الفصل الحادي عشر

التقنية الحيوية الصناعية في قطاع الورق واللب

INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY IN THE PAPER AND PULP SECTOR

ليزا فيكاري، ستينا جرونكفيست، كريستينا كرووس، جاكو بيري، ماتي سيبكا-أهو، و آنا سورناكي

Liisa Viikari, Stina Grönqvist, Kristiina Kruus, Jaakko Pere, Matti Siika-aho, and Anna Suurnäkki

(١١,١) المقدمة Introduction

تسعي صناعة الغابات الحديثة إلى الجمع بين الاستدامة مع الإنتاجية والربحية. وأحد الأهداف في الوقت الحاضر هو زيادة قيمة منتجات الألياف من خلال البحث والتطوير، من أجل خلق منتجاتٍ جديدة وزيادة تطبيقات ومجالات استخدام المواد الخام. وترتبط التحديات العامة التي تواجه هذه الصناعة بتراجع صناعة الغابات التقليدية وشركات صناعة الورق، داعيةً إلى فرصٍ جديدة للنمو وأعلى استعادة للاستثمارات. منذ ثمانينيات القرن الماضي، تم توجيه الضغط الناتج من الآثار البيئية بسبب الحاجة إلى تحسين أداء العملية وتقليل التدفقات إلى البيئة إلى تحسين نوعية وتوافر المواد الخام، وتكلفة الطاقة، وسلاسل الإنتاج إضافية القيمة. وتشمل السلاسل الحالية سلاسل الألياف والطاقة الحيوية، على أن تستكمل في المستقبل بأخرى جديدة، مثل سلاسل المواد الكيميائية والوقود الحيوي.

وكانت البحوث في مجال التقنية الحيوية في صناعة اللب والورق نشطة لعقود عديدة. وشملت خلال السنوات العشرين الماضية الاكتشافات الأساسية في المجال التقارير الأولية على الإنزيمات المحللة للجنين، واستخدام الزيلانيزات في التبييض، والليبيزات لإزالة البقع، والإزالة الإنزيمية للأحبار، وتعديل أسطح الألياف، ومزج اللاكيز مع المواد الوسيطة لإزالة اللجنين. ويعد تطوير المعالجة الميكروبية لرقائق الخشب لأغراض الاستخلاص الحيوي أو لمعالجة مشكلات البقع حالياً خيارات مثيرة للاهتمام لتحسين جودة المواد الخام. في السنوات الأخيرة، استخدم المجال أيضاً التقنية الحيوية لتعديل تركيب الخشب والمواد النباتية الأخرى، على سبيل المثال عن طريق تغيير تركيب اللجنين. وقد فتحت الهندسة الوراثية مجموعة واسعة من الاحتمالات لتحسين نمو

وخصائص المواد الخام في الغابات، مباشرةً عن طريق إدخال جينات جديدة أو عن طريق تعزيز فهم وظائف النبات من خلال البحوث الجينومية جنباً إلى جنبٍ مع الزراعة التقليدية. فيمكن أن تقدم الأشجار سريعة النمو، على سبيل المثال، منخفضة محتوى اللجنين أو ذات خصائص لجنين هيكلية متغيرة، فوائد عملية مهمة. وإزالة اللجنين من جدران الخلايا الخشبية هي الخطوة الأكثر كثافة رأسمالية وإشكالية بيئية في معالجة الخشب للورق واللب. وعليه، يمكن أن يقدم الحد من محتوي اللجنين فوائد اقتصادية وبيئية.

وسوف تساعد أي زيادة في الكفاءة تسمح بإنتاج المزيد من الخشب والمنتجات الخشبية من مساحة أقل من الأرض على المحافظة على الغابات الطبيعية وتقليل الأثر البيئي لمعالجة الخشب إلى منتجات اللب والورق. ولا يزال هناك شوطاً طويلاً، مع ذلك؛ لاستغلال هذه التحسينات العملية. سوف يعتمد الاستغلال المستقبلي لأشجار الغابات المعدلة وراثياً على الإجابات التي تعطي للأسئلة العلمية والأخلاقية، وكذلك على الحوار والتوافق الذي يتم التوصل إليهما بين الصناعة والجمهور. ومع ذلك، سوف يساعد الفهم الأساسي لآليات تخليق مكونات الخشب والألياف على تحسين نوعية الألياف حتى بواسطة تقنيات الزراعة التقليدية المستخدمة بالفعل في الغابات.

كانت هناك توقعات كبيرة لظهور تقنيات جديدة متطورة اعتماداً على التقنية الحيوية في صناعة اللب والورق. وقد أثبت تنفيذ مراحل أو معالجات التقنية الحيوية الاقتصادية والقابلة للتطبيق من الناحية الفنية على مستوى عملية الطحن أنه يكون صعباً. فتطبيقات التقنية الحيوية المنافسة للعمليات الميكانيكية و/ أو الكيميائية يجب أن تتجاوز أدائها وينتج عنها فوائد اقتصادية دون تغيير جودة المنتج حتى يتسنى لها القبول. ويبدو أن معظم تطبيقات التقنية الحيوية المستقبلية من المرجح أن توجد في مجالات المنتجات المتخصصة، والتغييرات المستهدفة للألياف والتحكم في سلامة المنتجات.

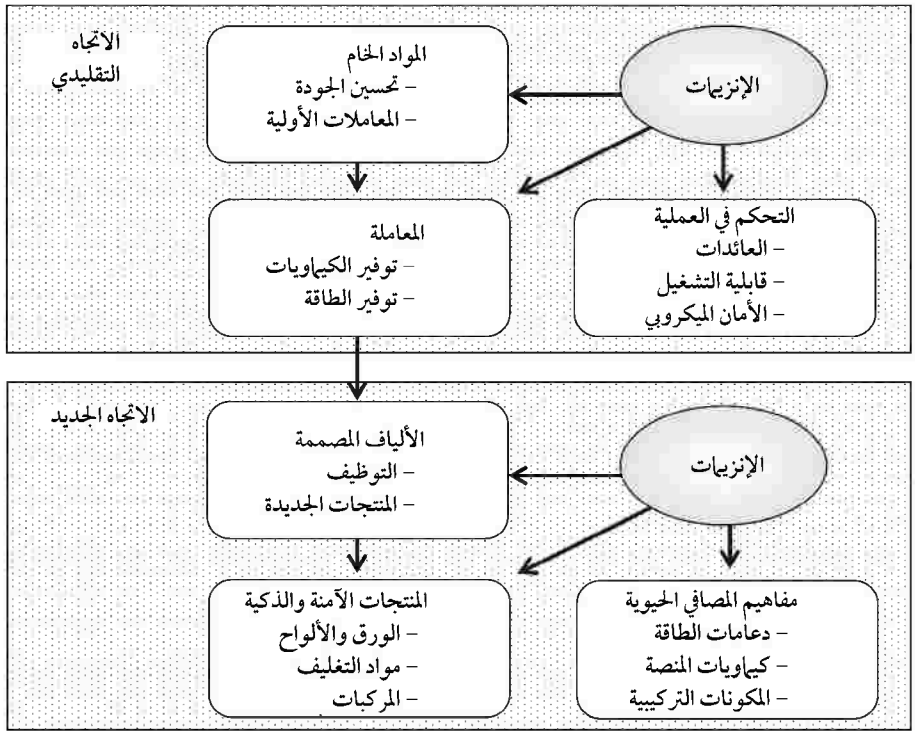
إن إدخال الإنزيمات الناجح إلى عمليات اللب والورق يتطلب على الأقل تحقيق المعايير التالية:

- يجب الحصول على فوائد اقتصادية واضحة من المرحلة الإنزيمية.
- يجب الحفاظ على أو تحسين ثبات جودة ومعالجة مواد الألياف.
- يجب أن لا تحدث تغييرات غير مرغوب فيها في قدرة العملية على التشغيل.
- يجب توفر الإنزيم المناسب في كميات كبيرة وبسعرٍ معقول للمحاولات على مستوى الطاحونة وبعد ذلك للاستخدام الصناعي سريعاً.

إن استخدام الإنزيمات المختلفة في تعديل أو هندسة الألياف، بالإضافة إلى استخدامها كمساعدات للعملية، هو مجال مثير للاهتمام وممكن التطبيق لكلٍ من اللب الكيميائي والميكانيكي (الشكل رقم ١ , ١١). يمكن إيجاد خصائص ألياف محسنة أو خصائص جديدة تماماً للألياف عن طريق التعديل المستهدف لسطح الألياف

بالمعالجة الإنزيمية أو الإنزيمية الكيميائية المزدوجة. ويمكن استخدام هندسة الألياف لتحسين خصائص تصنيع الورق والألواح لألياف اللب ولتعديل الألياف المناسبة للتطبيقات غير الورقية.

ولن تكون مصادر الطاقة غير المتجددة التي يعتمد عليها حالياً بصورةٍ كبيرة متاحة في المستقبل بالكميات المستخدمة حالياً. وعليه، فمن الضروري النظر في التوسع في استخدام الكتلة الحيوية النباتية، وخاصةً المواد الخام للغابات المتوفرة بكثرة. ومفهوم المصفاة الحيوية هو مماثل لمفهوم مصفاة البترول حيث يتم تجزأة مادة أولية وحيدة وتحويلها إلى الكثير من المنتجات السلعية. ومواد الغابات الخام لها امكانية كبيرة للحد من انبعاثات غازات الاحتباس الحراري عن طريق تحويل مواد الغابات في المصافي الحيوية إلى وقود سائل، ومواد كيميائية، وغيرها من المنتجات. وسوف تؤدي التقنية الحيوية الصناعية أيضاً دوراً حيوياً في هذه التطبيقات المستقبلية (الشكل رقم ١ , ١١).



الشكل رقم (١ , ١١). بؤر الاهتمام التقليدية والجديدة للتطبيقات الإنزيمية في صناعة اللب والورق.

(٢ , ١١) الإنزيمات لصناعة اللب والورق Enzymes for the Pulp and Paper Industry

بسبب الكيمياء المعقدة الموجودة في المواد الخشبية، فإنه يمكن استخدام عدد من مختلف الإنزيمات لتحسين عمليات اللب والورق. تمت دراسة السليوليزات بشكلٍ مكثف لأكثر من عقدين وتم كشف آليات تفاعل الكثير من بروتينات الإنزيمات على المستوى الجزيئي. وعلم إنزيمات الهيميسليوليزات هو أيضاً راسخ. ومؤخراً، تم فهم

الآليات التفصيلية لإنزيمات الأكسدة بصورةٍ كبيرة. وفتح مفهوم استخدام إنزيم أكسدة مع جزئيات وسيطة ناقلة للإلكترون آفاقاً جديدة لتقنيات الأكسدة المعتمدة على الإنزيم وإزالة اللجنين. وقد انخفضت أسعار الهيدروليزات التجارية عدة أضعاف خلال العقدين الأخيرين. وهناك توقع لمزيد من التحسينات الوظيفية، وخاصةً للإنزيمات النشطة في الظروف القاسية. وقد تم بالفعل تطوير إنزيمات جديدة تتحمل ظروف الحرارة والقلوية العالية لظروف العملية القاسية (أي ارتفاع أو انخفاض درجة الرقم الهيدروجيني و/ أو ارتفاع درجة الحرارة) السائدة عادةً في عمليات تصنيع اللب والورق.

(١ , ٢ , ١١) السليوليزات Cellulases

السليولوز هو الكربوهيدرات الرئيس في المواد اللجنوسليولوزية. وهو بوليمر متجانس بسيط كيميائياً، يتكون من وحدات بيتا-١،٤-أنهيدروجلوكوبيرانوزيد مرتبطة. وفي ألياف النبات، ومن ثم في لب السليلوز، تتحاذي سلاسل السليلوز الفردية بصورة متوازية، مشكلةً السليولوز ١، وسلاسل السليولوز من الألياف الأولية المرتبطة بإحكام والتي تتجمع لتشكل تراكيب ليفية أكبر [١، ٢]. يحتوي السليولوز على مناطق منتظمة بلورية وأخرى غير متبلورة أقل انتظاماً. وفي ألياف الخشب يختلف اتجاه تعرج ليفات السليولوز الدقيقة في مختلف طبقات جدار الخلية معطياً الألياف قوتها ومرونتها الفريدة.

السليولوز البلوري هو السكر العديد الأكثر مقاومةً في المواد اللجنوسليولوزية ويتطلب جهوداً متضافرة من عدة إنزيمات، والتي يمكن تصنيفها إلى إندو-بيتا-١،٤-جلوكانيزات (EC 3.2.1.4)، وسيلوبيوهيدريزات (EC 3.2.1.91)، وبيتا-جلوكوسيديزات (EC 3.2.1.21). والسيلوبيوهيدريزات التي تحرر وحدات السيلوبيوز بالتتابع من نهايات سلاسل السليولوز هي الإنزيمات الرئيسة في التحلل الكلي للسليولوز البلوري. وهي تشكل حوالي ٨٠٪ من مجموع البروتينات المحللة للسليولوز المفرزة من الفطر الخيطي ترايكوديرما ريسيي، والذي لديه واحد من أكثر النظم المحللة للسليولوز دراسة على نطاقٍ واسع والمطبق صناعياً [٣]. تعمل الإندوجلوكانيزات بشكلٍ رئيس على المناطق غير المتبلورة من ألياف السليولوز بينما تحلل البيتا-جلوكوسيديزات السيلوبيوز بعد ذلك إلى الجلوكوز.

السيلوبيوهيدريزات والإندوجلوكانيزات الفطرية المنشأ عادةً ما يكون لها تركيب متعدد المجالات يتكون من وحدة تحفيز كبيرة متصلة بواسطة ببتيد رابط إلى مجال ربط سليولوز صغير (CBD) أو مجال ربط الكربوهيدرات (CBM) [٤، ٥]. وهناك حاجة للـ CBD للنشاط الكامل لهذه الإنزيمات على وسائط التفاعل البلورية. وقد تبين أن قدرة السيلوبيوهيدريزات على تحليل السليولوز البلوري تقل بشكلٍ واضح عند غياب الـ CBD [٦]. وقد تم

استكشاف هذه الخاصية في تعديل الألياف من أجل الحد من تحلل لييفات السليولوز غير المرغوب فيه. وفي الوقت الحاضر، يتم تجميع الهيدروليزات وفقاً لتشابه تسلسلها والتفاف بروتين مجالاتها المحفزة إلى أكثر من ٧٠ عائلة (http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html).

