

# FIBRILACIJA CELULOZNIH VLAKEN S POMOČJO ENCIMOV

## ENZYMATIC FIBRILATION OF CELLULOSE FIBRES

Gregor LAVRIČ<sup>1</sup>, Diana GREGOR SVETEC<sup>1</sup>, Mija SEŽUN<sup>2</sup>, Janja ZULE<sup>2</sup>

### IZVLEČEK

Papirna industrija velja za energetsko izjemno intenzivno industrijsko panogo. Zmanjšanje energije, potrebne za proizvodnjo papirja, je tako ena izmed prioritet vseh svetovnih papirnic. Te za optimizacijo svojih procesov vse pogosteje uporabljajo različne biotehnoške pristope. Eden od teh je zagotovo tudi uporaba encimov, ki lahko izboljšajo številne procese in praktično nimajo negativnih vplivov na okolje. Encimi so biološki katalizatorji biokemičnih reakcij v živih in neživih celicah. Po svoji sestavi so v večini primerov beljakovine oz. beljakovinski kompleksi. Pospesujejo, usmerjajo in uravnavajo reakcije, ki omogočajo pretvorbe energije, sinteze in metabolične razgradnje. Z uporabo encima (celulaze) smo v raziskavi poskušali zmanjšati količino energije, potrebne za mletje dveh različnih vrst sulfatnih celuloznih vlaken (evkaliptusova vlakna – KV, mešanica vlaken navadne smreke in rdečega bora – DV).

Proučevali smo vpliv encimske obdelave na stopnjo mletja ter na osnovne, mehanske in optične lastnosti izdelanih laboratorijskih listov (debelino, gramaturo, gostoto, utržno dolžino, utržni indeks, raztezak, raztržni indeks, razpočni indeks in ISO belino). Z encimsko obdelavo, ki je potekala pred mletjem, se je za 10 odstotkov skrajšal čas, potreben za mletje vlaken. Encimska obdelava po mletju pa se je izkazala za neučinkovito.

Uporabljen encim je pozitivno vplival praktično na vse izmerjene lastnosti papirja, izdelanega iz kratkih vlaken evkaliptusa (KV), imel pa je nekoliko slabši vpliv na dolga vlakna iglavcev (DV).

**Ključne besede:** encimi, celuleze, celulozna vlakna, mletje celuloznih vlaken, lastnosti papirja

### ABSTRACT

Paper industry is known as a highly energy intensive industrial sector. Reducing the energy needed for paper production is one of the main priorities of all paper mills. For optimization of processes mills are increasingly using various biotechnological approaches. One of them is the use of enzymes, which can improve numerous processes and are not harmful to the environment. Enzymes are biological catalysts for biochemical reactions in cells. Most enzymes are proteins or protein complexes, which accelerate, direct and regulate reactions, enabling the conversion of energy, synthesis and metabolic decomposition. During our study an enzyme (cellulase) was used to reduce the amount of energy, required for refining of two different types of sulphate cellulose fibres (eucalyptus's fibres – KV, a mixture of fibres of Norway spruce and Scotch pine – DV).

The effect of enzymatic treatment on the degree of refining and on the basic, mechanical and optical properties of produced laboratory sheets was investigated, such as thickness, grammage, density, breaking length, tear index, stretch, tensile index, burst index and ISO brightness.

Enzymatic treatment performed before the refining reduced the refining time for 10%, while treatment after the refining proved to be ineffective.

Enzyme had a positive effect on virtually all measured properties of laboratory sheets made of short eucalyptus's fibres (KV) and a slightly lesser effect on sheets produced of long fibres of coniferous (DV).

**Keywords:** enzymes, cellulases, cellulose fibres, cellulose fibres refining, paper properties

### 1 UVOD

Proizvodnja papirja je energetsko izjemno intenziven proces [1]. Kar med 18–25 % vse energije, potrebne za proizvodnjo papirja, pa se porabi za mletje vlaken [2]. Mletje je eden izmed najpomembnejših postopkov pri izdelavi papirja, saj vlakna skrajša in jim spremeni strukturo. S tem močno vpliva na njihove mehanske lastnosti in posledično tudi na mehanske lastnosti izdelanega papirja. S povečevanjem stopnje mletja rasteta utržna jakost in prepogibna odpornost. Raztržna odpornost pa se po dosegu maksimalne vrednosti strmo znižuje [3].

