

Machbarkeitsstudie:

**Enzymatische Holz-Oberflächen-Funktionalisierung zur
Verbesserung der Verklebungsgüte**

WHFF-Projekt Nr. 2011.18

Auftraggeber Fonds zu Förderung der Wald- und Holzforschung

Verfasser Dr. Mark Schubert

Projektbeginn 01. 02. 2012

Projektleiter Dr. M. Schubert, Prof. Dr. Francis Schwarze und M. Arnold

Datum April 2013

Kontakt:

Mark Schubert

EMPA, Abt. Holz

Lerchenfeldstrasse 5

CH-9014 St. Gallen

Tel.: 058 765 7624 (direkt)

E-Mail: mark.schubert@empa.ch

Inhaltsangabe

| | |
|--|-----------|
| 1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG | 1 |
| 1.1 Problembeschreibung | 1 |
| 1.2 Stand des Wissens..... | 2 |
| 2 VERSUCHSPROGRAMM | 6 |
| 2.1 Laccasen | 6 |
| 2.1.1 Enzymaktivitätsbestimmung..... | 6 |
| 2.1.2 Laccaseproduktion | 6 |
| 2.1.3 Charakterisierung der Laccasen | 7 |
| 2.2 Laccase-katalysierte Holz-Oberflächen-Funktionalisierung..... | 9 |
| 2.2.1 Applikation | 9 |
| 2.3 Mechanische Prüfung | 10 |
| 2.3.1 Verklebung | 10 |
| 2.3.2 Zugscherfestigkeit | 11 |
| 2.4 Oberflächenanalytik..... | 12 |
| 2.4.1 Benetzungsverhalten Holzoberfläche | 12 |
| 2.4.2 Fourier Transform Infrarot Spektroskopie | 13 |
| 3 ERGEBNISSE..... | 15 |
| 3.1 Laccasen | 15 |
| 3.2 Mechanische Prüfung | 18 |
| 3.3 Oberflächenanalytik..... | 24 |
| 3.3.1 Benetzungsverhalten Holzoberfläche | 24 |
| 3.3.2 Fourier Transform Infrarot Spektroskopie | 27 |
| 4 ZUSAMMENFASSUNG | 31 |
| LITERATURVERZEICHNIS | 33 |

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Problembeschreibung

Neben der Auswahl eines geeigneten Klebstoffs ist die Beschaffenheit der Fügeteiloberfläche von entscheidender Bedeutung für die erzielbaren Verbundfestigkeiten und vor allem für die Langzeitbeständigkeit der Holzverklebung. Holzinaktivierung ist ein Oberflächenphänomen, welches die äusseren Holzsichten betrifft und durch diverse Einflüsse wie Temperatur oder Verschmutzung hervorgerufen wird. Diese physikalische und chemische Veränderung der Holzoberflächeneigenschaften hat zur Folge, dass sich das Benetzungs-, Fließ und Eindringverhalten sowie die Aushärtung eines Klebstoffes deutlich verschlechtern kann (Christiansen, 1990). Aufgrund der guten kohäsiven Festigkeiten moderner Klebstoffe ist zu vermuten, dass die Grenzschicht zwischen Holz und Klebstoffpolymer, insbesondere bei inaktivierter Oberfläche („weak boundary layer“), die Schwachstelle bei Holzkleverbunden darstellt und die Ursache des Versagens in einer unzureichenden Adhäsion des Klebstoff-Holz-Systems begründet ist.

Ziel einer vorgängigen Oberflächenbehandlung ist es daher, eine möglichst homogene, definierte Oberfläche zu erzeugen, die die Grundlage schafft für:

- eine gleichmässige, sehr gute Benetzung der Fügeteiloberfläche mit Klebstoff
- eine Verbesserung der Haftung und eine reproduzierbare, langzeitbeständige Fügeverbindung

Obwohl bereits etablierte physikalische und chemische Verfahren existieren, ist die enzymatische Holz-Oberflächen-Funktionalisierung eine effiziente und zugleich umweltfreundliche Alternative zur Verbesserung der Oberflächenreakтивität (Kudanga *et al.*, 2008). Für die Kopplung von phenolischen „Ankermolekülen“ an die Holzoberfläche bzw. an das Ligninpolymer sind Laccasen besonders gut geeignet. Laccasen sind eine Gruppe von Enzymen, die die Oxidation einer Vielzahl von Phenolen und Aminen bei gleichzeitiger Reduktion von Sauerstoff katalysieren. Die hierbei gebildeten kovalenten Bindungen können selbst wiederum mittels einer freien funktionellen Gruppe Reaktionen mit anderen Substanzen eingehen (siehe Abb. 3). Laccasen spielen bereits eine wichtige Rolle bei ungiftigen und energieeffizienten Herstellungsverfahren in der Chemie-, Textil- aber auch in der Holzindustrie („Green chemistry“).