تقليدياً، كانت السليوليزات التجارية تتألف من مخلوطات إنزيمية متعددة المكونات تنتج أساساً من السلالات الفطرية. وسببت هذه سابقاً مشكلات في الاستخدام الصناعي؛ بسبب عدم تخصصيتها وقوة تحليلها العالية، والتي تضر بخصائص قوة اللب. ووفرت التقنية الحيوية الحديثة أدوات فعالة لاكتشاف البروتينات الجديدة وإنتاجها بكفاءة على مستوى صناعي. وقد أدى ذلك إلى إتاحة تحضيرات سليوليز أحادية المكون تجارياً والمصممة لتطبيقات خاصة للعملية. ويمكن أيضاً أن تجد الإنزيمات أحادية المكون التي يتم تسويقها لتطبيقاتٍ أخرى (على سبيل المثال، الإندوجلوكانيزات لمعالجة المنسوجات) استخدامات في معالجة اللب والورق. عادةً تكون السليوليزات التجارية من أصلٍ فطري (من الترايكوديرما، والهوميكولا، والأكريمونيوم) وعادة ما يتم إنتاجها في السلالات الفطرية المعدلة وراثياً (على سبيل المثال، الترايكوديرما أو الأسبرجيلس).

(٢, ٢, ١١) الهيميسليوليزات Hemicellulases

الزيلان والجلوكومانان هما أكثر اثنين من هيميسليولوزات الخشب شيوعاً. تحتوي الأخشاب الصلبة أساساً على الزيلان، الذي يتكون من وحدات بيتا-دي-زيلوبيرانوزيل مع حمض ٤-*O*-ميثيل-ألفا-دي-جلوكورونيك ومجموعات أسيتيل جانبية. يرتبط حمض ٤-*O*-ميثيل-جلوكورونيك بعمود الزيلان الفقري بواسطة رابطة جليكوسيدية *O*-(١،٢) وتتم أسترة حمض الخليك في ذرة الكربون ٢ و/أو مجموعة الهيدروكسيل على ذرة الكربون ٣. وفي الأخشاب اللينة، يكون الجلوكومانان هو الهيميسليولوز الرئيس. وحوالي ثلث هيميسيلولوز الخشب اللين هو أرابينو-٤-*O*-ميثيل جلوكورونوزيلان، والذي يتم فيه استبدال عمود الزيلان الفقري في ذرة الكربو ٢، ٣ بحمض ٤-*O*-ميثيل-ألفا-دي-جلوكورونيك وأطراف ألفا-إل-أرابينوفيورانوزيل، على التوالي. وجالاكتوجلوكومانان الخشب اللين له عمود فقري من وحدات بيتا-دي-جليكوبيرانوزيل مرتبطة في الوضع بيتا-(١،٤) ووحدات بيتا-دي-مانوبيرانوزيل والتي يتم استبدالها جزئياً بألفا-دي-جالاكتوبيرانوزيل ومجموعات اسيتيل. ويختلف توزيع الكربوهيدرات في ألياف الخشب؛ تبعاً لأنواع الأشجار وظروف النمو [٧].

يحدث تغيير جذري في حجم وتكوين مكونات الهيميسليولوز في طريقة طهي كرافت. ويتم تحليل جميع مجموعات الأسيتيل وتحويل معظم مجموعات حمض الجلوكورونيك في الزيلان إلى مجموعات حمض هيكسينورونيك [٨]. ويتم نزع الأسيتيل من جلوكومانان الخشب وإذابة جزء كبير في سائل الطبخ عالي

القلوية والساخن جداً [٧]. وهكذا، تزيد كمية الزيلان النسبية في لب الخشب اللين بطريقة كرافت خلال عملية الاستخلاص.

تحفز الإندوزيلانيزات (EC 3.2.1.8) التحليل العشوائي لروابط البيتا-دي-١،٤ الزيلوزيدية في الزيلانات. وتنتمي معظم الزيلانيزات إلى مجموعتي هيدروليزات الجليكوزيل المختلفين تركيبياً (العائلة ١٠ و١١). وقد ذكر أن بعض الزيلانيزات تحتوي إما مجال رابط للزيلان [٩] وإما مجال رابط للسليولوز [١٠، ١١]. وقد وجد أن بعض مجالات الربط تزيد من درجة التحليل للزيلان المرتبط بالألياف بينما بعضهم الآخر لا يفعل. ولم يثبت أن للمجال الرابط للزيلان أو للسليولوز أي دور مهم في عمل الزيلانيزات على ألياف اللب [١٢]. ومعظم الزيلانيزات التي تم توصيفها قادرة على تحليل أنواع مختلفة من الزيلانات وتظهر الاختلافات فقط في طيف المنتجات النهائية. وتم توصيف عدد من الإنزيمات التي تنتجها الكائنات الحية القادرة على العيش في الظروف القاسية، ولكن من المدهش أن القليل قد وصل إلى الاستخدام التجاري، من الواضح؛ بسبب مشكلات تتعلق بإنتاجها الفعال في السلالات المضيفة المغايرة.

تحفز الإندومانانيزات (EC 3.2.1.78) التحليل العشوائي لروابط البيتا-دي-مانانوبيرانوزيل داخل السلسلة الرئيسة للمانانات والسكريات المختلفة التي تتكون أساساً من المانوز، مثل الجلوكومانانات، والجالاكتومانانات والجالاكتوجلوكومانانات. وتبدو المانانات أيضاً مجموعة إنزيمات غير متجانسة أكثر من الزيلانيزات. ووجد أن المانانيز من الترايكوديرما ريسيي له تركيب متعدد المجالات مماثل لذلك الموجود في الكثير من الإنزيمات المحللة للسليولوز؛ أي أن البروتين يحتوي على مجال تحفيز أساسي يتم فصله عن طريق رابط عن المجال الرابط للسليولوز [١٣، ١٤]. ووجد أن الـ CBD يزيد عمل المانانيز من الترايكوديرما ريسيي على الجلوكومانان المرتبط بالألياف على الرغم من أن المجال المحفز قادر على تحليل المانان البلوري بكفاءة [١٥]. ويعتمد عائد الجلوكومانان من التحليل على درجة الاستبدال وكذلك على توزيع المستبدلات [١٦]. ويتأثر تحليل الجلوكومانان أيضاً بنسبة الجلوكوز-إلى-المانوز.

ويمكن شق المجموعات الجانبية المرتبطة بسلاسل الزيلان والجلوكومانان الرئيسة بواسطة ألفا-جلوكورونيديز (EC 3.2.1.131)، وألفا-أرابينوزيديز (EC 3.2.1.55)، وألفا-جالاكتوزيديز (EC 3.2.1.22). وتتم إزالة مستبدلات الأسيتيل المرتبطة بالهيميسليولوز بواسطة الإستيريزات (EC 3.1.1.72) [١٧]. وتكون معظم الإنزيمات التي تشق المجموعات الجانبية قادرة على العمل فقط على وسائط التفاعل الأوليجومرية التي تنتجها الإنزيمات التي تفكك بلمرة العمود الفقري، أي، الزيلانيزات والمانانيزات. وعدد قليل فقط من الإنزيمات قادر على مهاجمة الوسائط البوليمرية السليمة. ومع ذلك، فإن أكثر الإنزيمات المساعدة من هذا النوع الأخير تفضل وسائط التفاعل الأوليجومرية.

تشمل الروابط التساهمية التي تربط اللجنين والهيميسيليولوز في جدران الخلايا النباتية الروابط الإسترية بين كحولات اللجنين ومجموعات الكربوكسيل لأحماض اليورونيك في الجلوكورونوزيلانات. مؤخراً، تم إثبات وجود إنزيم الكربوهيدرات إستيريز الذي يمكن أن يحلل هذه الروابط [١٨]. وتخصصية وسط التفاعل لهذا الجلوكورونيل إستيريز، الذي يهاجم حصرياً استرات حمض ٤-O-ميثيل-دي-الجلوكورونيك، متميزة عن تلك التي لإستيريزات الكربوهيدرات الأخرى، مثل إستيريز الأسيتيل زيلان، وإستيريز الفيريوليل، وإستيريز البكتين ميثيل.

(١١, ٢, ٣) الترانسفيريزات Transferases

تشمل الإندوجلوكانيزات المتخصصة للزيلوجلوكان فئة جديدة من الإنزيمات المحللة للسكريات العديدة، التي يمكن أن تهاجم عمود الجلوكان الفقري أيضاً في مواضع استبدال أطراف الجلوكوز [١٩]. إندو-ترانس جليكو زيليز الزيلوجلوكان (XET, EC 2.4.1.207) قادر على نقل جزء عالي الوزن الجزيئي من زيلوجلوكان مانح إلى متقبل مناسب مثل سكر أحادي مشتق من الزيلوجلوكان. وقد وجد أن الزيلوجلوكانيز من الأسبرجيلس نيجر يكون فعالاً ضد الكثير من البيتا-جلوكانات، ولكن لديه نشاط أعلى ضد زيلوجلوكان التمر الهندي [٢٠]. وقد تم توصيف إنزيم متخصص للنبات يعتقد أنه مسؤول عن تعديل الزيلوجلوكان في جدار الخلية من خلال نشاط التحليل الداخلي والجليكوزيل ترانسفيريز [٢١، ٢٢]. وبسبب القدرة الكامنة في XET لتحفيز انتقال الجليكوزيل بدلاً من التحليل، فإن هذا الإنزيم لديه إمكانات لتعديل الألياف [٢٣].

(١١, ٢, ٤) الإنزيمات المؤكسدة المعدلة للجنين Lignin-Modifying, Oxidative Enzymes

اللجنين هو، بوليمر عطري، غير متبلور، وغير متجانس يشكل جزءاً لا يتجزأ من جدار الخلية، يتغلل في مصفوفة بوليمر الكربوهيدرات من السليولوز والهيميسيليولوز. يضم اللجنين ثلاث وحدات فينيل بروبانويد: جوايأسيل، وسيرينجيل، ووحدات هيدروكسي فينيل. ويختلف تكوين اللجنين الدقيق على نطاقٍ واسع مع نوع الشجرة، ولكن كقاعدةٍ عامة، يحتوي الخشب اللين أساساً على وحدات جوايأسيل بينما الأخشاب الصلبة تحتوي أيضاً على وحدات بناء من السيرينجيل. وقد قيل أن كلاً من تركيب اللجنين الكيميائي ثلاثي الأبعاد يتأثر بقوة بمصفوفة السكريات العديدة. على عكس السليولوز والهيميسيليولوز، فإن اللجنين ليس عرضة لهجوم الإنزيمات المحللة. وقد تمت دراسة الإنزيمات المعدلة له بطريقةٍ مكثفة لأكثر من ٣٠ عاماً، وأدت البحوث إلى تعريف نظم الإنزيم الرئيسة المعتقد مشاركتها في إزالة اللجنين.

تشمل البروكسيديزات والأوكسيديزات التي تفرز خارج الخلية التي يعتقد أنها تشارك في تحليل اللجنين بيروكسيديزات اللجنين (LiP, EC 1.11.1.14)، وبيروكسيديزات المنجنيز (MnP, EC 1.11.1.13)، وبيروكسيديزات متنوعة (VP, EC 1.11.1.16)، واللاكيزات (EC 1.10.3.2)، وكذلك الإنزيمات المنتجة لفوق أكسيد الهيدروجين، مثل أوكسيديز الكحول الأريلي (AAO, EC 1.1.3.7) وأوكسيديز الجليوكزال (EC 1.1.3.-) التي تنتجها فطريات العفن الأبيض وفطريات تحليل القمامة المحللة للجنين في تركيبات مختلفة [٢٤]. على الرغم من الهندسة البنائية المختلفة تماماً للبروتين، فإن إنزيمات البيروكسيديزات واللاكيزات تشترك في خصائص مهمة فيما يتعلق بالوسائط المختزلة. ومع ذلك؛ نظراً للاختلافات بين التراكيب ثلاثية الأبعاد، والمجموعات الاصطناعية، ومتقبلات الإلكترون، فإن البيروكسيديزات واللاكيزات تعمل بآليات تحفيز مختلفة جداً.

وقد زاد تحليل علاقة التركيب بالوظيفة إلى حدٍ كبير من معرفتنا للإنزيمات المعدلة للجنين وطريقة عملها على المركبات العطرية. ومع ذلك، لا تزال المعلومات عن كيفية عمل هذه الإنزيمات على اللجنين البوليمري غير كاملة.

بسبب الطبيعة غير التخصصية للتحفيز بواسطة الإنزيمات المعدلة للجنين فإنه ينظر إلى تطبيقاتها في التقنية الحيوية على أنها واعدة للغاية. في المختبر، تؤدي تفاعلات الأكسدة لهذه الإنزيمات بشكلٍ رئيس إلى بلمرة اللجنين. وقد أظهرت الإنزيمات المحللة للجنوسليولوز، أنها تسبب تحليل محدود للجنين بشرط التدعيم بالمواد المضافة، مثل الكحول وفوق أكسيد الهيدروجين للـ LiP [٢٥]، المنجنيز، وفوق أكسيد الهيدروجين، والأحماض العضوية والمواد المقللة للتوتر السطحي للـ MnP [٢٦، ٢٧] والمواد الوسيطة للاكيزات. وبسبب النتائج الواعدة، فقد أصبحت اللاكيزات والبيروكسيديزات المعتمدة على المنجنيز مؤخراً أكثر المجموعات الإنزيمية دراسة على نطاقٍ واسع في مجال تحليل اللجنين.

(١, ٤, ٢, ١١) البيروكسيديزات Peroxidases

البيروكسيديزات المحللة للجنين، LiP, MnP, VP، هي بروتينات هيم مرتبطة تركيبياً تؤكسد أوساط تفاعلها بفوق أكسيد الهيدروجين كمتقبل للإلكترونات من خلال آلية أكسدة أحادية الإلكترون، مثل جميع البيروكسيديزات الأخرى. LiPs قادرة على أكسدة أوساط تفاعل مختلفة بما في ذلك الكحول الفيراتريلي، وتراكيب اللجنين الفينولية وغير الفينولية. وتنتج التفاعلات المحفزة بالـ LiP شقوق كاتيونية للأريل والفينوكسيل. ويؤدي تشكيل الشقوق الكاتيونية في تراكيب اللجنين غير الفينولية إلى تفاعلات غير متخصصة، مما يؤدي في نهاية المطاف إلى انقسام الحلقة [٢٨]. وقد تم توصيف الـ LiPs من الكثير من فطريات العفن الأبيض. والتراكيب ثلاثية الأبعاد

للـ LiPs من فانيروشيتي كريزوسبوريوم متاحة [٢٩، ٣٠]. وقد جرت محاولات لإنتاج الـ LiP بإفراط في العوائل غير المتجانسة وكانت في معظمها غير ناجحة وأعاق هذا الاستغلال التجاري للإنزيم.