Količino energije, potrebne za mletje vlaken, lahko učinkovito zmanjšamo z uporabo primernih encimov. Encimi so biološki katalizatorji biokemičnih reakcij v živih in neživih celicah. Po svoji sestavi so v večini primerov beljakovine oz. beljakovinski kompleksi. Pospesujejo, usmerjajo in uravnavajo reakcije, ki omogočajo pretvorbe energije, sinteze in metabolične razgradnje [4]. Encimi se v papirništvu uporabljajo predvsem za izboljšanje posameznih procesov, kjer deloma nadomeščajo kemikalije oz. znižajo porabo energije.

Za znižanje porabe energije, potrebne za mletje celuloznih vlaken, se v največji meri uporabljajo celuleze. Celuleze so hidrolitični encimi, ki jih producirajo predvsem različne

vrste gliv in bakterij. Celuleze s hidrolizo cepijo celulozo v molekule glukoze. Poznamo tri vrste celulaz, ki se razlikujejo po svoji strukturi in delovanju [5]:

- ▶ Endoglukanaze (endo-1,4-β-glukanaze) celulozo naključno cepijo v notranjosti strukture. Niso zelo aktivne pri cepitvi kristalinih delov celuloze, lahko pa hidrolizirajo tudi nadomestke celuloze, kot je karboksimetil celuloza.
- ▶ Celobiohidrolaze (exo-1,4-β-glukanaze) cepijo celulozo na kristalinih, nereducirajočih delih. Pomembne so tudi zato, ker so edine sposobne cepiti mikrokristalino celulozo, ki je sicer običajno prisotna v majhnih količinah.

Preglednica 1: V papirništvu najpogosteje uporabljene vrste encimov in njihova uporaba [5]

Table 1: Most commonly used types of enzymes in the paper industry [5]

encim	delovanje	področje uporabe
celulaza	razgradnja celuloze	izboljšanje lastnosti nekaterih vrst vlaken, izboljšanje učinka mletja, povišanje hitrosti delovanja papirnega stroja, pomoč pri beljenju in odstranjevanju tiskarske barve v deinking postopku pridobivanja recikliranih vlaken
ksilanaza	razgradnja ksilana	učinkovitejše odstranjevanje lignina, predbeljenje celuloznih vlaken, zmanjšana poraba belilnih sredstev, povečanje čistosti celulozne vlaknine, odstranjevanje tiskarske barve v deinking postopku pridobivanja recikliranih vlaken
lakaza	razgradnja lignina	uporaba pri bioloških postopkih pridobivanja mehanskih in kemijskih vlaknin, odstranjevanje tiskarske barve (predvsem fleksografske) v deinking postopku pridobivanja recikliranih vlaken
lipaza	razgradnja maščob in olj	učinkovitejše odstranjevanje tiskarskih barv na osnovi rastlinskih olj v deinking postopku pridobivanja recikliranih vlaken

- ▶ β-glukozidaze (β-D-glukozid glukohidrolaze) hidrolizirajo celobiozo do glukoze.

V raziskavi smo želeli ugotoviti učinek dodatka encima na proces mletja celuloznih vlaken, ter na lastnosti iz njih izdelanega papirja.

### 2 MATERIALI IN METODE

V okviru raziskave smo za encimsko fibrilacijo celuloznih vlaken uporabili encim s komercialnim imenom Celluclast, danškega proizvajalca Novozymes. Gre za celulozo pridobljeno iz glive *Trichoderma reesei*. Encim optimalno deluje pri pH vrednosti med 4,5 in 6,0 ter temperaturi med 50 °C in 60 °C. Njegova encimska aktivnost znaša ≥ 700 endoglukanaznih enot na gram (EGU/G). Obdelovali smo dve vrsti celuloznih vlaken:

- ▶ UPN Conifer so beljena, sulfatna, celulozna vlakna navadne smreke in rdečega bora (DV).
- ▶ Eldorado so beljena, celulozna, evkaliptusova vlakna pridobljena po sulfatnem postopku proizvajalca Eldorado Brasil (KV).

