

DESARROLLO DE MATERIALES COMPUESTOS A PARTIR DE FIBRAS DE PLÁTANO MODIFICADAS CON ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Develop of plantain fiber bundle composites modified by ligninolytic enzymatic treatment

RESUMEN

La lignina es una macromolécula formada mediante una polimerización deshidrogenativa al azar de sus alcoholes precursores. Este fenómeno es causado por una oxidación fenólica realizada por enzimas presentes en las paredes de la célula vegetal. Trabajos previos han mostrado que su oxidación enzimática puede mejorar el proceso de auto-adhesión de fibras lignocelulósicas mediante la generación de radicales. En este trabajo se aborda la influencia que tiene el tratamiento enzimático con lacasa (polifenoloxidasas) sobre el desempeño mecánico de materiales compuestos elaborados a partir de fibras de plátano. Las variables consideradas durante el tratamiento de las fibras incluyen: la concentración enzimática y el uso del mediador ABTS. Adicionalmente la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), el análisis termogravimétrico (TGA) y la microscopía electrónica de barrido (SEM) sugieren cambios sobre la morfología y estructura de las fibras debidos a la acción de la enzima, que pueden tener influencia sobre el comportamiento del material compuesto.

PALABRAS CLAVES: Enzimas ligninolíticas, fibras de plátano, lacasa, lignina, mediadores, oxidación enzimática, materiales compuestos.

ABSTRACT

Lignin is a macromolecule formed by a condensation-polymerization from different alcoholic precursors. This phenomenon is caused by a phenolic oxidation which is made possible by the presence of enzymes that are situated at the cell wall of vegetables. As several works shown the enzymatic oxidation of lignin can improve the auto-adhesion of lignocellulose fiber bundles by the generation of radicals. This work is focused on the influence of enzymatic treatment as laccase (a polyphenol oxidase) on the mechanical properties of plantain fiber bundles composite materials. Treatment parameter as the concentration of enzyme and the use of the mediator ABTS have been analyzed. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA) and electron microscopy scanning (SEM) suggest changes in morphology and structure of the fiber bundles caused by the enzymatic treatment which could affect the composite material behavior.

KEYWORDS: Composite material, enzymatic oxidation, laccase, lignin, ligninolytic oxidation, mediator, natural fibers.

1. INTRODUCCIÓN

Diferentes materiales elaborados a partir de fibras naturales son producidos en grandes cantidades en todo el mundo gracias ventajas como su desempeño mecánico y buenas propiedades aislantes [1]. Sin embargo, desde el punto de vista ambiental y ecológico, su producción está limitada a causa del uso de resinas sintéticas [2], en particular de naturaleza termoestable, entre las que se encuentran resinas fenólicas y amínicas tales como las de úrea formaldehído, que tienen una importante dependencia del petróleo, un recurso no renovable [3].

Por este motivo se ha incrementado la búsqueda y la implementación de nuevas alternativas para enlazar fibras naturales (madereras y no madereras) con el fin de obtener materiales sin el uso de resinas sintéticas. Para tal fin es necesario realizar un tratamiento sobre los haces fibrosos que bien puede ser de tipo químico, termomecánico o enzimático. Entre las investigaciones que se han desarrollado, el tratamiento termo-mecánico empleando *steam explosion* [1,2,4] donde el material fibroso es sometido a condiciones de alta presión y temperatura y posteriormente es despresurizado

CATALINA ALVAREZ LÓPEZ

Ingeniera Agroindustrial.
Est. PhD
Universidad Pontificia Bolivariana
catalina.alvarezl@upb.edu.co

PIEDAD GAÑAN ROJO

Ingeniera Química, Ph.D.
Docente Investigadora
Universidad Pontificia Bolivariana
piedad.ganan@upb.edu.co

CAROLINA ARBOLEDA ECHAVARRIA

Msc en Ciencias Químicas
Est. PhD
Universidad de Antioquia
carboled@farmacia.udea.edu.co

AMANDA MEJIA GALLON

Química Farmacéutica,
Ph. D. En Ingeniería de Alimentos
Docente Investigadora
Universidad de Antioquia
Amejia@quimbaya.udea.edu.co

rápido es uno de los más empleados. En este caso ocurre la hidrólisis de las hemicelulosas y produce furanos donde según Suzuki et al. [5], el principal mecanismo de enlace de las fibras es debido a la formación de uniones lignina-furfural que son generados durante el proceso de prensado a altas temperaturas.