تؤكسد البيروكسيديزات التي تعتمد على المنجنيز (MnP) المنجنيز$^{+2}$ إلى المنجنيز$^{+3}$. وعملية حجب المنجنيز$^{+3}$ بواسطة الأحماض العضوية هي ضرورية من أجل تحقيق استقرار الأيون وتحفيز تحرره من الإنزيم. ويمكن لحاجب المنجنيز$^{+3}$ أن يؤكسد أوساط فينولية مختلفة، والأحماض الكربوكسيلية، والدهون غير المشبعة. عندما يؤكسد المنجنيز$^{+3}$ تراكيب اللجنين الفينولية، تتكون شقوق وتحدث مجموعة متنوعة من التفاعلات غير المتخصصة، مما يؤدى إلى منتجات مشابهة لتلك الصادرة عن الـ LiPs (كما استعرض فـي المرجع [٣١]). ومن المثير للاهتمام، أن الـ MnP تبين أنها تعزز الأكسدة الفوقية للدهون غير المشبعة بدون إضافة فوق أكسيد الهيدروجين. وفي تفاعلات الأكسدة الفوقية المعتمدة على الدهون يستطيع الـ MnP أكسدة حتى تراكيب اللجنين غير الفينولية [٣٢]. وقد تم تعيين الـ MnP في معظم الفطريات المحللة للجنين التي درست حتى الآن [٣٣، ٣٤]، مما يوحي بدورٍ حاسمٍ في تحليل اللجنين.

وقد تم مؤخراً وصف بيروكسيديزات متنوعة كعائلة جديدة من البيروكسيديزات المحللة للجنين [٣٥]. وحتى الآن، يبدو أن الـ VP تنتجها فقط عدة فطريات، بما في ذلك البلوروتاس، والبجيركانديرا، والليبيستا. والجانب الأكثر لفتاً للنظر للـ VP هو أنها تجمع خصائص التخصصية لوسط التفاعل لعائلات البروكسيديزات الفطرية الأخرى. وهي من ثم قادرة على أكسدة مجموعة متنوعة من أوساط التفاعل (عالية ومنخفضة الجهد الاختزالي) بما في ذلك المنجنيز$^{+2}$، وثنائيات اللجنين الفينولية وغير الفينولية، وحمض ألفا-كيتو-جاما-ثيوميثيل بيوتيريك (KTBA)، والكحول الفيراتريلي، والبنزيات ثنائية الميثوكسي، والأنواع المختلفة من الأصباغ، والفينولات المستبدلة، والهيدروكينونات. وقد اقترح أن خصائص التحفيز للبيروكسيديزات الجديدة هي نتيجة لهجين الهندسة البنائية الجزيئية التي تشمل مواقع مختلفة لارتباط وسط التفاعل وللأكسدة [٣٦، ٣٧].

(٢,٤,٢,١١) اللاكيزات Laccases

اللاكيزات هي إنزيمات شائعة في الطبيعة. ويفترض أنها إنزيمات الأوكسيدوريداكتيزات الأكثر شيوعاً في فطريات العفن الأبيض وتوجد أيضاً على نطاقٍ واسع في الفطريات الأخرى، وبعض البكتيريا، وكذلك في النباتات والحشرات. وقد ذكر أن اللاكيزات النباتية لها دور مهم في استجابة الجرح وتخليق اللجنين، في حين تشارك اللاكيزات في الفطريات في تحليل اللجنين ولها عدة وظائف أخرى بما في ذلك التصبغ، وتكوين أجسام الاثمار، والتجرثم، وكذلك الإمراض [٣٨-٤٠].

اللاكيزات هي إنزيمات معدن النحاس تحتوي على أربع ذرات نحاس في موقع نشاطها. ومن المستغرب أن لديها تخصصية واسعة لوسط التفاعل وتحفز أكسدة المركبات الفينولية المختلفة، والأمينات العطرية، وحتى بعض الجزيئات غير العضوية. تؤكسد اللاكيزات أوساط تفاعلها بآلية إزالة إلكترون واحد وتستخدم الأكسجين الجزيئي كمتقبل إلكترون نهائي. وتقتصر قدرة اللاكيزات على أكسدة اللجنين على الوحيدات الفينولية. وتتكون الشقوق الفينولية في اللجنين وتخضع لمزيدٍ من التفاعلات الأخرى غير المتخصصة، والتي يمكن أن تؤدي إلى شق رابطة ذرة الكربون ألفا مع الأريل، ونزع مجموعة الديميثوكسيل، وتفاعلات البلمرة [٤١].

والكثير من تراكيب اللاكيزات الكاملة متاحة في الوقت الحاضر [٤٢-٤٤]، مما يساعد في فهمنا للتحفيز. ومع ذلك، لا تزال الآلية المفصلة التي تؤكسد بها اللاكيزات أوساط تفاعلها غير مفهومة تماماً. وبعد اكتشاف مفهوم الوسيط في بداية تسعينيات القرن الماضي [٤٥، ٤٦]، تمت دراسة اللاكيزات دراسة مكثفة لتحليل اللجنين من لب كرافت. واللاكيزات متاحة تجارياً للتطبيقات على المستوى الصناعي، وذلك أساساً لتبيض الدنيم.

(١١,٣) الإنزيمات كمساعدات في العملية Enzymes as Process Aids

تتكون ألياف الخشب أساساً من السليولوز، والهيميسيليولوز (أي الزيلان والجلوكومانان)، واللجنين، والمواد الاستخراجية. ولا تحدث أية تغييرات كيميائية رئيسة في مكونات الألياف في عملية الاستخلاص الميكانيكي للب، في حين أنه في الاستخلاص الكيميائي، إما طهي كرافت (كبريتات) أو السلفيت، فإنه تتم إزالة حوالي ٩٠٪ من اللجنين من الألياف. ويتم تعديل مكونات الهيميسيليولوز أيضاً بصورةٍ مكثفة من خلال الذوبان، والتحلل الجزئي، وإعادة الترسيب [٤٧]. وعليه، تختلف التراكيب الكيميائية والهياكل للألياف المعاملة ميكانيكياً وكيميائياً. والهيكل الأكثر انفتاحاً للألياف الكيميائية مقارنة مع الألياف الميكانيكية يجعلها أكثر عرضة لعمل الإنزيمات عالية الجزيئات. حتى في اللب الكيميائي، مع ذلك، يقتصر عمل الإنزيمات على الأسطح التي يمكن الوصول إليها، أي للدقائق وللسطح الأبعد والمسام التي يمكن الوصول إليها للألياف الطويلة [٤٨]. ولذلك، يمكن اعتبار المعالجة الإنزيمية للألياف طرق تعديل متخصصة للأسطح.

وقد تم تطوير المفاهيم لاستخدام الإنزيمات في تجهيز اللب والورق خلال السنوات العشرين الماضية. ويصف الجدول رقم (١١,١) الفوائد المستهدفة في مختلف التطبيقات. وسوف توصف التطبيقات الرئيسة أدناه.

الجدول رقم (١ , ١١). تطبيقات الإنزيمات في معالجة اللب والورق.

التطبيق	فوائد العملية أو التقنية	الإنزيم	التحديات
معالجة (رقائق) الخشب الأولية	توفير الطاقة في نزع اللحاء	السليوليزات البكتينيزات مخلوط	تغلغل الإنزيمات في طبقة الكامبيوم
معالجة اللب الميكانيكية	توفير الطاقة في تنقية اللب الحراري الميكانيكي (TMP) زيادة مرونة الألياف	السليوبيوهيدروليزات الزيلانيزات	تغلغل الإنزيمات إلى الرقائق
معالجة اللب الكيميائية	انخفاض استهلاك الكيماويات انخفاض استهلاك الطاقة منتجات متخصصة/ ورق عالي الكثافة	إندوجلوكانيز إنزيمات مختلطة إندوجلوكانيزات	الحفاظ على خصائص المتانة التحكم في العملية
تبييض اللب الميكانيكي	توفير الكيماويات منع ارتداد اللمعان	اللاكييز + وسيط	التكلفة ضد الكفاءة
تبييض اللب الكيميائي	لمعان نهائي عالي توفير الكيماويات	الزيلانيزات اللاكييز + مواد وسيطة	التأثير المحدود للزيلانيز الكفاءة والتحلل الحيوي للمواد الوسيطة تكلفة المعالجة
صناعة الورق	تحسين التجفيف سلاسة تشغيل ماكينة الورق	إندوجلوكانيز هيميسليوليزات	التحكم في العملية
نزع الأحبار	زيادة خروج جزئيات الحبر زيادة خروج جزئيات الحبر	سليوليزات مختلطة أميليزات	التحكم في العملية
المواد الذائبة والغروية في مياه العملية	انخفاض مشكلات البقع زيادة قدرة تشغيل ماكينة الورق	ليبيز إستيريزات لاكييز مانانييزات	التحكم في العملية
الأغشية الحيوية (البروتينات والسكريات العديدة)	التحكم في الشحم	إستيريزات وإضافات كيميائية	تنوع مكونات الشحم

(١,٣,١١) استخلاص اللب Pulping

(١,١,٣,١١) استخلاص اللب كيميائياً Chemical Pulping

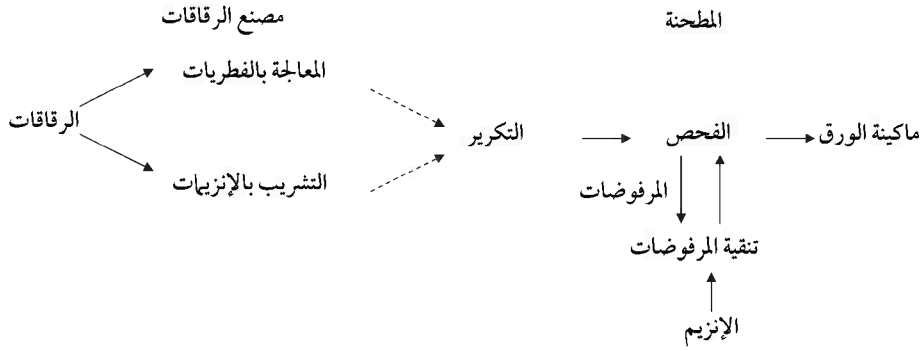
في استخلاص اللب كيميائياً، يتم فصل ألياف الخشب عن بعضها ببعض من أجل جعلها مناسبة لعملية صنع الورق. في عملية استخلاص اللب، تتم اذابة الصفائح الملجننة الوسطى التي تقع بين ألياف الخشب بواسطة الكثير من المواد الكيميائية. وطريقة استخلاص اللب السائدة حالياً هي عملية كرافت، التي تجمع بين القلوية العالية (الرقم الهيدروجيني ١٢-١٤)، والسلفنة، ودرجة الحرارة العالية (١٦٥-١٧٠ درجة مئوية). ويحدث تعديل مكثف للهيميسليوليزات خلال عملية استخلاص اللب. خلال عملية طهي كرافت التقليدية، تتم أولاً إذابة جزء من اللهيميسليوليزات في محلول الطبخ. وفي المراحل اللاحقة، عندما تنخفض قلوية محلول الطبخ، يحدث نقل لجزء من الزيلان المذاب على ألياف السليولوز. في الأخشاب اللينة، تتم إذابة معظم الجلوكومانان وتحليله خلال استخلاص كرافت للب. وهكذا، تزيد كمية الزيلان النسبية في عملية كرافت للب الصنوبر مقارنةً مع ذلك في خشب الصنوبر. تختلف كيمياء الزيلان المتبقي أيضاً عن الزيلان الأصلي في اللب حيث يتم تحويل جزء من حمض الجلوكورونيك إلى حمض الهيكسينورونيك خلال لب كرافت.

بالإضافة إلى الزيلان، تتم إعادة ادمصاص اللجنين جزئياً على الألياف. وقد وجد أن اللجنين يكون مرتبطاً إلى الهيميسليولوز، مشكلاً متراكبات اللجنين-الكربوهيدرات. وعلاوةً على ذلك، يبدو أن الهيميسليولوزات تقيد مرور اللجنين عالي الكتلة الجزيئية إلى خارج جدار خلايا الألياف. ويمكن بالتالي توقع ازالة الهيميسليولوزات، خاصةً الزيلان؛ وذلك لتحسين استخلاص اللجنين المتبقي البني الداكن من اللب في عملية التبييض.

وقد تمت دراسة عدة طرق لزيادة انتشار مواد الطهي الكيميائية في الخشب لتحسين كفاءة عملية استخلاص اللب الكيميائية. تتحكم ظواهر الانتشار والامتصاص، ومسامية وتركيب مصفوفة جدار الخلية، وكذلك الحجم الجزيئي للجزيئات القابلة للاستخراج في تشريب المواد الكيميائية في الخشب وإزالة اللجنين المذاب. ويحد انخفاض مسامية رقائق الخشب من استغلال الإنزيمات عالية الجزيئات لتعزيز تشريب رقائق الخشب بالمواد الكيميائية. وقد وجد، مع ذلك، أن الإنزيمات بما في ذلك الهيميسليوليزات، والبكتينيزات، والسليوليزات لها القدرة على زيادة انتشارية هيدروكسيد الصوديوم في خشب الصنوبر الجنوبي [٤٩]. وتعزى هذه النتيجة إلى إذابة الأغشية بين الأوعية الخشبية، والتي هي المقاوم الرئيس للتدفق في الخشب. ووجد بعد الاستخلاص بالأسيتون والمعالجة الإنزيمية أن اللب يكون أكثر انتظاماً، وله لزوجة وإنتاجية أعلى، وانخفاض الرجيع [٥٠].