Za uravnavanje optimalnih pogojev delovanja encima (pH-vrednost) smo uporabili 0,1 M fosfatno puferno raztopino. Encimsko delovanje smo ob koncu obdelave zaustavili z uporabo 35 % NaOH (Merck).

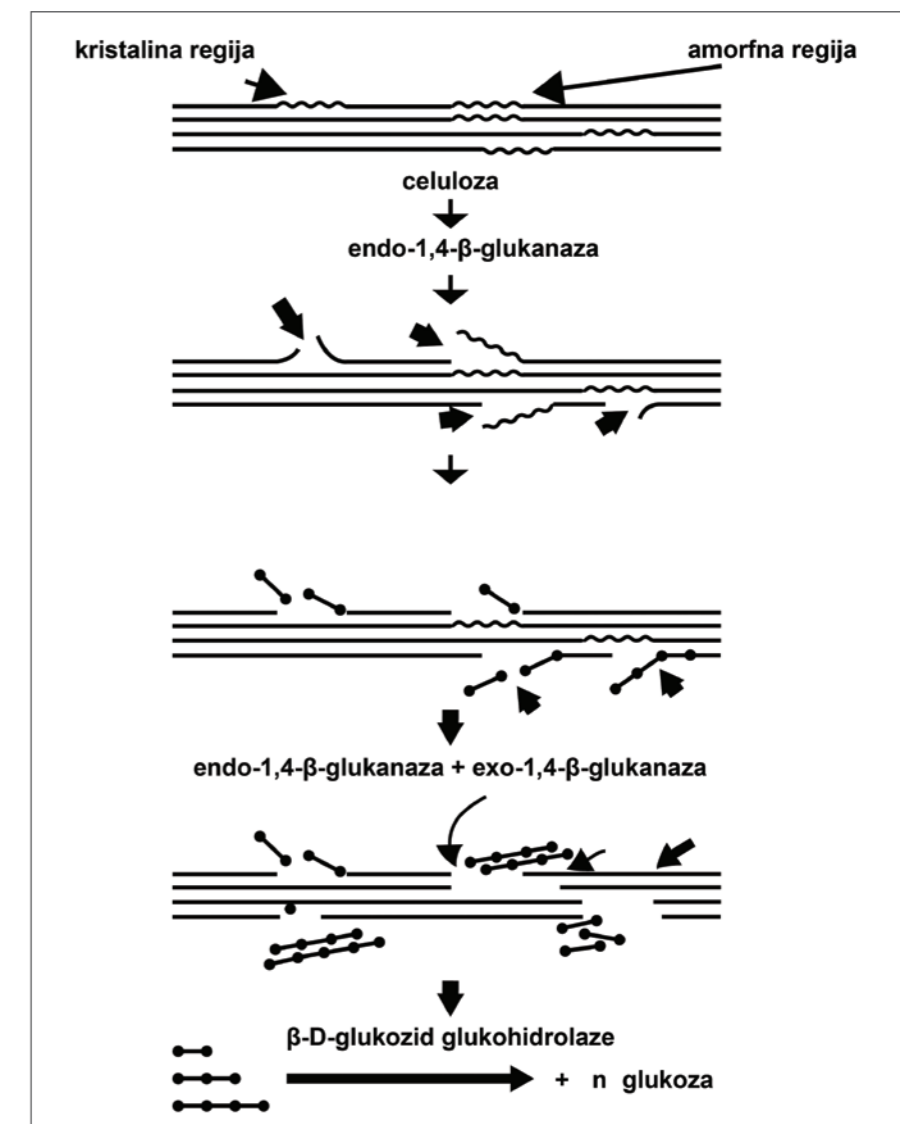
Vlakna smo sprva razpustili v laboratorijskem razvlaknjevalniku. Uporabili smo 30 g absolutno suhih vlaken, ki smo jih razpustili v 1800 ml vode. Razvlaknjeva-

nje je potekalo 10 minut pri 3000 obr./min. Optimalen pH za delovanje encima smo dosegli s pomočjo puferne raztopine (200 ml).

Sledila je encimska obdelava vlaken. Ta je potekala v inkubacijski posodi, ki nam je omogočala vzdrževanje stalne temperature ob konstantnem mešanju (570 obr./min). Encimsko deaktivacijo smo ob koncu dosegli s povišanjem pH-vrednosti.