Otro de los mecanismos que se investiga actualmente es la polimerización o el entrecruzamiento [6] de los componentes de la fibra vegetal, mediante el uso de enzimas oxidativas [7], y que son aquellas que participan en la biosíntesis de la lignina en la formación de la pared vegetal. El papel de las enzimas durante la lignificación [7] parece estar ligada a la formación de radicales fenólicos, generados mediante la abstracción de un átomo de hidrógeno (deshidrogenación) de los precursores de la lignina. Esta acción catalítica involucra la acción de dos enzimas: peroxidasas (Lignina peroxidasa, Manganoso Peroxidasa) y fenoloxidasas (Lacasa) [8], las cuales polimerizan *in situ* los monolignoles mediante un acoplamiento aleatorio de los radicales libres generados [7].

Estas enzimas son producidas en la naturaleza principalmente por hongos de pudrición blanca de la madera [9]. Su rol en la síntesis y degradación de la lignina ha sido ampliamente investigado. Se ha reportado que la lacasa y las peroxidasas causan polimerización y depolimerización de los componentes de la lignina a través de la producción de radicales libres [10]. Sin embargo la lacasa a diferencia de las peroxidasas no necesita del peróxido de hidrógeno para reaccionar por ello su aplicación como catalizador se ha aumentado en los últimos años [11].

En su mecanismo de reacción la lacasa utiliza mediadores, que son sustancias de bajo peso molecular como el HBT, ABTS y el alcohol veratrílico, que aumentan la actividad catalítica de la enzima [12]. Los radicales obtenidos de la oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethylthiazoline-6-sulfonate]) se consideran muy estables [13] y cuando un sustrato como la lignina es oxidado por la lacasa en presencia de este mediador redox, se forma un mayor número de radicales debido a que estos mediadores pueden difundirse fácilmente a través de la estructura de este sustrato, lo cual no es posible para el enzima debido a su alto peso molecular.

Estos radicales formados pueden ser acoplados posteriormente en un proceso de prensado a altas temperaturas dando lugar a reacciones de polimerización que aumentando el peso molecular de la lignina [14]. De esta manera, es posible utilizar una reacción similar para enlazar fibras naturales generando una nueva polimerización o un entrecruzamiento de los componentes de la fibra [6].

En este trabajo se analiza la influencia de un pretratamiento con la enzima lacasa y el mediador ABTS,

para enlazar fibras de plátano procedentes de la vena central de la hoja con miras a desarrollar materiales compuestos, los cuales han sido evaluados mediante ensayos físico-mecánicos que incluyen flexión a tres puntos y captación de agua. Así mismo se incluyen análisis de espectroscopia infrarroja (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA) y microscopia electrónica de barrido (SEM) para evaluar los cambios presentados por la fibra luego del tratamiento enzimático.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Las fibras de plátano (*Dominico Harton*) fueron suministradas por la Fundación Social Banacol-Corbanacol, y provienen de la zona de Urabá, Antioquia-Colombia. Previo a su utilización, fueron molidas empleando en un molino de cuchillas marca *Retsch Ref. SM-100*.

La lacasa (*E.C. 1.10.3.2 benzenodiol: oxígeno reductasa*) empleada para esta investigación proviene del *Aspergillus oryzae* y fue suministrada por *Novozymes*, México. En este caso, una unidad de actividad esta definida como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μmol de ABTS por minuto. La actividad enzimática fue medida mediante el cambio en la absorbancia a 420 nm, que se relacionan a la oxidación de 1mM 2,2'-azino-bis-[3-ethylthiazoline-6-sulfonate] (ABTS) en una buffer fosfato-citrato 50mM pH 3. El análisis fue realizado en una cubeta de cuarzo de 900 μl a 30°C en un ultravioleta Cary 50 Bio UV-Vis.

El ABTS adquirido de Fluka fue utilizado como sustrato del enzima en la medición de la actividad y como mediador en el medio de reacción. La solución Buffer citrato fosfato se preparó con el Na_2HPO_4 0.1 M de J.T. Baker y Acido cítrico 0.2 M de Carlo Erba.

