kwasu octowego. Ksyłan jest głównym węglowodanem występującym w jej składzie. Najważniejszymi enzymami odpowiedzialnymi za hydrolizę ksylanu są [4]:

- ksylanaza (endo-1,4- β -D-ksylanohydrolaza, EC 3.2.1.8);
- β -ksylozydaza (1,4- β -D-ksylohydrolaza, EC 3.2.1.37).

Ksylanaza działa na wewnętrzne wiązania β -1,4-glikozydowe w ksylanie i uwalnia ksylooligosacharydy. β -ksylozydaza rozszczepia ksylobiozę i krótkie ksylooligosacharydy do ksylozy i ułatwia hydrolizę ksylanu. Do całkowitej hydrolizy ksylanu wymagane są także enzymy usuwające rozgałęzienia łańcucha ksylanu. Należą do nich:

- esteraza acetyloksylanu (EC 3.1.1.72);
- α -L-arabinofuranozydaza (EC 3.2.1.55);
- α -D-glukuronidaza (EC 3.2.1.-).

Grupy acetylowe są odcinane przez esterazę acetyloksylanu. α -L-arabinofuranozydaza usuwa podstawniki arabinofuranozydowe, co skutkuje zwiększeniem dostępnych

miejsz w szkielecie ksylanu do działania ksylanazy. Grupy 4-O-metyloglukuronowe tworzą wiązania estrowe między kwasem uronowym a ligniną. α -D-glukuronidaza działa synergistycznie z ksylanazą podczas trawienia glukuronoksylanu i uwalnia grupy 4-O-metyloglukuronowe.

Ksylanazy są wytwarzane przez liczne organizmy, takie jak np. bakterie, algi, owady, jednak głównym źródłem komercyjnych preparatów są grzyby strzępkowe [7, 11, 14, 17].

Enzymatyczna degradacja celulozy umożliwia wytworzenie nanowłókien celulozy przy stosunkowo niskim zużyciu energii, gdyż przebiega w łagodnych warunkach. Enzymy hydrolizujące celulozę są produkowane przez rośliny, grzyby, bakterie, a nawet niektóre pierwotniaki, mięczaki i nicienie. Grzyby strzępkowe takie jak *Trichoderma reesei* i *Aspergillus niger* są najpopularniejszym źródłem przemysłowych preparatów do degradacji celulozy [18].

Hydroliza celulozy odbywa się przy udziale preparatu enzymatycznego zawierającego w swoim składzie enzymy o komplementarnej aktywności. Celuloza jest rozkładana przez następujące enzymy:

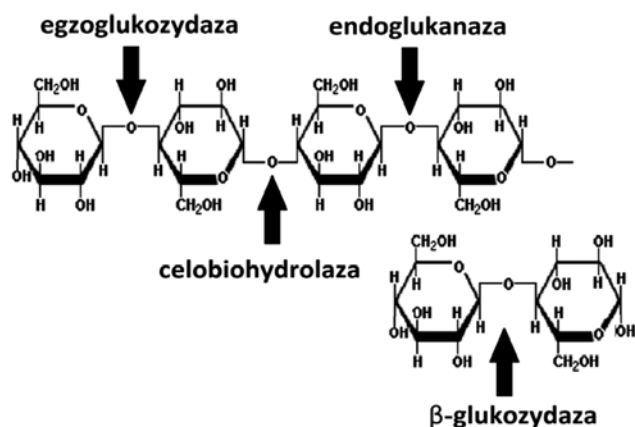
- endo-1,4- β -D-glukanaza (celulaza, EG; EC 3.2.1.4);
- β -1,4-D-glukohydrolaza glukanu (egzo- β -1,4-D-glukozydaza; EC 3.2.1.74);
- egzo-1,4- β -D-glukanaza (1,4- β -celobiohydrolaza, CB; EC 3.2.1.91);
- β -glukozydaza (celobiaza; EC 3.2.1.21).

Endo-1,4- β -D-glukanaza hydrolizuje losowo wewnętrzne wiązania β -1,4-glikozydowe celulozy. W wyniku jej działania powstają krótsze łańcuchy celulozy i oligosacharydy, a wśród nich m.in. celotetraoza i celotrioza. Celulaza wykazuje wysoką aktywność głównie w obszarach amorficznych celulozy. Egzo-1,4- β -D-glukanaza również katalizuje rozkład wiązania β -1,4-glikozydowego, odrywając pojedyncze cząsteczki glukozy od nieredukującego końca celulozy. β -1,4-D-glukohydrolaza glukanu rozszczepia wiązania β -1,4-glikozydowego w celulozie i celotetraozie, uwalniając celobiozę (dimer glukozy) z końców łańcucha. β -1,4-D-glukohydrolaza glukanu posiada zdolność działania w regionach krystalicznych oraz amorficznych, natomiast egzo-1,4- β -D-glukanaza działa efektywnie jedynie w rejonach krystalicznych. β -glukozydaza rozkłada cząsteczki celobiozy, uwolnione przez endo-1,4- β -D-glukanazę i β -1,4-D-glukohydrolazę glukanu, do cząsteczek glukozy [10, 14, 17, 19].