Encimsko aktivnost smo kvantitativno določali z uporabo reagenta DNS po Millerjevi metodi [6]. Vzorec za določanje encimske aktivnosti je bil filtrat encimsko obdelane suspenzije celuloznih vlaken, ki smo mu določili vsebnost sproščeni reducirajočih sladkorjev.

Sproščeni reducirajoči sladkorji so povzročili redukcijo in s tem spremembo barve dodanemu reagentu (3,5-dinitrosalicilni kislini). Tej smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 540 nm s spektrofotometrom (Varian Cary 50 Conc). Uporabili smo 10 mm makro steklene kivete z volumnom 3,5 ml (Hellma). Rezultate smo podali v mg/l.



Slika 1: Prikaz delovanja encima celuleze [7]  
Figure 1: Schematic representation of cellulase activity [7]

Po končani encimski obdelavi smo sprva ponovili razvlaknjevanje v laboratorijskem razvlaknjevalniku pri 3000 obr./min. Čas razvlaknjevanja je bil 5 minut. Sledi lo je mletje na laboratorijskem mlinu PFI po standardu SIST EN ISO 5264-2:2002. Po zaključenem mletju je bila določena tudi stopnja mletja.

Stopnja mletja je bila določena po standardu ISO 5267-1:1999 na SchopperRieglerjevem aparatu. V aparat smo vlili 1000 ml suspenzije zmletih celuloznih vlaken in vode s koncentracijo 2 g/l. Po 5 s smo s pomočjo dviga tesnilnega stožca suspenzijo spustili na sito aparata in pozneje odčitali vrednost stopnje mletja v °SR (stopinja Schopper-Rieglerja).

Za določanje osnovnih, mehanskih in optičnih lastnosti je bilo treba iz zmletih celuloznih vlaken oblikovati laboratorijske liste papirja. Laboratorijski listi so bili oblikovani na Rapid-Köthenovem aparatu, v skladu z ISO 5269-2:2002. Za testiranje smo vsakokrat izdelali 5 laboratorijskih listov. Te smo pred preskušanjem kondicionirali v standardnih klimatskih pogojih (ISO 187) 24 ur pri 50 % relativni zračni vlažnosti in temperaturi 23 °C. Skladno s standardi smo določali naslednje lastnosti laboratorijsko izdelanih listov:

- ▶ osnovne fizikalne lastnosti: debelino, gramaturo in gostoto (SIST EN ISO 534:2012),
- ▶ mehanske odpornosti: utržna jakost, raztezek, utržna dolžina, utržni indeks (SIST EN ISO 1924-2:2009), raztržni indeks (SIST EN ISO 1974:2012) in razpočni indeks (SIST EN ISO 2758:2015),
- ▶ optične lastnosti: ISO belina (ISO 11475:1999).

### 3 REZULTATI Z RAZPRAVO

S 60 min encimsko obdelavo (pred mletjem) smo optimalno stopnjo mletja celuloznih vlaken UPN Conifer (32 °SR) dosegli s 4500 obrati (namesto 5300 obr.) na laboratorijskem PFI mlinu. Za doseganje iste stopnje mletja smo tako potrebovali 10 % obratov manj.

Iz encimsko obdelanih celuloznih vlaken smo po mletju oblikovali laboratorijske liste in izmerili njihove osnovne mehanske in optične lastnosti. Te smo primerjali z lastnostmi laboratorijskih listov, ki so bili izdelani iz encimsko neobdelanih vlaken z enako stopnjo mletja.

Iz preglednic (2, 3), ki prikazujeta osnovne lastnosti (gramaturo, debelino in gostoto) izdelanih laboratorijskih listov, lahko ugotovimo, da so vsi dosegali podobne vrednosti gramature in debeline. Vsi so bili namreč izdelani po standardu v popolnoma kontroliranih laboratorijskih pogojih.