2.2. Métodos

2.2.1. Tratamiento enzimático

20 g de fibra de plátano fueron suspendidas en 350 ml de una solución buffer fosfato citrato (pH 5.0) a temperatura ambiente durante 1 h. La dosis de enzima adicionada fue de 3, 24 y 100 U/g. Se realizaron dos ensayos por triplicado, uno en presencia del mediador ABTS y el otro en ausencia de éste. La concentración del ABTS fue de 100 μl /350 ml de solución. Después del tratamiento, la fibra fue filtrada y secada durante 24 h. El blanco fue hecho de la misma manera que se describió anteriormente, con la diferencia que la enzima fue desactivada mediante ebullición durante 5 min.

2.2.2. Preparación de los materiales compuestos

Las fibras tratadas y sin tratar fueron conformadas en un molde de 50 x 150 cm², utilizando para ello una prensa de compresión *Pressmatic – 500* de *Meyco Casting Ltda.* un espesor y una densidad promedio de 2,2 mm y 850 kg/cm³, respectivamente. Las condiciones de prensado empleadas corresponden a 200 °C durante 10 min con un período de alivio de 1 min utilizando diferentes niveles de presión que pueden alcanzar hasta los 12 MPa.. El contenido de humedad de las fibras antes de ser prensadas era de aproximadamente el 11%.

2.2.6. Microscopia Electrónica de Barrido – SEM

La microscopia SEM fue usada para observar la microestructura y los cambios morfológicos experimentados por las fibras luego del tratamiento enzimático. Las muestras fueron cubiertas con oro usando la técnica *sputterin* y observadas en un Microscopio JEOL JSM 5910 LV.

2.2.3. Espectroscopia infrarroja- FTIR

Los análisis por FTIR obtenidos con un espectrofotómetro *Nicolet 460 ESP* en un rango de 4000-400 cm⁻¹, fueron usados para analizar las variaciones de la fibra causada por la oxidación enzimática con la enzima lacasa. El espectro fue llevado a cabo a una resolución de 4 cm⁻¹ con 20 barridos para cada muestra usando un disco de KBr que contiene 1% de fibra finamente molida.

2.2.4. Caracterización de los materiales compuestos

Para cada tratamiento se evaluó mediante la realización de ensayos de flexión a tres puntos el módulo de elasticidad (MOE), el módulo de rotura (MOR) así como la absorción de agua (WA). Todas las pruebas fueron realizadas de acuerdo a la norma ASTM D1037, excepto el acondicionamiento de las fibras que se realizó a 40% HR y a una temperatura de 21 °C. Los ensayos mecánicos fueron desarrollados en una máquina universal de ensayos *Instron, serie 5582*.

2.2.5. Análisis termogravimétrico – TGA

Para los ensayos de TGA, se utilizó un analizador termogravimétrico *HI-res TGA 2950 TA Instrument*, utilizando una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto hasta alcanzar 800 °C. El ensayo fue realizado en una atmósfera controlada de nitrógeno.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal como se aprecia en la micrografía de SEM de la figura 1, las fibras de plátano empleadas en este caso corresponden una disposición de varias fibras elementales, que se comunica a través de la lamella

media (lm), la cual contiene lignina. De este modo, cuando los haces fibrosos son separados por medios mecánicos (molido) de la fuente vegetal de la cual procedan, y que en esta caso es la vena central de las hojas de plátano, pueden quedar cubiertas por una capa que contiene lignina (fig. 2).

Como se observa en la figura 3, luego de la fibra ser sido sometida a un tratamiento con lacasa, la corteza es removida parcialmente de la superficie, indicando una efectiva reacción con la enzima en el proceso de oxidación [9]. Este tratamiento al mismo tiempo que causa una leve fragmentación de la lignina, promueve un estado de activación en los hidroxilos de la lignina remanente mediante la oxidación del anillo aromático [15].

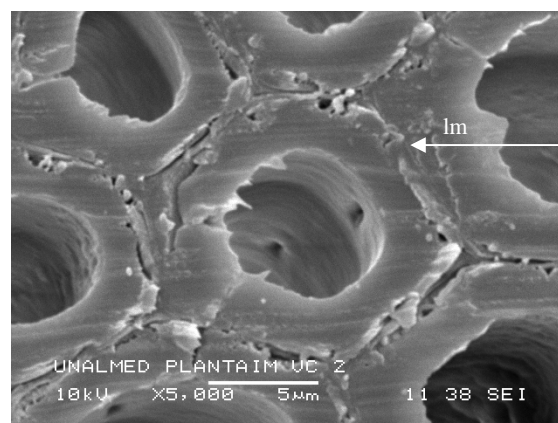


Figura 1. Haz fibroso de fibra de plátano de la vena central de la hoja.