(٢, ١, ٣, ١١) استخلاص اللب ميكانيكياً Mechanical Pulping

يستخدم اللب الميكانيكي، الذي يتميز بارتفاع العائد (إلى ٩٥٪)، لإنتاج درجات الورق المحتوية على الخشب مع ارتفاع الكمية والخصائص البصرية الجيدة والقابليه للطباعة. حالياً، يعد التحدي الرئيس لعملية الاستخلاص الميكانيكية هو الحد من استهلاك طاقة التنقية في هذه العملية المكثفة الطاقة. وزاد إبراز مسألة استخدام الطاقة بعد الزيادة الأخيرة في أسعار الطاقة والاهتمامات البيئية. وهي بالتالي قضية أساسية عند تطوير عمليات تقنية جديدة عالية العائد لاستخلاص اللب. وإحدى الطرق للحد من طاقة التنقية هي تعديل المواد الخام عن طريق التقنية الحيوية قبل التنقية. ويوضح الشكل رقم (٢, ١١) خيارات التقنية الحيوية المختلفة لتوفير الطاقة في عملية استخلاص اللب الميكانيكية.



الشكل رقم (٢, ١١). معالجات التقنية الحيوية لتوفير الطاقة في عملية استخلاص اللب الميكانيكية.

حالياً، تشمل تطبيقات التقنية الحيوية الرئيسة المتعلقة باستخلاص اللب الميكانيكي استخلاص اللب الموفر للطاقة من رقائق الخشب بالفطريات [٥١، ٥٢]، والحد من البقع باستخدام الميكروبات [٥٣]، وتنقية ألياف اللب الميكانيكية الخشنة بمساعدة الإنزيمات [٥٤-٥٧]. وتم تطوير عملية إنزيمية تعتمد على معالجة اللب الخشن الميكانيكي أو الرجيع باستخدام سليوليزات أحادية المكون في تسعينيات القرن الماضي [٥٥، ٥٨] ويجرى تنفيذ هذه الطريقة للاستخدام الصناعي. وتم التحقق من الطريقة بنجاح على نطاقٍ صناعي مسفرة عن وفورات في الطاقة بحوالي ١٥٪ في تنقية الرجيع، والتي تتطابق مع ٥-٨٪ من إجمالي استهلاك الطاقة [٥٦]. ولم يوجد دليل على أنه تم تحفيز تعديلات شكلية في ألياف اللب الخشن والميكانيكي الحراري خلال فترة تحضين قصيرة مع خليط من السليوليز أو CBH 1 [٥٣]. ويبدو أن عمل الـ CBH 1 يحفز التماسك بين الليفات داخل جدار الألياف مما ينتج عنه تخفيف وكشف في هيكل الألياف. وتم الحفاظ على جودة اللب والخصائص البصرية كما لم تتم ملاحظة أي آثار سلبية على عملية صنع الورق اللاحقة بعد معالجة الـ CBH 1 . كما تم أيضاً الحصول على تكثيف

للتنقية بالمعالجة الإنزيمية الأولية في التجارب التي استخدمت فيها الألياف الزراعية أو المعاد تدويرها كمادة خام [٥٤، ٥٧].

في الآونة الأخيرة، تم أيضاً الحصول على نتائج واعدة عن طريق معالجة رقائق الخشب بإنزيمات مختارة للحد من طاقة التنقية [٥٩، ٦٠]. وتكون قدرة توفير الطاقة أعلى عند تطبيق المعالجة الإنزيمية لرقائق الخشب قبل خطوة التنقية الأولى بدلاً من معالجة رجيع اللب. وللتعديل الفعال لمكونات الخشب في الرقائق بالإنزيمات، مع ذلك، فإنه لابد من خطوة تشريب، يتم فيها إدخال الإنزيمات إلى الأجزاء الداخلية من الرقائق. وتم الحصول على وفورات في الطاقة ما بين ١٠ و٢٥٪ مقارنة مع عمليات اللب الحراري الميكانيكي التقليدية (TMP) في التجارب التي تم فيها معالجة رقائق الخشب اللين أو الصلب بالبكتينيزات، أو السليوليزات، أو الزيلانيزات [٥٩-٦١]. وتظهر دراسات المجهر الإلكتروني الناقل (TEM) لرقائق الخشب الصلب تغيرات أساسية في فصل الألياف وآليات التنقية مقارنةً مع عمليات اللب الحراري الميكانيكي التقليدية. وهكذا، يمكن تحقيق وفورات طاقة مهمة من خلال معالجة الرقائق بالإنزيمات قبل التنقية.

ويمكن استخدام الليبيزات المحللة للدهون الثلاثية إلى الجلسرين والأحماض الدهنية الحرة للحد من مشكلات البقع الناشئة من المواد الاستخراجية المحبة للدهون، وخاصةً في اللب الميكانيكي. وتم استخدام مستحضر ليبيز تجاري، Resinase (نوفوزايم)، صناعياً لتحسين جودة لب خشب المزارع في اليابان [٦٢]. كما وجد أن الدهون الثلاثية من الأنواع المختلفة من اللب يمكن تحليلها بكفاءة باستخدام الليبيزات، مما يحد من الالتصاق ومشكلات البقع، والسماح بالتوفير في استهلاك المواد المضافة والكيماويات النشطة على السطح، وزيادة قوة الشد في اللب [٦٢-٦٥].

وبالإضافة إلى الإنزيمات المحللة، فقد تم استخدام الإنزيمات المؤكسدة، وخاصةً اللاكيزات، لتعديل تركيب وهيكل المواد الاستخراجية المحبة للدهون والماء [٦٦، ٦٧]. تؤدي معالجة اللاكيز إلى بلمرة اللجنانات إلى الألياف ويمكنها أيضاً أن تعدل المواد الاستخراجية المحبة للدهون بدرجة طفيفة. كما ثبت أيضاً أن نظام وسيط اللاكيز (LMS) يكون فعالاً في إزالة الإستيرولات [٦٨]. تمت معالجة أنواع مختلفة من اللب باللاكيز في وجود ١-هيدروكسي بنزوترايازول (HBT) كوسيط للأكسدة والاختزال. كما تمت إزالة معظم المركبات المحبة للدهون، بما في ذلك السيتوستيرول الحرة والمترافقة، والأحماض الدهنية والراتنجية والدهون الثلاثية، بكفاءة بواسطة هذه المعالجة. ولوحظ في نفس الوقت تحسين مهم في لمعان اللب وانخفاض رقم الكابا في اللب المعامل بالـ LMS [٦٩].

(١١,٣,٢) التبييض Bleaching

يتم استخدام التبييض لتحسين خصائص اللون واللمعان للب الميكانيكي والكيميائي. من المهم الحصول على عائدٍ كبير في اللب الميكانيكي، وبالتالي، يتم إجراء تبييض يحافظ على اللجنين باستخدام فوق أكسيد الهيدروجين و/ أو الداي ثيونيت. وفي اللب الكيميائي، يهدف التبيض إلى الإزالة الكلية للجنين المتبقي الموجود في اللب بعد الطهي، دون خفض الوزن الجزيئي للسليولوز. ويمثل اللجنين في اللب غير المبيض عادةً حوالي ١٪ فقط من الوزن الجاف. وخلال عملية الاستخلاص، مع ذلك، يتم تعديل اللجنين كيميائياً وتكثيفه إلى هياكل رديئة التحلل ومصبوغة بدرجة عالية. وفي عمليات التبييض، يتم تحليل اللجنين بشكلٍ تسلسلي واستخلاصه في عدة مراحل باستخدام الأوكسجين، أو الأوزون، أو فوق الأكاسيد وثاني أكسيد الكلور ومواد تبييض [١].

ويمكن استخدام الإنزيمات لتحسين عملية التبييض مباشرةً أو غير مباشرة. في الطريقة غير المباشرة يتم تحسين قابلية اللب للتبييض من خلال عمل الزيلانيزات أو الإنزيمات الأخرى التي تؤثر في استخلاص اللجنين، ويكون التأثير محدوداً. وأكثر نظم التبييض الإنزيمية المباشرة الواعدة هو نظام وسيط اللاكيز، الذي يعمل مباشرة على اللجنين.

(١١,٣,٢,١) التبييض بمساعدة الزيلانيز Xylanase-Aided Bleaching

إن تبييض اللب الكيميائي بمساعدة الزيلانيز هو التطبيق التقني الحيوي الأكثر استخداماً على النطاق الواسع والأفضل تأسيساً في صناعة اللب والورق. يستخدم الزيلانيز كأداة مساعدة في التبييض وتعزز مرحلة الزيلانيز قبل مراحل التبييض الكيميائية اللاحقة من قابلية استخلاص اللجنين في مراحل التبييض اللاحقة. وقد تم اقتراح عدة بدائل، وربما آليات متزامنة لكي تشارك في التبييض بمساعدة الزيلانيز. وقد اقترح أن قابلية اللجنين المرتبط بالألياف للتبييض بواسطة معالجة الزيلانيز تكون نتيجة لتحليل الزيلان المعاد ترسيبه أو إزالة الزيلان من متراكبات اللجنين-الكربوهيدرات في الألياف [٧٠، ٧١]. وقد ذكر أن إزالة الزيلان بواسطة الزيلانيزات من ألياف كرافت للخشب اللين تكشف لجنين السطح [٧٢]. ويشير عمل الزيلانيزات على كلٍ من الزيلان المعاد ترسيبه والمرتبط بالكربوهيدرات إلى أنه ربما لا يكون فقط نوع ولكن أيضاً موقع الزيلان هو المهم في التبييض بمساعدة الزيلانيز.

بسبب التركيب المحتوي على رابطة ثنائية، فإن حمض الهيكسينورونيك يزيد من استهلاك مواد التبييض الكيميائية والبرمنجنات، مما يزيد بوضوح رقم الكابا للب [٧٣]. والتركيب يكون غير مستقر تماماً، ويتحلل بسهولة في ظل الظروف الحمضية، لذلك تم استغلال هذه الخاصية في طرق الإزالة المستخدمة صناعياً. على الرغم من الجهود البحثية واسعة النطاق، فلم يتم توصيف أي إنزيم قادر على إزالة هذا المركب من عمود الزيلان الفقري

حتى الآن. في الآونة الأخيرة، تم تبني أن نشاطاً جانبياً لليبيز تجاري يمكنه أن يقلل من رقم الكابا ومحتوى حمض الهيكسينورونيك في لب الخشب اللين بطريقة كرافت، ولكن لا يزال يتعين توضيح تفاصيل هذه العملية [٧٤]. وتؤدي الإزالة الجزئية للزيلان المستبدل بحمض الهيكسينورونيك بواسطة معالجة الزيلانيز إلى رقم كابا أقل قليلاً. ويرجع هذا التأثير المتواضع إلى الكمية الصغيرة نسبياً من الزيلان التي يتم إزالتها أثناء المعالجة.

يتوافق التبييض بمساعدة الزيلانيز مع أنواعٍ مختلفة من لب كرافت. وقد وجد أن المانانيزات تكون فعالة في تعزيز القابلية للتبييض، ولكنها تعتمد بالفعل على نوع اللب المستخدم [٧٥]. كما وجد أن كلاً من الزيلانيزات الفطرية والبكتيرية تعمل على زيلان اللب مما يؤدي إلى تعزيز القابلية للتبييض [٧٦]. ومع ذلك، تم اقتراح أن بعض الزيلانيزات من العائلة ١١ يمكن أن تكون أكثر فعالية في تعزيز التبييض من زيلانيزات العائلة ١٠ [٧٧]. وحتي الآن لم يثبت أن لربط الزيلانيزات إلى الألياف بواسطة مجالات ربط السليولوز والزيلان (CBD وXBD) أي دور في تعزيز كفاءة التبييض للزيلانيزات [٧٨].

ويمكن استخدام قابلية التبييض المحسنة عن طريق استخدام الزيلانيزات للحد من استهلاك كيماويات التبييض أو زيادة لمعان اللب النهائي. تعتمد الفوائد الناتجة من الإنزيمات على نوع تسلسل التبييض المستخدم وعلى محتوي اللجنين المتبقي من اللب. وفي تسعينيات القرن الماضي، استخدمت مرحلة الزيلانيز لتقليل الحمل البيئي من كيماويات التبييض المعتمدة على الكلور. ويؤدي تقليل متوسط استهلاك الكلور النشط بنسبة ٢٥٪ في مرحلة قبل التبييض أو تقليل استهلاك الكلور الكلي بحوالي ١٥٪ إلى الحد من المكونات المكلورة بنسبة ١٥-٢٠٪، مقاساً كـ AOX، في متدفقات التبييض.

واليوم، يتم استخدام الزيلانيزات صناعياً في كل التسلسلات الخالية من عنصر الكلور (ECF) والخالية من الكلور تماماً (TCF). في تسلسلات ECF، غالباً ما يتم تنفيذ الخطوة الإنزيمية بسبب القدرة المحدودة على إنتاج ثاني أكسيد الكلور. ويسمح استخدام الإنزيمات بالتبيض لقيم لمعان أعلى في حالة عدم استخدام غاز الكلور. وفي تسلسلات TCF، تكون ميزة الخطوة الإنزيمية هي أنها تسمح بتحسين اللمعان، والمحافظة على متانة الألياف، وتحقيق وفورات في تكاليف التبييض [٧٩].

اعتباراً من عام ٢٠٠٧م، يستخدم نحو ٢٠ مصنعاً في أمريكا الشمالية والدول الاسكندنافية الإنزيمات في تبييض اللب بطريقة كرافت. وتحتاج ظروف عملية التبييض الكيميائي من حيث القلوية العالية، وارتفاع درجة الحرارة مجموعة متطلبات خاصة للمعالجة الإنزيمية. وحالياً، توجد منتجات إنزيمية جديدة متاحة تعمل في كلٍ من درجة القلوية العالية ودرجة الحرارة (درجة القلوية ١٠ ودرجة حرارة ٩٠-١٠٠). وكان السعر التقريبي للمعالجة بالزيلينيز في عام ٢٠٠٧م أقل من ٢ دولار أمريكي لكل طن من اللب.