Preglednica 2: Osnovne lastnosti laboratorijskih listov izdelanih iz encimsko neobdelanih in obdelanih celuloznih vlaken UPN Conifer

	osnovne lastnosti	x	S <sub>x</sub>	CV
encimsko neobdelana vlakna	gramatura [g/m <sup>2</sup> ]	61,9	0,211	0,34
	debelina [mm]	0,093	0,001	0,97
	gostota [kg/m <sup>3</sup> ]	669	14,984	2,24
encimsko obdelana vlakna	gramatura [g/m <sup>2</sup> ]	62,8	0,335	0,54
	debelina [mm]	0,092	0,001	1,09
	gostota [kg/m <sup>3</sup> ]	679	13,503	1,99

Preglednica 3: Osnovne lastnosti laboratorijskih listov izdelanih iz encimsko neobdelanih in obdelanih celuloznih vlaken Eldorado

	osnovne lastnosti	x	S <sub>x</sub>	CV
encimsko neobdelana vlakna	gramatura [g/m <sup>2</sup> ]	63,1	0,378	0,60
	debelina [mm]	0,093	0,001	0,59
	gostota [kg/m <sup>3</sup> ]	678	11,897	1,76
encimsko obdelana vlakna	gramatura [g/m <sup>2</sup> ]	63,6	0,411	0,65
	debelina [mm]	0,093	0,001	1,08
	gostota [kg/m <sup>3</sup> ]	684	9,803	1,43

Encimska obdelava je vlakna naredila nekoliko fleksibilnejša in povečala prisotnost fine frakcije, zato so vrednosti gostote encimsko obdelanih vzorcev nekoliko višje od encimsko neobdelanih.

Encimska obdelava je znižala vrednosti utrznega indeksa in utržne jakosti laboratorijskim listom izdelanim iz celuloznih vlaken UPN Conifer (dolga vlakna) in zvišala omenjeni vrednosti listom izdelanim iz celuloznih vlaken Eldorado (kratka vlakna) (slika 2). Encimska obdelava izboljšala povezave med vlakni obeh vrst celuloznih vlaken, je pa v večji meri skrajšala dolga vlakna iglavcev, kar je vplivalo na znižanje omenjenih vrednosti.

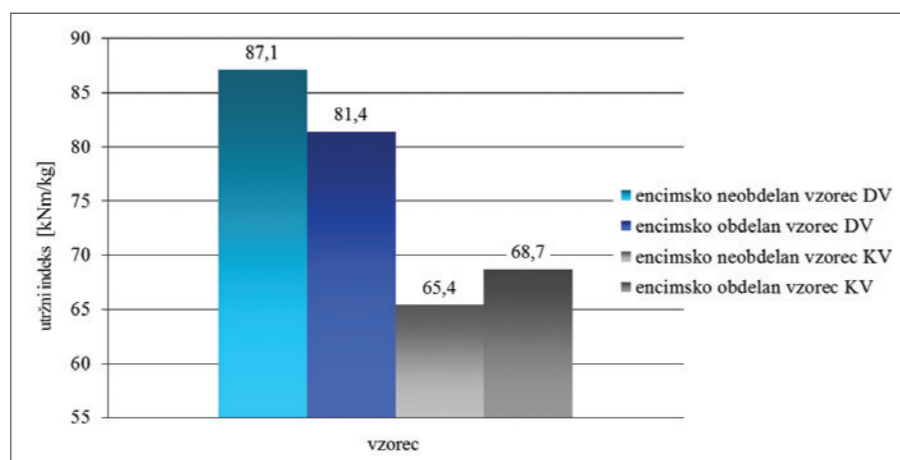
Zaradi močnejših medvlakenskih povezav in večje vsebnosti fine frakcije so

imeli encimsko obdelani vzorci enake ali višje vrednosti raztezkov, kot neobdelani (slika 3).