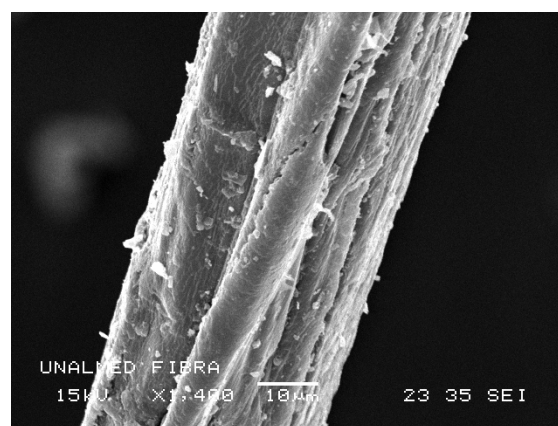


Figura 2. Superficie de fibra de la vena central de la hoja de plátano sin tratar, extraída en forma mecánica.

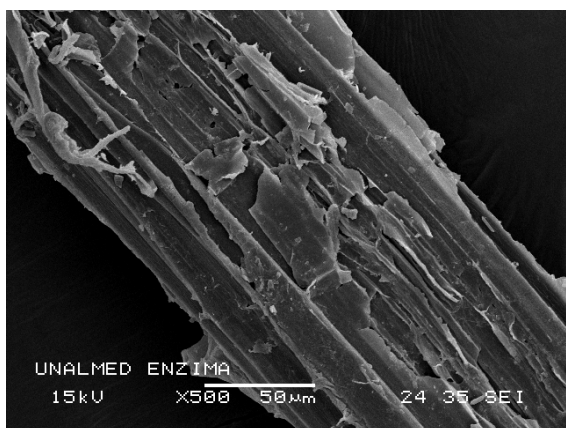


Figura 3. Superficie de fibra de la vena central de la hoja de plátano luego de tratamiento con 100U/g de lacasa durante 1 h.

Con miras a establecer la influencia del tratamiento enzimático sobre las fibras de plátano, en la figura 4 se presentan los espectros infrarrojos de las fibras tratadas y sin tratar.

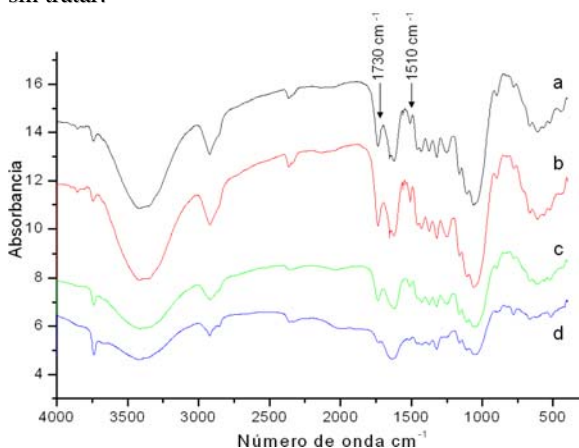


Figura 4. Espectro FTIR de fibra de plátano tratada con lacasa + ABTS: (a) 100U/g, (b) 24U/g, (c) 3U/g y (d) blanco.

De acuerdo con la figura 4, los espectros son típicos de una fibra natural en lo que respecta a presencia de celulosa, hemicelulosa, y lignina principalmente. Lo que indica que la enzima lacasa no afecta de manera significativa su composición química. Sin embargo, tal como se resalta en las diferentes muestras tratadas, variaciones sobre bandas características de la lignina aromática [16] que corresponden a 1510 y 1730 cm^{-1} son observadas de forma apreciable. En trabajos de investigación asociados a la degradación de ligninas industriales [16], la vibración a 1510 cm^{-1} disminuye consecuencia del proceso de degradación y por ende a la deformación del esqueleto aromático. Sin embargo, en el desarrollo del presente trabajo el objetivo no es la depolimerización de la lignina sino su reactivación mediante la formación de radicales fenoxílicos, que a causa del corto tiempo de exposición a la acción de la enzima lacasa no ocasionan una degradación, sino que

por el contrario puede reaccionar con componentes de bajo peso molecular presentes en la fibra, alterando su peso molecular [17], y por ende mostrando un aumento en esta banda tal como se observa en esta caso.