(٢,٢,٣,١١) نظام وسيط اللاكيز لنزع اللجنين للتبييض المباشر

Delignifying Laccase-Mediator System for Direct Bleaching

كان التبييض المباشر للب الكيميائي بنظم الأكسدة المعتمدة على الإنزيمات محل الأبحاث المكثفة منذ اكتشاف الإنزيمات المؤكسدة للجنين في بدايات ثمانينيات القرن الماضي. اليوم، تعد طريقة نزع اللجنين المباشرة الأكثر تقدماً هي نظام وسيط اللاكيز (LMS). في مفهوم الـ LMS، يستخدم اللاكيز لأكسدة مادة كيميائية وسيطة يمكنها إضافياً أن تؤكسد وتحلل اللجنين المرتبط بالألياف. في الدراسات الأولية، تم استخدام وسط تفاعل اللاكيز الشائع ٢،٢'-أزينو-بيس(٣-إيثيل بنزثيازولين-٦-سلفونات) (ABTS) و١-هيدروكسي بنزو ترايأزول (HBT) كمواد وسيطة [٨٠، ٨١]. في وقتٍ لاحق، تم دراسة الكثير من المواد الوسيطة الأخرى بما في ذلك إن-هيدروكسي أسيتانيليدين (NHA) أو مادة أولية مشتقة من الـ NHA تحرر الـ NHA ببطء، وحمض الفيولوريك والـ TEMPO [٨٢-٨٤]. وعادةً ما تحتوي المواد الوسيطة الأكثر فعالية على مجموعات N-OH وظيفية.

وحتى تكون مجدية اقتصادياً للاستعمال التجاري، ينبغي أن تكون المواد الوسيطة متخصصة، ومقبولة بيئياً، وقابلة للتحلل الحيوي. ولذلك، تم اكتشاف عدد من المواد الوسيطة الجديدة ذات تنوع تركيبي كبير. كما تم البحث عن المواد الوسيطة الموجودة بشكلٍ طبيعي بين الفينولات المشتقة من اللجنين والتي يمكن أن توفر مزايا بيئية أو اقتصادية [٨٥]. وتشمل المركبات التي خضعت للاختبار الأسيتوفانيلون، والفانيلين، والسيرينجالدهيد، والأسيتوسيرينجون، و٢،٤،٦-ثلاثي ميثيل الفينول، وحمض البارا-كوماريك، وحمض السينابيك، وحمض السيناباريتيك، وحمض الفيروليك. من بين هذه، وجد أن السيرينجالدهيد والأسيتوسيرينجون هما الأكثر فعالية في LMS لكلٍ من نزع اللجنين وتحلل المواد الاستخراجية المحبة للدهون [٨٦، ٨٧]. وبالإضافة إلى المواد الوسيطة القائمة على النيتروجين، تم بنجاح اختبار مواد وسيطة غير عضوية، مثل متراكبات المعادن الانتقالية، التي يفضل أن تحتوي على الموليبدينوم، للتبييض عن طريق اللاكيز [٨٨، ٨٩]. وتم دراسة آليات نزع لجنين اللب عن طريق اللاكيز بشكلٍ مكثف [٩٠-٩٣].

ووجد أن درجة نزع اللجنين بعد الاستخلاص القلوي تكون عالية وتصل إلى ٤٠٪ [٩٤]. وقد تبين أن نظام الـ LMS يكون قادراً على استبدال إما خطوة نزع اللجنين بالأكسجين أو مرحلة الأوزون [٩٣، ٩٥]. ويمكن الحصول على المزيد من التحسينات في قابلية التبييض من خلال الجمع بين معالجة الزيلانيز وتبييض الـ LMS بالتتابع [٩٦، ٩٧]. وقد وجد أن الجمع بين معالجة الزيلانيز وتبييض الـ LMS في مرحلة واحدة يكون غير فعالاً، على ما يبدو بسبب تثبيط الزيلانيز من قبل المادة الوسيطة [٩٨]. بالإضافة إلى الـ LMS، تم اقتراح نظم الأكسدة المساعدة بالإنزيمات، مثل نظام الأكسدة بواسطة الهيدروليز (HOS) وغيره من النظم الكيميائية الإنزيمية بطيئة التحرر من أجل تبييض اللب الكيميائي [٩٩، ١٠٠].

(١١,٣,٣) صناعة الورق Paper Making

في صناعة الورق، يتم تكوين الورق من اللب، والمواد الكيميائية المختلفة، والأصباغ في ماكينة الورق. بعد إعداد المخزون، تحتوي ماكينة الورق عادةً على تشكيل النسيج، والضغط، والتجفيف، والتحجيم، وعمليات وحدة الصقل. وهناك حاجة إلى كميات كبيرة من المياه في تشكيل نسيج ورق متجانس من طين اللب في ماكينة الورق. وتكون الكفاءة العالية مطلوبة من جميع عمليات الوحدة بسبب السرعة العالية للإنتاج.

ويمكن استخدام الإنزيمات لتعديل خصائص صناعة الورق في اللب الكيميائي، والميكانيكي، والمعاد تدويره. ويعد استخدام الإنزيمات للحد من الحاجة إلى التنقية وزيادة الصرف (أي إزالة الماء) من اللب الكيميائي من التطبيقات المحتملة لاستغلال قدرة الإنزيمات على تعديل سطح ألياف اللب. وقد تم بالتفصيل دراسة آثار السليوليزات الفردية على خصائص لب كرافت المبيض أو غير المبيض [٩٧، ١٠١]. ووجد أن السلوبيوهيردوليزات من الترايكوديرما ريسي (CBH) ليس لها سوى تأثير متواضع على لزوجة اللب، في حين تقلل الإندوجلوكانيزات الرئيسة (EG)، وخاصة EG II، اللزوجة بصورةٍ هائلة وبالتالي خصائص المتانة بعد التنقية. كما وجد أن معالجة لب كرافت الصنوبر بالإندوجلوكانيزات من الترايكوديرما ريسي EG I وEG II تحسن قابلية التبييض بدرجة كبيرة ولكن في الوقت نفسه تم إضعاف خصائص متانة اللب. ويرجع انخفاض اللزوجة ربما إلى مهاجمة الإندوجلوكانيزات لمناطق السليولوز غير المتبلورة، وخاصةً في مناطق الألياف المعيبة وغير النظامية [١٠١].

كما تم ذكر الأثر الإيجابي للترايكوديرما ريسي CBH I على قابلية الطرق ومن ثم على تطور خصائص ارتباط لب كرافت الصنوبر المبيض بالـ ECF في التنقية [١٠٢]. وتتوافر السليوليزات التجارية أحادية المكون ومخلوطات السليوليز-الهيميسليوليز لتحسين قابلية اللب للطرق، وصرف وتشغيل ماكينة الورق. وتكون تطبيقات الإنزيمات هذه مناسبة لبعض درجات الورق الخاص أو لبعض الاحتياجات الخاصة في بعض الأحيان في مصانع الورق. ويحتاج الاستخدام الناجح للمستحضرات المحتوية على السليوليز إلى عناية خاصة ما يتعلق باختيار الإنزيم، وظروف المعالجة الإنزيمية، والتحكم في العملية.

ويعد التقليل من استخدام المياه وتصريف المتدفقات هو تحدي مستمر في صناعة الورق بسبب المتطلبات البيئية والتشريعية لتقليل استهلاك المياه العذبة. وثمة مشكلة رئيسة في الحد من استخدام المياه وهي تراكم المواد الذائبة والغروية (DCS) في مياه العملية. وتتكون الـ DCS أساساً من الهيميسليوليزات، والبكتينات، وراتنجات الخشب المتناثرة، والليجنانات، واللجنين الذائب. ويؤثر محتوى الـ DCS وتكوين مياه العملية على تشغيل الآلات الورق وجودة الورق، ويحدد أيضاً الكفاءة المطلوبة لتنقية مياه العملية.

ووجد أن المعالجة بالبكتينيز تقلل الطلب الكاتيوني للماء الأبيض الموجب بحوالي ٦٠٪ [١٠٣-١٠٦]. بذلك، يتم الحصول على وفورات في الكيماويات الكاتيونية (الشبة، وعوامل الاحتفاظ، وعوامل المتانة، والنشا) وتحسين تشغيل آلات الورق في المحاولات على مستوى المطحنة مع البكتينيز [١٠٧، ١٠٨]. ويمكن استخدام المانانيزات لتحليل الجلوكومانانات، وتثبيت الراتنج الغروي في مياه عملية اللب الميكانيكي [١٠٩]. ونتيجة للمعالجة الإنزيمية، فقد ثبت أن جزيئات الراتنج يحدث لها عدم استقرار وتعلق على الألياف كجزيئات فردية. ويمكن تعديل التركيب الكيميائي للجالاكتوجلوكومانان الموجود في مياه الـ TMP بواسطة إنزيم أسيتيل جلوكومانان إستيريز، والذي يكون قادراً على شق مجموعات الأسيتيل من الجلوكومانان المتبلمر [٥]. ووجد أن نزع مجموعة الأسيتيل من الجلوكومانان القابل للذوبان يؤدي إلى انخفاض الذوبان والامتزاز اللاحق للجلوكومانان على الألياف [١١٠].

(٤, ٣, ١١) الورق المعاد تدويره وإزالة الأحبار Recycled Paper and Deinking

يزيد استخدام الورق المسترجع بشكلٍ متزايد لطباعة الصحف، والمناديل الورقية، والدرجات العليا من أوراق الرسم. يجب إزالة الأحبار من الورق المسترجع، أي، إعادة الاستخلاص والتنظيف من الأوساخ والحبر قبل أن يتم إعادة استخدامه في صناعة الورق. في إزالة الأحبار، يتم فصل جزيئات الحبر وإزالتها من الألياف عن طريق الجمع بين عمليات ميكانيكية وكيميائية. وقد أظهرت الإنزيمات، وخاصةً الأميليزات والسليوليزات، أنها تكون فعالة في تحسين انفصال الحبر من ألياف الورق المسترجع المطلي وغير المطلي. وقد تم دراسة استخدام مخلوطات السليوليز والهميسيليوليز، وكذلك الأميليزات في إزالة الأحبار على مستويات المختبرات، والمستوى النصف صناعي، والصناعي [١١١-١١٦].

ويمكن الحصول على التأثير الإيجابي للإنزيمات في تحسين انفصال الحبر من خلال نهجين أساسيين: عن طريق تحرير الإنزيمات لجزيئات الحبر من أسطح الألياف باستخدام الإنزيمات المحللة للكربوهيدرات مثل السليوليزات، أو الهيميسليوليزات، أو البكتينيزات، أو عن طريق تحليل ناقل الحبر أو طبقة الطلاء. ويعتقد أنه في إزالة الأحبار بمساعدة الإنزيم فإن التحليل الإنزيمي لناقل الحبر، وطبقة النشا، أو أسطح الألياف يحرر جزيئات الحبر التي تكون كبيرة بما يكفي لإزالتها عن طريق إزالة الأحبار العائمة. واستخدام الإنزيمات في إزالة الأحبار من الورق المسترجع هو واحد من أكثر التطبيقات الإنزيمية فائدة في صناعة اللب والورق وهي تستخدم بالفعل على النطاق الصناعي.

وتتأثر أيضاً نوعية الورق المعاد تدويره بواسطة "اللاصقات" التي تحدث خلال عملية صنع الورق. وهذه يمكن أن تظهر كبقع أو تسبب نتوءات خارجة وتقلل من كفاءة آلة الورق؛ بسبب أعطال التنظيف الإضافي الناجمة. ويمكن أن تحتوي اللاصقات على بقع الخشب، والزيوت، وعوامل التحجيم، والمواد الكيميائية المضادة للرغوة، أو البولي فينيل أسيتات (PVA)، وهي مادة تستخدم على نطاقٍ واسع للملصقات ذاتية اللصق. وقد تم تطوير مستحضر إنزيمي تجاري يحتوي على إستيريز يهاجم الـ PVA ويستخدم حالياً في المستوى الصناعي لمكافحة اللاصقات [١١٧].

(١١,٣,٥) التحكم في الشحم Slime Control

الإنزيمات هي عوامل محتملة للتحكم في الأغشية الحيوية ويمكن أن تعمل ضد مختلف مكونات شحوم آلة الورق، مثل البروتينات، والدهون، والكربوهيدرات، أو مركبات البقع. ومن الممكن تعزيز تأثيرها، من خلال المعالجات التآزرية بمخلوطات من الإنزيمات المحللة للسكريات العديدة مع البروتيزات والليبيزات الفعالة أو مع المواد الكيميائية التي تهلهل تركيب الأغشية الحيوية. والمشكلة الرئيسة في استخدام إنزيمات خاصة تحليلية هي التغير في تكوين الشحوم والسكريات العديدة للشحوم [١١٨].

وقد وجد أن الكثير من الإنزيمات التحليلية تظهر قدرة على تحليل الأغشية الحيوية. ومع ذلك، فإن معظم المنتجات الصناعية الناجحة للتحكم في الشحوم واللاصقات تعتمد على مخلوطات من عدة أنشطة إنزيمية، ويتم تطوير تكوينها بالتجربة حتى على أساس كل حالة على حدة. وتشمل الأنشطة ذات الأهمية العملية البروتيزات، وربما متحدة مع غيرها من الأنشطة [١١٩-١٢١].

(١١,٣,٦) التطبيقات الأخرى Other Applications

إن تكوين تقشر أكسالات الكالسيوم هو مشكلة حالية في صناعة اللب والورق. يتواجد حمض الأكساليك والكالسيوم في الخشب ولكن حمض الأكساليك يتكون أيضاً من بوليمرات الخشب خلال التبييض عن طريق الأكسدة. وتسبب الدرجة العالية من غلق النظام تراكم حمض الأكساليك والكالسيوم، مما يزيد من مخاطر التقشر الداخلي لأكسالات الكالسيوم في الأنابيب، والمرشحات، ومبادلات الحرارة. وتوفر إزالة الأوكسالات بالإنزيمات المحللة للأوكسالات وسيلة لحل المشكلة. وقد تم اختبار الإنزيمات الجديدة المحللة للأوكسالات، مثل أوكسالات أوكسيديز وأوكسالات ديكربوكسيليز، لهذا التطبيق. وتنتج المشكلات الرئيسة، مع ذلك، من المثبطات الموجودة في الراشحات، بما في ذلك الحديد، والكالسيوم، والعوامل الحاجبة، والمواد الإستخراجية [١٢٢].