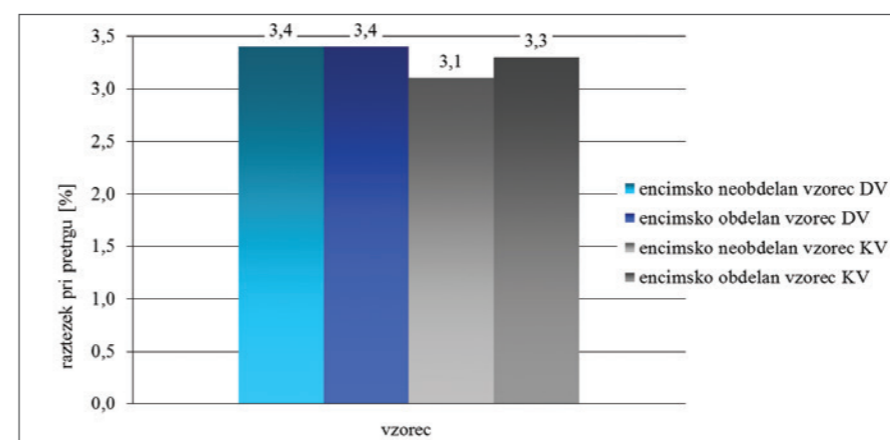
Encimska obdelava je celulozna vlakna skrajšala, kar se odraža v nižjih vrednostih raztržnih indeksov (slika 4).

S slike 5 je razvidno, da se je z encimsko obdelavo znižal razpočni indeks listom izdelanim iz dolgih celuloznih vlaken (UPN Conifer). Skrajšana celulozna vlakna so znižala razpočno odpornost listom izdelanim iz encimsko obdelanih vlaken.

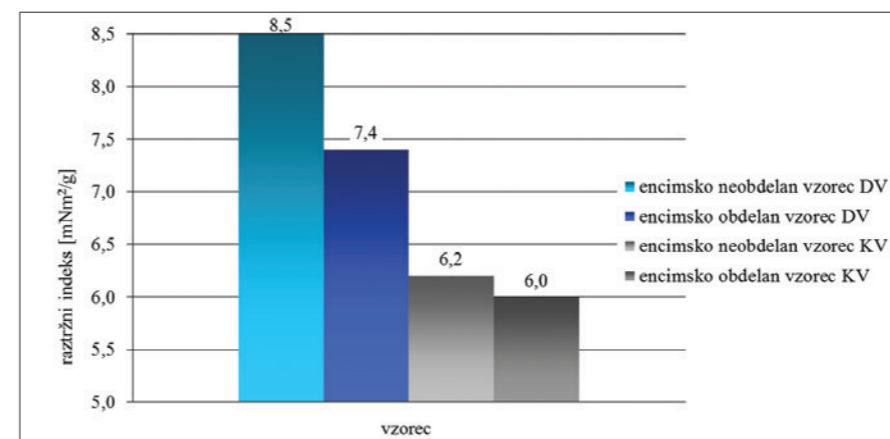
Encimska obdelava pa je utrdila medvlakenske povezave med že po naravi krajšimi vlakni listavcev (Eldorado) in zato povečala razpočni indeks listom izdelanim iz tovrstnih vlaken. S slike 6 lahko zaključimo, da encimska obdelava ni imela bistvenega vpliva na ISO belino vzorcev.



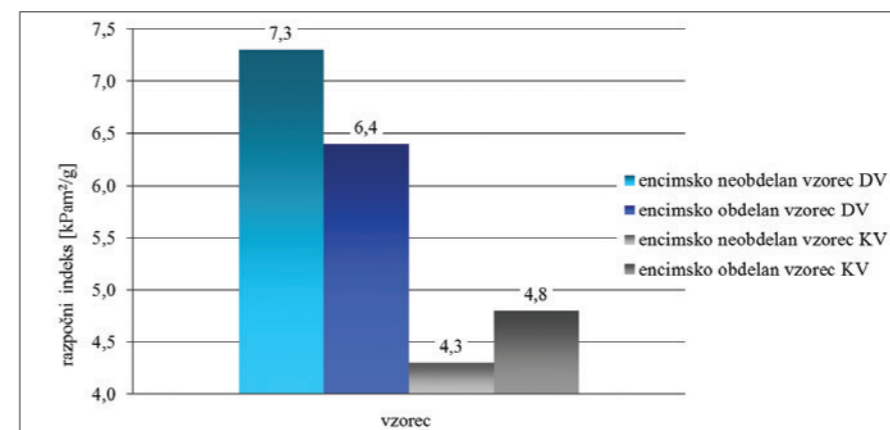
Slika 2: Utržni indeks laboratorijskih listov  
Figure 2: Tensile index of laboratory sheets