La banda a 1730 cm^{-1} relacionada con cetonas no conjugadas y éster aromáticos, presenta de nuevo evidencia de la reacción de la enzima con los grupos hidrofénolicos, los cuales luego de ser oxidados pasan a formar grupos carbonilos y generar radicales libres como se muestra en la fig. 5. Estas dos variaciones pueden guardar relación entonces con las observaciones comentadas antes respecto a los cambios apreciados en las micrografías obtenidas por SEM.

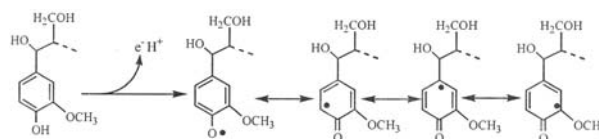


Figura 5. Oxidación de estructuras fenólica de la lignina y formación de radicales fenoxílicos.

Para evaluar la influencia de los radicales formados en la lignina presente en la superficie de la fibra, se evaluaron las propiedades mecánicas (módulos de elasticidad, MOE y de rotura, MOR) de los materiales compuestos elaborados a partir de fibras de plátano tratadas con lacasa y con lacasa + ABTS como único componente. Los resultados de los ensayos se presentan en la tabla 1.

Concentración (U/g)	MOE (GPa)	MOR (MPa)	WA (%)
Lacasa			
3	0,82	7,11	90,21
24	0,89	7,56	78,12
100	1,16	9,83	62,53
Blanco	0,69	5,17	184,37
Lacasa + ABTS			
3	0,94	7,4	82,10
24	1,06	8,3	45,00
100	1,53	1,3	31,25

Tabla 1. Propiedades mecánicas de los materiales compuestos de fibras de plátano tratadas con lacasa y lacasa + ABTS.

La temperatura de prensado de los composites con fibras tratadas con lacasa y lacasa + ABTS fue de 200 °C, tomando como base trabajos de investigación desarrollados sobre fibras vegetales para elaborar tableros aglomerados sin resinas sintéticas [6]. El tiempo de prensado fue inicialmente de 15 min, con un tiempo de alivio de 1 min. Sin embargo, la apariencia de los materiales es de un color oscuro muy pronunciado, por lo que este tiempo de exposición fue reducido, aunque los análisis iniciales de este material presentaron mejores propiedades mecánicas (MOE, MOR) y de absorción de agua (WA), que ameritan un análisis más completo de la

influencia del tiempo y de los cambios sufridos por la fibra luego de largos (15-20 min) periodos de exposición a altas temperaturas (200 °C).

Como se confirmó en los espectros de IR, el tratamiento enzimático con la lacasa y lacasa + ABTS generó radicales libres en la lignina presente en la superficie de la fibra, que motivan un incremento de las propiedades mecánicas respecto a las muestras con lacasa desactivada. Se aprecia el benéfico efecto del incremento de la concentración de enzima utilizada, en este caso conforme se aumente la cantidad, es mejor la respuesta del material. Así mismo al emplear un mediador en el sistema, las propiedades de los composites incrementan en comparación a los elaborados sin el uso del ABTS. Esto es debido a que el ABTS por su menor tamaño y su capacidad de oxidar componentes no fenólicos tiene la capacidad de generar un mayor número de radicales sobre la fibra [18], mientras que el tamaño de la molécula de la lacasa por ser mayor solo podría oxidar componentes fenólicos, razón por la cual tiene una actividad menos eficiente como se puede observar en la tabla 1.

Con la generación de más radicales libres la posibilidad de un mayor número de nuevos enlaces covalentes incrementa, mejorando la interfase del material y por ende sus propiedades mecánicas debido a la formación de una repolimerización o un entrecruzamiento de la lignina radicalizada [6].