(٤ , ١١) الإنزيمات لتصميم المنتجات Enzymes for Product Design

(١ , ٤ , ١١) الهندسة الإنزيمية للألياف Enzymatic Fiber Engineering

إن تخصصية الإنزيمات تجعلها مناسبة خاصةً بالنسبة لهندسة كلٍ من اللب الكيميائي والميكانيكي. ويمكن استخدام التعديل الموجه لأسطح الألياف بواسطة المعالجات الإنزيمية أو الكيميائية والإنزيمية المزدوجة لتحسين خصائص الألياف أو لإنشاء خصائص جديدة تماماً لمختلف التطبيقات. وليس من المستغرب أن هذا يعدُّ واحد من أكثر المناطق نمواً في الصناعة القائمة على الألياف. كما يعكس تعديل الألياف اتجاه استخدام وسائل التقنية الحيوية لتصميم المنتجات وليس لتحسين العملية.

(٢ , ٤ , ١١) الألياف الوظيفية المضافة القيمة Functionalized, Value-Added Fibers

تم فتح آفاق جديدة في استخدام الخشب أو الألياف غير الخشبية عن طريق إدخال خصائص القيمة المضافة إلى الألياف. والخيار المثير للاهتمام هو التعديل الموجه لأسطح الألياف عبر التكوين الإنزيمي للشقوق بواسطة الإنزيمات المؤكسدة. من حيث المبدأ، فإن بوليمرات السليولوز، والهيميسليولوزات، واللجنين تكون هي الهدف الرئيس في مواد الألياف والتي يمكن من خلالها ربط مكون وظيفي إلى مادة الألياف. حالياً، تعتمد واحدة من أكثر طرق المعالجة الكيميائية الإنزيمية الواعدة على استخدام اللجنين كمصفوفة رابطة للارتباط المصمم للمجموعات الوظيفية الجديدة إلى اللب [١٢٣-١٢٦]. تنشط الإنزيمات المؤكسدة، مثل اللاكيزات أو البيروكسيديزات، لجنين السطح في الألياف التي تحتوي على اللجنين. والتفاعل الرئيس للاكيزات والفينول أوكسيديزات الأخرى هو تكوين شقوق فينولية أو كاتيونية [١٢٧، ١٢٨]. وبسبب نشاط التفاعل العالي لهذه الشقوق إما مع بعضها بعضاً أو مع وسط تفاعل ثانوي، فإنه يمكن أن تحدث تفاعلات مثل البلمرة، وتفكيك البلمرة، والبلمرة التعاونية، والتطعيم. وتكوين الشقوق هذه (أي تنشيط سطح الألياف) هو الخطوة الأولى في توظيف الألياف عندما يكون الهدف هو إدخال خصائص القيمة المضافة إلى الألياف.

بعد التكوين الإنزيمي للشقوق، يمكن تطعيم مكونات كيميائية خاصة لتكييف خصائص الألياف. وقد تم سابقاً استغلال التنشيط القائم على الشقوق للجنين المعزول واللجنين السطحي في الألياف في تصنيع ألواح الألياف [١٢٩-١٣٢]. ومع ذلك فإن التوظيف الإنزيمي لأسطح الألياف، يقدم الكثير من الاحتمالات. وعن طريق اختيار المركب الذي سوف يتم ربطه، يمكن إدخال مجموعة متنوعة من الخصائص الوظيفية، على سبيل المثال، تعديل الشحنة، وطبيعة التفاعل مع الماء، والنشاط المضاد للميكروبات، أو التوصيل، مما يتيح خيارات لتحسين خصائص صناعة الورق القائمة أو إنشاء خصائص جديدة تماماً للألياف [١٢٣-١٢٦]. وميزة الطريقة

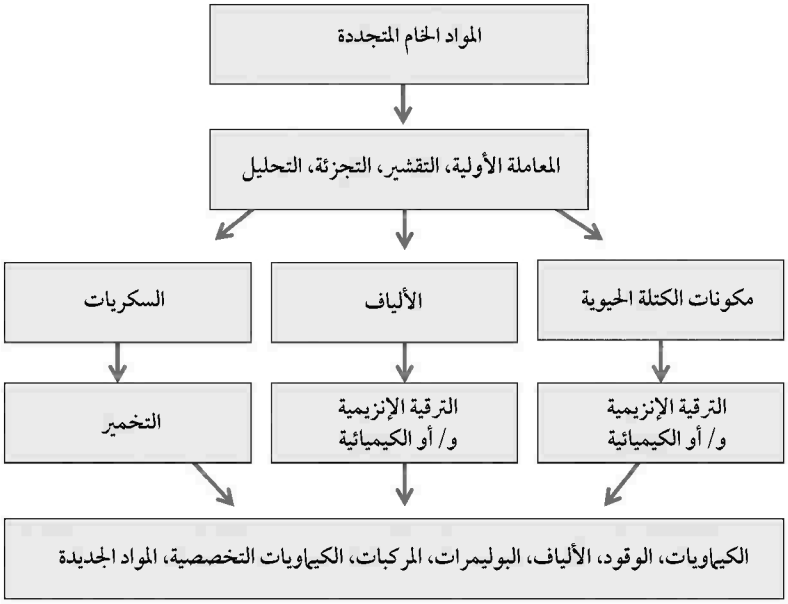
القائمة على الإنزيمات، بالمقارنة مع الطرق الكيميائية البحتة، هي تخصصية السطح والحفاظ على الخصائص الكيميائية والفيزيائية المهمة للألياف، مثل المتانة. ويمكن تعديل مختلف الألياف المحتوية على اللجنين (كرافت غير المبيض، والـ CTMP والـ TMP المبيضة، وغير المبيضة) بهذه الطريقة الجديدة.

وثمة نهج آخر مثير للاهتمام في تعديل الألياف وهو ربط مجموعات وظيفية على أسطح السليولوز باستخدام الزيلوجلوكانات المعدلة كيميائياً أو إنزيمياً كناقلات [١٣٣، ١٣٤]. في هذا النهج يتم بداية تعديل سكريات الزيلوجلوكان الأحادية (XGO) وبعد ذلك ضمها إلى الزيلوجلوكان البوليمري (XG) باستخدام إنزيم زيلوجلوكان إندو-ترانس جليكوزيليز (XET). وحيث إن الزيلوجلوكانات لها انجذاب عالي بشكلٍ طبيعي تجاه السليولوز، يتحقق تعديل السطح الخاص للألياف عن طريق امتصاص الزيلوجلوكانات المعدلة على أسطح الألياف. وتحفز الـ XET شق وإعادة التحام سلاسل الزيلوجلوكان. في الخطوة الأولى يحفز الإنزيم شق الرابطة الجليكوسيدية مع التكوين اللاحق لمركب وسيط من جليكوزيل-إنزيم التساهمي. عند تحليل المركب الوسيط جليكوزيل-إنزيم يتم نقل شاردة الجيكوزيل إلى متقبل للكربوهيدرات [١٣٤، ١٣٥].

ويكون انجذاب الزيلوجلوكان إلى السليولوز عالياً ولا يعتمد إلى حدٍ كبير على درجة الأس الهيدروجيني، ودرجة حرارة الارتباط، والوزن الجزيئي، والتكوين الدقيق لسكر الزيلوجلوكان. وقد استخدم التصاق الزيلوجلوكان بنجاح لزيادة متانة الصفائح الورقية. ويمكن انجذاب الزيلوجلوكان العالي أيضاً من ارتباط الشوراد الكيميائية على أسطح السليولوز في مختلف الظروف دون انقطاع الألياف الفردية أو مصفوفة الألياف. وتتيح الطريقة إدماج مجموعة واسعة من المجموعات الكيميائية على أسطح الألياف عن طريق الزيلوجلوكانات. كما تم تصور استخدام هذه الطريقة لتطوير الورق ومواد صناعة الورق الجديدة وعالية الأداء [١٣٣].

(١١,٥) مفاهيم المصفاة الحيوية Biorefinery Concepts

إن المصفاة الحيوية المتكاملة هي مفهوم شامل حيث يتم تحويل المواد الأولية من الكتلة الحيوية إلى مجموعة من المنتجات القيمة. تجمع المصافي الحيوية وتدمج مختلف التقنيات، بما في ذلك أيضاً خطوات عملية التقنية الحيوية، من أجل الاستفادة من جميع المكونات في الكتلة الحيوية. والهدف الرئيس للمصفاة الحيوية المتقدمة هو زيادة توافر واستخدام الطاقة الحيوية والمنتجات القائمة على الحيوية عن طريق تنفيذ تقنيات إنتاج مبتكرة، وسليمة بيئياً، وفعالة التكلفة لإنتاج مجموعة متنوعة من المنتجات. وتوفر المواد الخام اللجنوسليولوزية (الخشب والنباتات السنوية) مصدراً واسعاً ليس فقط لمنتجات الألياف الحالية، ولكن أيضاً لعدد كبير من المواد الوسيطة، والكيماويات التخصصية، والوقود (الشكل رقم ١١,٣).



الشكل رقم (٣, ١١). تطوير الكتلة الحيوية.

تكتسب عملية التحويل الحيوي والتنقية الحيوية زخماً كعمليات تجارية، ويمكن أن يأخذا مكانهما قريباً جنباً إلى جنبٍ مع عمليات استخلاص اللب التقليدية في تحويل المواد الأولية اللجنوسليولوزية إلى منتجات ذات قيمة أعلى. ويثير إنتاج وقود الإيثانول من المواد الخام السليولوزية الاهتمام المتزايد لأسبابٍ بيئية، وسياسية، واقتصادية. وقد أدى العرض المحدود للوقود الحفري إلى الجهود البحثية المهمة والإنجازات الأخيرة في تعزيز مصادر الطاقة المتجددة. ويسمح التحول إلى مصادر الطاقة المتجددة للأنشطة البشرية بأن تصبح محايدة بالنسبة الكربون عن طريق إعادة تدوير الكربون من النباتات ويقلل من انبعاثات ثاني أكسيد الكربون، مما يحد من ظاهرة الاحتباس الحراري. ويعدُّ استخدام الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية لإنتاج الإيثانول، على سبيل المثال، هو تطوير ضروري من الاستخدام الحالي للمحاصيل الزراعية (أي الوسائط القائمة على النشا). وتنتج مواد الكتلة الحيوية الخام في المقام الأول من الزراعة، والغابات أو منتجات النفايات القائمة على الخشب أو من محطات الطاقة المخصصة. وبعد تحليل الكتلة الحيوية الخام إلى الكربوهيدرات (عادة سكريات الجلوكوز والبنتوز)، يمكن تخميرها إلى إيثانول أو ناقلات الطاقة الأخرى.

ويمكن استخدام المنتجات الكيميائية المشتقة من البوليمرات والمكونات اللجنوسليلوزية في عددٍ كبير من التطبيقات. والهدف هو تطوير أساليب وتطبيقات لكلٍ من المنتجات كبيرة الحجم ومنتجات الاستخدام الخاص التي تنتج من بوليمرات الخشب الرئيسة، والسليولوز، والهيميسليولوز، ومواد الخشب الاستخراجية، واللجنين.

ويمكن استغلال أو تعديل خصائص الهيميسليولوز واستخدامها في الأغشية، والطلاء، والمغذيات، ومنتجات الألياف، أو منتجات القيمة المضافة الأخرى. ويمكن تطوير مواد كيميائية قائمة على السليولوز جديدة ومحسنة ذات صفات متخصصة باستخدام الطرق بمساعدة الإنزيمات. كما يمكن استخدام مواد الخشب الاستخراجية كإضافات في مختلف التطبيقات في اللب والورق، والطعام، والمستحضرات الدوائية، وصناعات مستحضرات التجميل. وتشمل أكثر التطبيقات الواعدة لمشتقات اللجنين المواد اللاصقة، والمواد المضادة للاكسدة، وعوامل الانتشار، والمواد الكيميائية الوسيطة. كما سيتم أيضاً ترسيخ تعديلات القيمة المضافة للمركبات الموجودة في اللحاء والمواد الأخرى المتبقية. وسوف يؤدي هذا النهج إلى عمليات جديدة ومتطورة وتقنيات لتحويل الخشب إلى منتجات ذات قيمة مضافة عالية، محايدة لثاني أكسيد الكربون، "خضراء"، وقابلة للتحلل الحيوي.

(٦, ١١) الاستنتاجات Conclusions

حالياً، يتم استخدام الإنزيمات كعوامل مساعدة في صناعة اللب والورق، مما يؤدي إلى تحقيق وفورات في استهلاك الطاقة والمواد الكيميائية. وتشمل التطبيقات الثابتة التبييض بمساعدة الإنزيمات، وإزالة الأحبار، والتنقية، والتحكم في البقع. وبشكلٍ عام، فإن تنفيذ مراحل عملية التقنية الحيوية حتى المستوى الصناعي كان بطيئاً. ومن أجل أن تكون مقبولة على النطاق الصناعي، يجب أن تتفوق التطبيقات الإنزيمية على الطرق الكيميائية التقليدية وأن تؤدي إلى مزايا اقتصادية دون تغيير جودة المنتج. ويبدو أن التطبيقات الجديدة للإنزيمات في صناعة اللب والورق سوف توجد في مجال التعديل الموجه للألياف للمنتجات المتخصصة. وتقدم المواد الخام اللجنوسليولوزية (الخشب والنباتات السنوية)، مع ذلك، مصدراً متزايد الأهمية ليس فقط لمنتجات الألياف الحالية، ولكن أيضاً بالنسبة لعدد كبير من السلع الوسيطة، والمواد الكيميائية المتخصصة، والوقود. وهكذا، فإن تطوير محفزات حيوية فعالة لهذه التطبيقات يمثل تحدياً لصناعة التقنية الحيوية. وتنطبق المعرفة المتولدة في الإنزيمات اللجنوسليولوزية المنطبقة في الوقت الحاضر على صناعات النسيج، والمنظفات والأعلاف وكذلك صناعات اللب والورق، أيضاً على هذه الأهداف الجديدة.

المراجع References

[١] O'Sullivan, A.C. (1997) Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose,* **4** (3), 173-207.

[٢] Hult, E.-L., Iversen, T., and Sugiyama, J. (2003) Characterization of the supermolecular structure of cellulose in wood pulp fibres. *Cellulose,* **10** (2), 103-110.

[٣] Ståhlberg, J. (1991) Functional organization of cellulases from *Trichoderma reesei.* PhD Thesis, Uppsala, Sweden.