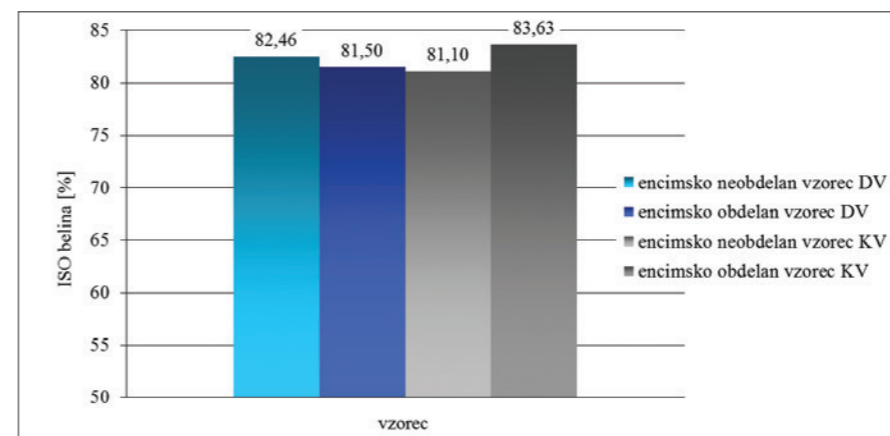
Slika 3: Raztezek pri pretrgu laboratorijskih listov  
Figure 3: Stretch of laboratory sheets



Slika 4: Raztržni indeks laboratorijskih listov  
Figure 4: Tear index of laboratory sheets



Slika 5: Razpočni indeks laboratorijskih listov  
Figure 5: Burst index of laboratory sheets



Slika 6: ISO belina laboratorijskih listov  
Figure 6: ISO brightness of laboratory sheets

### 4 SKLEPI

Z encimsko obdelavo celuloznih vlaken (UPN Conifer in Eldorado) smo njihuni optimalni stopnji mletja (32 °SR DV in 27 °SR KV) dosegli z 10 % krajšim mletjem na laboratorijskem PFI mlinu. Encimska obdelava je nekoliko povečala gostoto obeh vzorcev. Pozitivno je vplivala na praktično vse lastnosti laboratorijskih listov izdelanih iz celuloznih vlaken Eldorado, imela pa je nekoliko slabši vpliv na dolga vlakna iglavcev (UPN Conifer).

Rezultati so dober povod za nadaljnje raziskave na področju uporabe encimov v papirništvu, na katerem bomo zagotovo dejavni tudi v prihodnje.

### 5 LITERATURA

- [1] ŽNIDARŠIČ PLAZL, P., RUTAR, V., RAVNIAK, D. The effect of enzymatic treatments of pulps on fiber and paper properties. Dostopno na spletu: <http://silverstripe.fkit.hr/cabeq/past-issues/article/279>.
- [2] GIL, N., GIL, C., AMARAL, M. E., COSTA, A. P., DUARTE, A. P. Use of enzymes to improve the refining of a bleached Eucalyptus globulus kraft pulp. Dostopno na spletu: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X09001326>.
- [3] NOVAK, G. Grafični materiali. 1. izdaja. Ljubljana : Naravoslovnotehniška fakulteta, Oddelek za tekstilstvo, 2004, 320 str.
- [4] BOYER, F. R. Temelji biokemije. 1. izdaja. Ljubljana : Studentska založba, 2005, 634 str.
- [5] ANDERSEN, N. Enzymatic hydrolysis of cellulose : experimental and modeling studies : doktorska disertacija. Lyngby, 2007, 163 str.
- [6] BAJPAI, P. Biotechnology for pulp and paper processing. 1. izdaja. New York : Springer Science + Business Media, 2012, 414 str.
- [7] SMERAJEK, M. Laboratorijska simulacija uporabe encimov v procesu proizvodnje papirja : diplomsko delo. Ljubljana, 2009, str. 12.

<sup>1</sup>Gregor LAVRIČ, prof. dr. Diana GREGOR SVETEC, Univerza v Ljubljani, Naravoslovnotehniška fakulteta, Snežniška ulica 5, 1000 Ljubljana, <sup>2</sup> dr. Mija SEŽUN, dr. Janja ZULE, Inštitut za celulozo in papir, Bogiščičeva 8, 1000 Ljubljana