Miejsca działania wyżej opisanych enzymów przedstawiono na rys. 3.

Enzymatyczna degradacja celulozy jest złożonym procesem, wymagającym synergistycznego działania kilku enzymów. Na stopień enzymatycznej hydrolizy ma wpływ





Rys. 3. Miejsca działania enzymów degradujących celulozę [20]

struktura celulozy. Do najważniejszych parametrów decydujących o kinetyce hydrolizy należy: stopień pęcznienia włókna celulozowego, stopień krystaliczności, zawartość substancji występujących wspólnie z celulozą w ścianie komórkowej rośliny (np. lignin), stopień polimeryzacji i powierzchnia właściwa włókien [19, 21].

Enzymatyczna metoda otrzymywania nanowłókien celulozy jest przyjazna dla środowiska. Dzięki enzymatycznej hydrolizie celulozy można otrzymać większy stopień rozdrobnienia materiału w porównaniu z hydrolizą kwasową. Ponadto w jej wyniku powstają bardziej homogenne zawiesiny nanowłókien celulozy [9].

Nanowłókna celulozy są pożądanym produktem ze względu na biodegradowalność, biokompatybilność, dużą powierzchnię właściwą, stabilność termiczną oraz właściwości reologiczne, takie jak np. wysoki moduł Younga i wytrzymałość na rozciąganie. Do niektórych zastosowań nanostruktur celulozy należą ultralekkie materiały, przezroczyste kompozyty, dodatki do farb, filtry, ekrany promieniowania elektromagnetycznego i odzież ochronna [9].

Literatura

- [1] Lee H. V., Hamid S. B. A., Zain S. K., 2014, Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: Structure and chemical process, *The Scientific World Journal*, 2014: 1-20.
- [2] Jonas R., Farah L. F., 1998, Production and application of microbial cellulose, *Polymer Degradation and Stability*, 59: 101-106.
- [3] Kazimierczak J., Błoda A., Wietecha J., Ciechańska D., Antczak T., 2012, Research into isolation of cellulose micro- and nanofibres from hemp straw using cellulolytic complex from *Aspergillus niger*, *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 20: 40-43.
- [4] Wyman C. E., Deckler S. R., Himmel M. E., Brady J. W., Skopec

C. E., Viikari L., *Hydrolysis of cellulose and hemicellulose w: Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, Nowy Jork, 2005, 43: 995-1033.

[5] Eichhorn S. i in., 2010, Review: Current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites, *Journal of Materials Science*, 45: 1-33.

[6] Dufresne A., *Cellulose and potential reinforcement w: Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials*, De Gruyter, Berlin/Boston, 2012, 1-35.

[7] Kancelista A., *Biodegradacja odpadów ligninocelulozowych z udziałem grzybów strzępkowych*, praca doktorska pod kierunkiem prof. dr hab. D. Witkowskiej, Katedra Biotechnologii Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław, 2012.

[8] Kettunen née Pääkkö M., *Cellulose nanofibrils as a functional material*, praca doktorska pod kierunkiem prof. O. Ikkala, Department of Applied Physics, Aalto University, 2003.

[9] Wąchała R., Ramięga T., Pyć R., Antczak T., 2011, Otrzymywanie włókien nanocelulozy, *Biotechnology and Food Science*, 75: 87-100.

[10] Vanholme R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., Boerjan W., 2010, *Lignin Biosynthesis and Structure*, American Society of Plant Biologists, 153: 895-905.

[11] Hofrichter M., Steinbüchel A., *Biodegradation of lignin w: Biopolymers. Lignin, humic substances and coal*, Wiley-VCH, Weinheim, 2013, 129-145.

[12] Madhavi V., Lele S. S., 2009, Laccase: properties and applications, *BioResources*, 4: 1694-1717.

[13] Abdel-Hamid A. M., Solbiati J. O., Cann I. K., 2013, Insights into lignin degradation and its potential industrial applications, *Advances in Applied Microbiology*, 82: 1-28.

[14] Pérez J., Muñoz-Dorado J., de la Rubia T., Martínez J., 2005, Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview, *International Microbiology*, 5: 53-63.

[15] Schoemaker H. E., Piontek K., 1996, On the interaction of lignin peroxidase with lignin, *Pure & Applied Chemistry*, 68: 2089-2096

[16] Wong D. W., 2009, Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157: 174-209.

[17] Bisaria V. S., Kondo A. *Production of Cellulolytic Enzymes w: Bioprocessing of Renew-able Resources to Commodity Bioproducts*, John Wiley & Sons Inc., 2014, 105-132.

[18] Rebouillat S., Pla F., 2013, State of the art manufacturing and engineering of nanocellulose: A review of available data and industrial applications, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4, 165-188.

[19] Nutt A. *Hydrolytic and oxidative mechanisms involved in cellulose degradation*, praca doktorska, Faculty of Science and Technology, Uppsala University, Uppsala, 2006.

[20] Kumar R., Sing S., Singh O.V., 2008, Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 377-391.

[21] Fan L. T., Lee Y. H., Beardmore D. H., 1981, The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis, *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 419-424.