[٤] Van Tilbeurgh, H., Clayssens, M., Bhikhabhai, R., and Pettersson, G. (1986) Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei.* Separation of functional domains. *FEBS Lett.,* **264,** 223-227.

[٥] Tomme, P., van Tilbeurgh, H., Pettersson, G., van Damme, J., Vandekerckhove, J., Knowles, J., Teeri, T., and Claeyssens, M. (1988) Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM9414: analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. *Eur. J. Biochem.*, **170,** 575-581.

[٦] Linder, M. and Teeri, T. (1997) The roles and function of cellulose-binding domains, *J. Biotechnol.* **57,** 15-28.

[٧] Linder, M. and Teeri, T. (1997) The roles and function of cellulose-binding domains. *J. Biotechnol.*, **57,** 15-28.

[٨] Teleman, A., Harjunpää, V., Tenkanen, M., Buchert, J., Hausalo, T., Drakenberg, T., and Vuorinen, T. (1995) Characterisation of 4-deoxy-β-L-*threo*-hex-4-enopyranosyluronic acid attached to xylan in pine kraft pulp and pulping liquor by 1 H and 13 C NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, **272,** 55-71.

[٩] Irwin, D., Jung, E., and Wilson, D. (1994) Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 763-770.

[١٠] Gilbert, H. and Hazlewood, G. (1993) Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.*, **39,** 187-194.

[١١] Sakka, K., Kojima, Y., Kondo, T., Karita, S., Ohmiya, K., and Shimada, K. (1993) Nucleotide sequence of the *Clostridium stercorarium xynA* gene encoding xylanase A: identification of catalytic and cellulose binding domains. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,**57,** 273-277.

[١٢] Rixon, J., Clarke, J., Hazlewood, G., Hoylamd, R., McCarthy, A., and Gilbert, H. (1996) Do the non-catalytic polysaccharide-binding domains and linker regions enhance the biobleaching properties of modular xylanases? *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46,** 514-520.

[١٣] Stålbrand, H., Saloheimo, A., Vehmaanperä, J., Henrissat, B., and Penttilä, M. (1995) Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae*-Saccharomyces cerevisiae of a *Trichoderma reesei* β-mannanase genec ontaining a cellulose binding domain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61,** 1090-1097.

[١٤] Tenkanen, M., Buchert, J., and Viikari, L. (1995) Binding of hemicellulases on isolated polysaccharide substrates. *Enzyme Microb. Technol.*,**17,** 499-505.

[١٥] Sabini, E., Schubert, H., Murshudov, G., Wilson, K., Siika-aho, M., and Penttilä, M. (2000) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a *Trichoderma reesei* β-mannanase from glycoside hydrolase family 5. *Acta Cryst.*, **D56,** 3-13.

[١٦] McCleary, B. (1991) Comparison of endolytic hydrolases which depolymerise 1,4-beta-D-mannan, 1,5-alpha-L-arabinan and 1,4-beta-D-galactan, in *Enzymes in Biomass Conversion,*vol. **460,** Chapter 34 (eds M. Himmel and G. Leatham), ACS Symposium Series, Oxford University Press, New York, pp. 437-449.

[١٧] Coughlan, M. and Hazlewood, G. (1993) β-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.*,**17,** 259-289.

[١٨] Spanikova, S., and Biely, P. (2006) Glucuronoyl esterase-Novel carbohydrate esterase produced by *Schizophyllum commune.FEBS Lett.*, **580,** 4597-4601.

[١٩] Grishutin, S., Gusakov, A., Markov, A.V., Ustinov, B., Semenova, M., and Sinitsyn, A.P. (2004) Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Sub.*, **1674,** 268-281.

[٢٠] Hasper, A.A., Dekkers, E., van Mil, M., van de Vondervoort, P., and de Graaff, L. (2002) EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68,** 1556-1560.

[٢١] Kaku, T., Tabuchi, A., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., and Hoson, T. (2002) Action of xyloglucan hydrolase within the native cell wall architecture and its effect on cell wall extensibility in azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol.*, **43,** 21-26.

[٢٢] Rose, J.K., Braam, J., Fry, S.C., and Nishitani, K. (2002) The Xth family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.*, **43,** 1421-1435.

[٢٣] Brumer, H., Zhou, Q., Baumann, M.J., Carlsson, K., and Teeri, T. (2004) Activation of crystalline cellulose surfaces through the chemoenzymatic modification of xyloglucan. *J. Am. Chem. Soc.*, **126,** 5715-5721.

[٢٤] Hatakka, A. (1994) Lignin modifying enzymes from selected white rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.*,**13,** 125-135.

[٢٥] Arbeloa, M., de Leseleuc, J., Goma, G., and Pommier, J.-C. (1992) An evaluation of the potential of lignin peroxidases to improve pulps. *Tappi J.*, **75,** 215-221.

[٢٦] Paice, M., Reid, I., Bourbonnais, R., Archibald, F., and Jurasek, L. (1993) Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.,* 260-265.

[٢٧] Kondo, R., Harazono, K., and Sakai, K. (1994) Bleaching of hardwood kraft pulp with manganese peroxidase secreted from Phanerochaete sordid YK-624. *Appl. Environ. Microb.,* **60,** 4359-4363.

[٢٨] Hammel, K.E., Jensen, Jr. K.A., Mozuch, M.D., Landucci, L.L., Tien, H., and Pease, E.A. (1993) Lignolysis by a purified lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.,* **268,** 12274-12281.

[٢٩] Piontek, K., Glumoff, T., and Winterhalter, K. (1993) Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidise from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å resolution. *FEBS Lett.,* **315,** 119-124.

[٣٠] Poulos, T.L., Edwards, S.L., Wariishi, H., and Gold, M.H. (1993) Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *J. Biol. Chem.,* **268,** 4429-4440.

[٣١] Hofrichter, M. (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb Technol.,* **30,** 454-466.

[٣٢] Kapich, A., Hofrichter, M., Vares, T., and Hatakka, A. (1999) Coupling of manganese peroxidise-mediated lipid peroxidation with destruction with nonphenolic lignin model compounds and 14C-labeled lignins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***259,** 212-219.

[٣٣] Hatakka, A. (2001) Biodegradation of lignin, in *Biopolymers. Vol 1: Lignin, Humic Substances and Coal* (eds M. Hofrichter and A. Steinbuchel), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 129-180.

[٣٤] Martiné z, D., Larrando, L., Putnam, N., Sollewijn-Gelpke, M., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K., Ramaiya, P., Detter, J.C., Larimer, F., Coutinho, P., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D., and Rokshar, D. (2004) Genome sequence of the lignocelluloses degrading, fungus *chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotechnol.,* **22** (6), 695-700.

[٣٥] Martinez, A. (2002) Molecular biology and structure-function of lignin degrading heme peroxidises. *Enzyme Microb. Technol.* **30,** 425-444.

[٣٦] Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1999) Description of a versatile peroxidase involved in natural degradation of lignin that has both Mn-peroxidase and lignin-peroxidase substrate binding sites. *J. Biol. Chem.,* **274,** 10324-10330.

[٣٧] Perez-Boada, M., Ruiz-Duenas, F.J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martinez, M.J., Piontek, K., and Martinez, A. (2006) Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *J. Mol. Biol.,* **354,** 385-402.

[٣٨] Thurston, C. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology,* **140,** 19-26.

[٣٩] Bao, W., O'Malley, D.M., Whetten, R., Sederoff, R.R., and Stahmann (1993) A laccase associated with lignification in Loblolly pine xylem. *Science,* **260,** 672-674.

[٤٠] Leatham, G.F. and Stahmann, M.A. (1981) Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *J. Gen. Microbiol.,* **125,** 147-157.

[٤١] Youn, H.-D., Hah, Y.C., and Kang, S.O. (1995) Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiol. Lett.,* **132,** 183-188.

[٤٢] Bertrand, T., Jolivalt, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C., and Mougin, C. (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry,* **41,** 7325-7333.

[٤٣] Piontek, K., Antorini, M., and Choinowski, T. (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.,* **277,** 37663-37669.

[٤٤] Hakulinen, N., Kiiskinen, L.-L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., and Rouvinen, J. (2002) Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nat. Struct. Biol.,* **9,** 601-605.

[٤٥] Bourbonnais, R. and Paice, M. (1990) Oxidation of non-phenolic substrates-An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.,* **267,** 99-102.

[٤٦] Bourbonnais, R. and Paice, M. (1992) Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2′-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) applied. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **36,** 823-827.

[٤٧] Stenius, P. (2000) *Forest Products Chemistry* (ed. P. Stenius), Finnish Paper Engineers'Association, Helsinki, p. 350.

[٤٨] Suurnäkki, A., Heijnesson, A., Buchert, J., Tenkanen, M., Viikari, L., and Westermark, U. (1996) Location of xylanase and mannanase action in kraft fibres. *J. Pulp Pap. Sci.,* **22** (3), J78-J83.

[٤٩] Richardson, J., Wong, K., and Clark, T. (1998) Modification of mechanical pulp using carbohydrate-degrading enzymes. *J. Pulp Pap. Sci.,* **24,** 125.

[٥٠] Jacobs, C., Venditti, R., and Joyce, T. (1998) Effects of enzymatic pre-treatment on the diffusion of sodium hydroxide in wood. *Tappi J.,* **81,** 260-266.

[٥١] Akhtar, M., Blanchette, R., Myers, G., and Kirk, T. (1998) *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry* (eds R.A. Young and M. Akhtar), John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 309-340.

[٥٢] Hakala, T.K., Maijala, P., Konn, J., and Hatakka, A. (2004) Evaluation of novel wood rotting polypores and corticioid fungi for the decay and biopulping of Norway spruce (*Picea abies)* wood. *Enzyme Microb. Technol.* **34,** 255-263.

[٥٣] Farrell, R., Hata, K., and Wall, M. (1997) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology,* vol. **57** (ed. T. Scheper), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 197-212.

[٥٤] Bajpai, P., Mishra, S., Mishra, O.M., Kumar, S., and Bajpaj, P.K. (2006) Use of enzymes for reduction in refining energy-laboratory studies. *Tappi J.,* **5** (11), 25-32.

[٥٥] Pere, J., Siika-aho, M., and Viikari, L. (2000) Biomechanical pulping with enzymes: response of coarse mechanical pulp to enzymatic modification and secondary refining. *Tappi J.,* **83,** 1-8.

[٥٦] Pere, J., Ellmén, J., Honkasalo, J., Taipalus, P., and Tienvieri, T. (2002) Enhancement of TMP reject refining by enzymatic modification of pulp carbohydrates-a mill study, in *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* (eds L. Viikari and R. Lantto), Elsevier Science B.V, Amsterdam, pp. 281-290.

[٥٧] Zhao, J., Li, X., Qi, Y., and Gao, P. (2004) Alkaline peroxide mechanical pulping of wheat straw with enzyme treatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.,***112,** 13-23.

[٥٨] Pere, J., Liukkonen, S., Siika-aho, M., Gullichsen, J., and Viikari, L. (1996) Use of purified enzymes in mechanical pulping, in *Proceedings of the Tappi Pulping Conference, Nashville, TN, October 27-31,* TAPPI Press, Atlanta, GA, pp. 693-696.

[٥٩] Pere, J., Ellm é n, J., Gullichsen, J., and Viikari, L. (2004) Impregnation of chips with enzymes for enchanced mechanical pulping, paper presented at the 9th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Durban, South Africa, 10-14 October, pp. 27-28.

[٦٠] Peng, F. and Ferritsius, R. (2003) Mechanical pulping with pectinase pretreatment of wood chips, paper presented at the International Mechanical Pulping Conference, pp. 335-340.

[٦١] Hoddenbagh, J.M., Meyer, V., Petit-Conil, M., and Tolan, J. (2007) Reducing chip refining energies by enzymatic treatment of hardwood chips prior to refining, paper presented at the 10th International Congress of Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Abstracts, Madison, Wisconsin, June 10-15, p. 53.

[٦٢] Fischer, K. and Messner, K. (1992) Reducing troublesome pitch in pulp mills by lipolytic enzymes. *Tappi J.,* **75,** 130-134.

[٦٣] Mustranta, A., Fagernäs, L., and Viikari, L. (1995) Effects of lipases on birch extractives. *Tappi J.,* **78,** 140-146.

[٦٤] Mustranta, A., Spetz, P., Holmbom, B., and Buchert, J. (2001) Treatment of mechanical pulp and process waters with lipase. *J. Nordic Pulp Pap. Res.,* **2,** 125-129.

[٦٥] Blanco, A., Negro, C., Borch, K., Minning, S., Hannuksela, T., and Holmbom, B. (2005) Pitch control in thermomechanical pulping and papermaking by enzymatic treatments. *Appita J.,* **58,** 358-361.

[٦٦] Zhang, X. (2000) The effect of white-water dissolved and colloidal fractions on paper properties and effect of various enzyme treatments on the removal of organic components. *Pulp Pap. Can.,* **101,** 59-62.

[٦٧] Karlsson, S., Holmbom, S., Spetz, P., Mustranta, A., and Buchert, J. (2001) Reactivity of *Trametes* laccases with fatty and resin acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,***55,** 317-320.

[٦٨] Gutierrez, A., Del Rio, J., Ibarra, D., Rencoret, J., Romero, J., Speranza, M., Camarero, S., Martinez, M.J., and Martinez, A.T. (2006) Enzymatic removal of free and conjugated sterols forming pitch deposits in environmentally sound bleaching of eucalypt paper pulp. *Environ. Sci. Technol.,* **40,** 3416-3422.

[٦٩] Gutierrez, A., Del Rio, J., Rencoret, J., Ibarra, D., and Martinez, A.T. (2006) Main lipophilic extractives in different pulp types can be removed using the laccase-mediator system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72,** 845-851.

[٧٠] Kantelinen, A., Hortling, B., Sundqvist, J., Linko, M., and Viikari, L. (1993) Proposed mechanism of the enzymatic bleaching of kraft pulp with xylanases. *Holzforschung,* **47,** 318-324.

[٧١] Yang, J. and Eriksson, K.-E. (1992) Use of hemicellulolytic enzymes as one stage in bleaching of kraft pulps. *Holzforschung,* **46,** 481-488.

[٧٢] Buchert, J., Carlsson, G., Viikari, L., and Ström, G. (1996) Surface characterization of unbleached kraft pulps by enzymatic peeling and ESCA. *Holzforschung,* **50,** 69-74.