En cuanto al desempeño térmico, los ensayos de TGA realizado a la fibra tratada con enzima desactivada (fig. 6) y fibra tratada con 100U/g (fig. 7), indican como se conservan los rangos de degradación de los principales componentes de la fibra vegetal correspondientes a los presentados en la tabla 2. Sin embargo, en la fig. 7 se observa como se desplaza el pico correspondiente primero, esto es el que hace referencia a la degradación de hemicelulosas y posteriormente celulosa y lignina desde 321,37 °C hasta 325,77 °C y por otro lado, se presenta un desplazamiento de aproximadamente 10 grados desde 470,26 hasta 480,71 °C, relacionado con la degradación de la lignina remanente [19]. Esto puede indicar que la estructura formada luego de tratar la fibra con lacasa y ser posteriormente prensada se convierte en una estructura más compleja o difícil de degradar, debido posiblemente a que la lignina activada vía radicalaria se polimeriza por medio del acoplamiento de los radicales libres generados en el tratamiento.

Estos mismos resultados se reflejan en los datos obtenidos de la absorción de humedad (tabla 1), los cuales presentan una disminución en el porcentaje de agua absorbida a medida que la concentración de enzima empleada aumenta. Del mismo modo, el uso de del mediador ABTS arroja permite obtener mejores resultados que cuando este no es empleado.

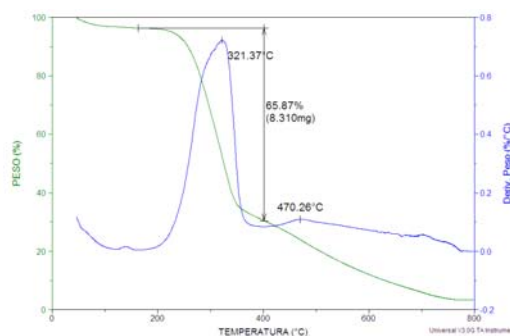


Figura 6. TGA de tablero elaborado con fibras tratadas con enzima desactivada

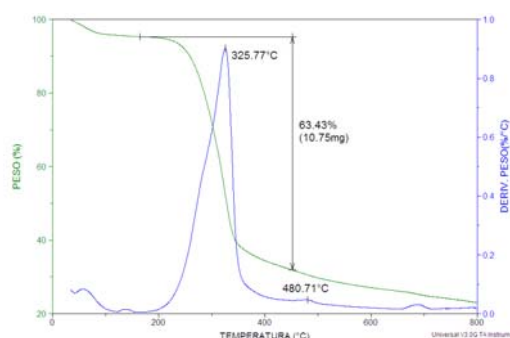


Figura 7. TGA de tablero elaborado con fibras tratadas con 100U/g +ABTS

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha reportado que enzimáticamente se generan radicales libres sobre la superficie de la lignina y que durante de presado a altas temperaturas son acoplados generando una polimerización o entrecruzamiento que mejoran las propiedades de los materiales compuestos obtenidos. Aunque se ha reportado el uso de la lacasa para degradar lignina, esta puede provocar la degradación o polimerización al mismo tiempo. Sin embargo el tiempo de exposición en este trabajo es mucho menor al necesario para producir un rompimiento de los enlaces C-C de la estructura, lo que propicia un efecto benéfico sobre el comportamiento mecánico y térmico de los materiales desarrollados.

Es necesario realizar nuevos análisis para medir el cambio en el peso molecular de la lignina por técnicas cuantitativas que soporten los datos obtenidos en la presente investigación, y analizar la si al final del ensayo continua la actividad enzimática para evaluar la conveniencia de trabajar mayores tiempos de tratamiento para obtener un mejor resultado en la generación de radicales libres. En cualquier caso los datos reportados son promisorios para continuar explorando las técnicas