[٧٣] Vuorinen, T., Teleman, A., Fagerström, P., Buchert, J., and Tenkanen, M. (1996) Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps, paper presented at the International Pulp Bleaching Conference, Washington D.C., pp. 43-51.

[٧٤] Zhang, X., Nguyen, D., Jiang, Z.H., Audet, A., Paice, M., Renaud, S., and Tsang, A. (2007) Bleaching of kraft pulp by a commercial lipase: accessory enzymes degrade hexenuronic acids, paper presented at the 10th International Congress for Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Abstracts, Madison, Wisconsin, June 10-15, p. 28.

[٧٥] Suurn ä kki, A., Clark, T., Allison, R., Viikari, L., and Buchert, J. (1996) Xylanase-and mannanase-aided ECF and TCF bleaching. *Tappi J.,* **79,** 111-117.

[٧٦] Patel, R., Grabski, A., and Jeffries, T. (1993) Chromophore release from kraft pulp by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **39,** 405-412.

[٧٧] Clarke, J., Rixon, J., Ciruela, A., and Gilbert, H. (1997) Family-10 and family-11 xylanases differ in their capacity to enhance the bleachability of hardwood and softwood paper pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **48,** 177-183.

[٧٨] Rixon, J., Clarke, J., Hazlewood, G., Hoylamd, R., McCarthy, A., and Gilbert, H. (1996) Do the non-catalytic polysaccharide-binding domains and linker regions enhance the biobleaching properties of modular xylanases? *Appl. Microbiol. Biotechnol.,*514-520.

[٧٩] Suurnäkki, A., Buchert, J., Niku-Paavola, M.I., Pere, L., and Viikari, L. (2006) Enzymes in pulp and paper processing. *In: Enzymes in Industry.* Aehle W. (Ed.). 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 232-244, 437-439.

[٨٠] Bourbonnais, R. and Paice, M. (1992) Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2.2′-azinobis-(3-ethylbentzthiazoline-6-sulphonate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **36,** 823.

[٨١] Call, H.P. (1995) Further improvements to the laccase-mediator system for enzymatic delignification and results from large-scale trials, Proceedings from the International Non-Chlorine Bleaching Conference, March 5-9, Florida, USA, Paper 4-3, 16.

[٨٢] Amann, M., Candussio, A., M ü ller, R., and Frey, V. (2000) *In situ* generation of mediator-a new concept for laccase-catalysed delignification of kraft pulp, paper presented at the *TAPPI Pulping Conference, Boston, USA, November 5-9.*

[٨٣] Amann, M. (1997) The lignozyme process coming closer to the mill. Proceedings from the International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, June 9-12, Montreal, F4, pp. 1-5.

[٨٤] Freudenreich, I., Amann, M., Fritz-Langhals, E., and Stohrer, J. (1998) Understanding the Lignozym®-process. Proceedings from the International Pulp Bleaching Conference, Helsinki, June 1-5, pp. 71-76.

[٨٥] Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., and Eriksson, K.-E.L. (1996) A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.,* **391,** 144-148.

[٨٦] Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, A.T., Romero, J., Gutierrez, A., and del Rio, J.C. (2006) Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme Microb. Technol.,***40,** 1264-1271.

[٨٧] Gutierrez, A., Rencoret, J., Ibarra, D., Molina, S., Camarero, S., Romero, J., del Rio, J.C., and Martinez, A.T. (2007) Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin derived phenols as natural mediators. *Environ. Sci. Technol.,* **41** (11), 4124-4129.

[٨٨] Bourbonnais, R., Rochefort, D., Paice, M.G., Renaud, S., and Leech, D. (2000) Transition metal complexes: a new class of laccase mediators for pulp bleaching. *Tappi J.,* **83,** 68-79.

[٨٩] Gamelas, J., Pontes, A., Evtuguin, D., Xavier, R., and Esculcas, A. (2007) New polyoxometalate-laccase integrated system for kraft pulp delignification. *Biochem. Eng. J.,* **33** (2), 141-147.

[٩٠] Balakshin, M., Capanema, E., Chen, C.-L., Gratzl, J., Kirkman, A., and Gracz, H. (1999) Biobleaching of pulp with dioxygen in the laccase-mediator system-reaction mechanisms for degradation of residual lignin. 10th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry, Yokohama, Japan, vol. 1, pp. 572-577.

[٩١] Sealey, J. and Ragauskar, A. (1997) Fundamental investigations into the chemical mechanisms involved in laccase-mediator biobleaching. 9th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry, Montreal, Canada, pp. F11-F14

[٩٢] Poppius-Levlin, K., Wang, W., Tamminen, T., Hortling, B., Viikari, L., and Niku-Paavola, M.-L. (1999) Effects of laccase/HBT treatment on pulp and lignin structures. *J. Pulp Pap. Sci.,* **25,** 90-94.

[٩٣] Chakar, F., and Ragauskas, A. (1999) The kismet of residual during LMS delignification of high-kappa kraft pulps. 10th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry, Yokohama, Japan, vol. 1, pp. 566-570.

[٩٤] Poppius-Levlin, K., Wang, W., Ranua, M., Niku-Paavola, M.-L., and Viikari, L. (1997) Biobleaching of chemical pulps by laccase/mediator systems. Proceedings of the TAPPI/Biological Science Symposium, pp. 327-333.

[٩٥] Pfaller, R., Amann, M., and Freudenreich, J. (1998) Analysis of laccase and mediator interactions in the laccase mediator system. Proceedings of the 7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Vancouver, Canada, pp. A99-A102.

[٩٦] Viikari, L., Oksanen, T., Buchert, J., Amann, M., and Candussio, A. (1999) Combined action of hemicellulases and oxidases in bleaching. Proceedings of the 10th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Yokohama, 7-10 June, vol. 1, pp. 504-507.

[٩٧] Oksanen, T., Suurn ä kki, A., Sch ö nberg, C., and Buchert, J. (1999) Effect of carbohydrates on the properties of reinforcement fi bers. Proceedings of the 10th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Yokohama, 7-10 June, vol. 1, pp. 440-445.

[٩٨] Freudenreich, I., Amann, M., Fritz-Langhals, E., and Stohrer, J. (1998) International Pulp Bleaching Conference, Helsinki, Finland, pp. 71-76.

[٩٩] Call, H.-P. (2003) Use of new enzymatic delignification and bleaching concepts for the treatment of high kappa pulps and for " cold cooking ", in *TAPPI Fall Technical Conference: Engineering, Pulping & PCE & I, Chicago, IL, United States, October 26-30,* TAPPI Press, Atlanta, GA, pp. 277-288.

[١٠٠] Call, H.-P. and Call, S. (2005) New generation of enzymatic delignification and bleaching Patent Assignee/ Corporate Source. *Pulp Pap. Can.,* **106** (1), 45-48.

[١٠١] Oksanen, T., Pere, J., Buchert, J., and Viikari, L. (1997) The effect of *Trichoderma reesei* cellulases and hemicellulases on the paper technical properties of never-dried bleached kraft pul. *Cellulose,* **4,** 329-339.

[١٠٢] Kantelinen, A., Sarkar, J., and Oksanen, T. (2000) Application of enzymes in production of release and high density papers. paper presented at the TAPPI Pulping Conference, Boston, USA, November 5-9, pp. 240-246.

[١٠٣] Thornton, J. (1994) Enzymaticdegradation of polygalacturonic acids released from mechanical pulp during peroxide bleaching. *Tappi J.,* **77,** 161-167.

[١٠٤] Thornton, J., Eckerman, C., Ekman, R., and Holmbom, B. (1996) Treatment of alkaline bleached mechanical wood pulp with pectinase, US Patent, 5,487,812.

[١٠٥] Reid, I. and Ricard, M. (2000) Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide, *Enzyme Microb Technol,***26,** 115-123.

[١٠٦] Reid, I. and Ricard, M. (2000) Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. *Enz. Microb. Technol.,* **26,** 115-123.

[١٠٧] Ricard, M., Orccotoma, J.-A., Ling, J., and Watson, R. (2005) Pectinase reduces cationic chemical costs in peroxide-bleached mechanical grades. *Pulp Pap. Can.,* **106,** 84-88.

[١٠٨] Ricard, M., Reid, I., and Orccotoma, J.-A. (2005) Pectinase reduces cationic chemical costs in peroxide-bleached TMP: a paper mill trial. *Pulp Pap. Can.,* **106,** 78-83.

[١٠٩] Paice, M., Reid, I., Bourbonnais, R., Archibald, F., and Jurasek, L. (1993) Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.,* **59,** 260-265.

[١١٠] Lobos, S., Larraondo, L., Salas, L., Karahanian, E., and Vicuna, R. (1998) Cloning and molecular analysis of a cDNA and the Cs-mnp1 gene encoding a manganese peroxidase isoenzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora. Gene,* **206,** 185-193.

[١١١] Prasad, D.Y., Heitman, J.A., and Joyce, T.W. (1993) Enzymatic deinking of colored offset newsprint. *Nordic Pulp Pap. Res. J.,* **2,** 284-286.

[١١٢] Jeffries, T.W., Klungness, J.H., Stykes, M.S., and Rutledge-Cropsey, K. (1994) Comparison of enzyme enhanced with conventional deinking of xerographic and laser printed waste papers. *Tappi J.,* **77,** 173-179.

[١١٣] Welt, T. and Dinus, R. (1995) Enzymatic deinking. *Prog. Pap. Recycling,* **4,** 36-47.

[١١٤] Morbak, A. and Zimmermann, W. (1998) Deinking of mixed office paper, old newspaper and vegetable oil based ink printed paper using cellulase, xylanases and lipases. *Prog. Pap. Recycling,* **7,** 14-21.

[١١٥] Zollner, H.K. and Schroeder, L.R. (1998) Enzymatic deinking of nonimpact printed white office paper with α-amylase. *Tappi J.,* **81,** 166-170.

[١١٦] Spiridon, I. and Machado de Andrade, A. (2005) Enzymatic deinking of old newspaper (ONP). *Prog. Pap. Recycling,* **14,** 14-18.

[١١٧] Patrick, K. (2004) Use of lipolytic enzymes for stickies control-enzyme technology improves efficiency, cost, and safety of stickies removal program. Paper Age, September 22-25.

[١١٨] Verhoef, R., Schols, H., Blanco, A., Siika-aho, M., Buchert, J., Lenon, G., and Voragen, A. (2005) Sugar composition and FT-IR analysis of exopolysaccharides produced by microbial isolates from paper mill slime deposits. *Biotechnol. Bioeng.,* **91,** 91-105.

[١١٩] Dykstra, G. and Stoner, M. (1997) Enzymes and biodispersants. Proceedings of the TAPPI/Biological Science Symposium, 117-124.

[١٢٠] Van Haute, E. (1999) Biodispersant and enzyme treatments. A new approach to deposit control, paper presented at the Proceedings of the 53rd Appita Annual Conference, Rotorua, New Zealand, vol. 2, pp. 575-579.

[١٢١] Covarrubias, R. and Jones, D. (2005) Optimyze-Enzymatic stickies control developments, paper presented at the Annual Meeting of the Pulp and Paper Technical Association of Canada (PAPTAC), A107-A110.

[١٢٢] Nilvebrant, N., Reimann, A., de Sousa, F., Cassland, P., Larsson, S., Hong, F., and Jönsson, L.J. (2002) Enzymatic degradation of oxalic acid for prevention of scaling. *Prog. Biotechnol.,* **21,** 231-238.

[١٢٣] Grönqvist, S., Rantanen, K., Alen, R., Mattinen, M.-L., Buchert, J., and Viikari, L. (2006) Laccase-catalysed functionalisation of TMP with tyramine. *Holzforschung,* **60,** 503-508.

[١٢٤] Chandra, R. and Ragauskas, A. (2002) Evaluating laccase-catalysed coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulps. *Enzyme Microb. Technol.,***30,** 855-861.

[١٢٥] Chandra, R., Lehtonen, L., and Ragauskas, A. (2004) Modification of high lignin content kraft pulps with laccase to improve paper strength properties. 1. Laccase treatment in the presence of gallic acid. *Biotechnol. Prog.,* **20,** 255-261.

[١٢٦] Chandra, R., Felby, C., and Ragauskas, A. (2004) Improving laccase-facilitated grafting of 4-hydroxybenzoic acid to high-kappa pulps. *J. Wood Chem. Technol.,***24,** 69-81.

[١٢٧] Thurston, C.F. (1994) The structure and function of fungal laccases.*Microbiol.,* **140,** 19-26.

[١٢٨] Gianfreda, L., Xu, F., and Bollag, J.M. (1999) Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed. J.,* **31,** 1-25.

[١٢٩] Felby, C., Pedersen, L.S., and Nielsen, B.R. (1997) Enhanced auto adhesion of wood fibres using phenol oxidases. *Holzforschung,* **51,** 281-286.

[١٣٠] Felby, C., Nielsen, B.R., Olesen, P., and Skibsted, L.H. (1997) Identification and quantification of radical reaction intermediates by electron spin resonance spectrometry of laccase-catalysed oxidation of wood fi bres from beech (*Fagus sylvatica). Appl. Microbiol. Biotechnol.,***48,** 459-464.

[١٣١] Felby, C., Hassinboe, J., and Lund, M. (2002) Pilot-scale production of fibreboards made by laccase oxidized wood fibres: board properties and evidence for crosslinking of lignin. *Enzyme Microb Technol.,* **31,** 736-741.

[١٣٢] Huttermann, A., Mai, C., and Kharazipour, A. (2001) Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,***55,** 387-395.

[١٣٣] Brumer, H., Qi, T., Baumann, M., Carlsson, K., and Teeri, T. (2004) Activation of crystalline cellulose surfaces through the chemoenzymatic modification of xyloglucan. *J. Am.Chem. Soc.,***126,** 5715-5521.

[١٣٤] Teeri, T., Brumer, H., Daniel, G., and Gatenholm, P. (2007) Biomimetic engineering of cellulose-based materials. *Trends Biotechnol.,* **25** (7), 299-306.

[١٣٥] Gustavsson, M.T., Persson, P.V., Iversen, T., Martinelle, M., Hult, K., Teeri, T., and Brumer, H., III (2005) Modification of cellulose fiber surfaces by use of a lipase and a xyloglucan endotransglycosylase. *Biomacro-molecules,* **6** (1), 196-203.