de modificación enzimática en la búsqueda de desarrollar materiales compuestos biodegradables a partir de fibras naturales sin contar con la presencia de matrices poliméricas sintéticas.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Centro Integrado para el Desarrollo de la Investigación CIDI-U.P.B por la financiación al proyecto 953-11/06/18 que ha permitido que este trabajo de investigación sea posible al igual que a Colciencias por su apoyo financiero.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Widyorini, J. Xu, T. Watanabe and S. Kawai, "Chemical changes in steam-pressed kenaf core binderless particleboard," *Journal of Wood Science* vol. 51, pp. 26-32, 2003.
- [2] J. A. Velazquez, F. Ferrando and J. Salvadó, "Effects of kraft lignin addition in the pruction of binderless fiberboard from steam exploded *Miscanthus sinensis*," *Industrial Crops and Products*, vol. 18, pp. 17-23, 2003.
- [3] P. Widsten, S. Tuominen, P. Qvintus-Leiro and J.E. Laine, "The influence of high defibration temperature on the properties of medium-density fiberboar (MDF) made laccase-treated softwood fibers," *Wood Science and Technology*, vol. 38, pp. 521-528, 2004.
- [4] J. E. G. van Dam, M.J.A. van den Oever, E.R.P. Keijsers, J.C. van der Putten, C. Anayron, F. Josol and A. Peralta, "Process for production of high density/high performance binderless boards from whole coconut husk Part 2: Coconut husk morphology, composition and properties," *Industrial Crops and Products*, vol. 24, pp. 96-104, 2006.
- [5] S. Suzuki, H. Shintani, S. Y. Park, K. Saito, N. Laemsak, M. Okuma and K. Iiyama, "Preparation of Binderless Boards from Steam Exploded Pulps of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jaxq.) Fronds and Structural Characteristics of Lignin and Wall Polysaccharides in Steam Exploded Pulps to be Discussed for Self-Bindings," *Holzforschung* Vol. 52, pp. 417-426, 1998.
- [6] C. Felby, J. Hassingboe and M. Lund, "Pilot-scale production of fiberboards made by laccase oxidized wood fibers: board properties and evidence for cross-linking of lignin," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 31, pp. 736-741, 2002.
- [7] C. James, "Lignina" en *Pulpa y papel*, pp. 71-150
- [8] A. Kharazipour, C. Mai and A. Huttermann, "Polyphenoles for compounded materials," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 59, pp. 237-243, 1998.
- [9] R. Bourbonnais, and M.G. Paice, "Demethylation and Delignification of Kraft Pulp by *Trametes-Versicolor* Laccase in the Presence of 2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate)," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 36, pp. 823-827, 1992.
- [10] C. Felby, B. R. Nielsen, P. O. Olesen, and L. H. Skibsted, "Identification and quantication of radical reaction intermediates by electron spin resonance spectrometry of laccase-catalyzed oxidation of wood fibers from beech (*Fagus sylvatica*)," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 48, pp. 459-464, 1997.
- [11] A. Huttermann, C. Mai and A. Kharazipour, "Modification of lignin for the production of new compounded materials," *Applied Microbiology and Biotechnonology*, vol. 55, pp. 387-394, 2001.
- [12] S. Shleev, P. Persson, G. Shumakovich, Y. Mazhugo, A. Yaroplov, T. Ruzgas and L. Gorton, "Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, pp. 841-847, 2006
- [13] R. S Wolfden and R.L Wilson, "Radical cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,20-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)," *Journal of Chemical Society*, vol. 11, pp. 805-812, 1982.
- [14] F. Xu, H. J. Deussen, B. Lopez, L. Lam and K. C Li, "Enzymatic and electrochemical oxidation of N-hydroxy compounds-Redox potential, electron-transfer kinetics, and radical stability," *European Journal of Biochemistry*, vol. 268, pp. 4169-4176, 2001.
- [15] K. Minato, R. Shimizu and S. Kawaguchi, "Contribution of lignin to the reactivity of wood in chemical modifications I: influence of delignification on acetylation," *Journal of Wood Science*, vol. 53, pp. 218-222, 2007.
- [16] U. Muller, M. Ratzsch, M. Schwanninger, M. Steine and H. Zob, "Yellowing and IR-changes of spruce wood as result of UV-irradiation" *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 69 pp. 97-105, 2003.
- [17] C. Felby, L. G. Thygesen, A. Sanadiv and S. Barsberg, "Native lignin for bonding of fiber boards—evaluation of bonding mechanisms in boards made from laccase-treated fibers of beech (*Fagus sylvatica*)" *Industrial Crops and Products*, vol. 20, pp. 181-189, 2004.
- [18] M. Lund and C. Felby, "Wet strength improvement of unbleached kraft pulp through laccase catalyzed oxidation," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 28 pp. 760-765, 2001.
- [19] C. E. Byrne and D. C Nagle, "Carbonization of wood for advanced materials applications," *Carbon*, vol. 35, pp.259-266, 1997.