Das Ziel der vorliegenden Machbarkeitsstudie war es den Einfluss der Laccase-katalysierten Holzfunktionalisierung mit Ankermolekülen auf die Verklebungsgüte von Buche und Lärche zu untersuchen. Die Schwerpunkte waren:

- Charakterisierung kommerzieller und selbstproduzierter Laccasen und Definierung eines Systems zur enzymatischen Holzfunktionalisierung.
- Quantifizierung der Auswirkungen der Laccase-katalysierten Holz-Oberflächen-Funktionalisierung auf die Qualität der Verklebungsgüte.

- Charakterisierung der Holzoberfläche anhand Benetzungseigenschaften und Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie.

1.2 Stand des Wissens auf dem Gebiet

Beruhend auf den Ausführungen von Elstermann (2011) werden im Folgenden die Grundlagen der Verklebung erläutert. Kleben ist nach der DIN 8593-0 (2003) dem Fertigungsverfahren Fügen untergeordnet. Fügen ist als eine Verbindung definiert, die einen auf Dauer bestimmten Zusammenhalt von Werkstücken schafft (DIN 8593-0, 2003). Klebstoffe sind Materialien, die es gestatten, Werkstoffe ohne mechanische Verbindungsmittel wie Nägel, Bolzen usw. fest miteinander zu verbinden. Unter einem Klebstoff versteht man einen nichtmetallischen Werkstoff, der Werkstoffe durch Oberflächenhaftung (Adhäsion) und seine innere Festigkeit (Kohäsion) verbinden kann, ohne dass das Gefüge der zu verbindenden Teile wesentlich verändert wird (Abb. 1). Die hauptsächliche Aufgabe einer Klebefuge ist nach Marra (1992), die mechanischen Kräfte zwischen zwei Hölzern zu übertragen.

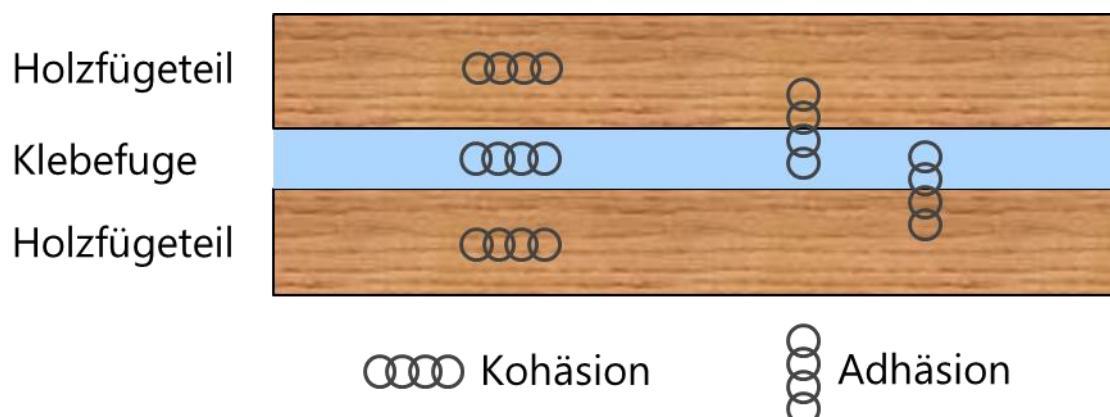


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Holzverklebung durch Oberflächenhaftung (Adhäsion) und innere Festigkeit (Kohäsion).

Als Adhäsion (lat.: *adhaerere* „anhaften“) kann man im Allgemeinen die Haftung eines Stoffes an einen anderen beschreiben. Es gibt drei verschiedene Arten von Adhäsion; die spezifische, die mechanische und die Autoadhäsion (Habenicht, 2009). Für eine Verklebung von Holz kommen verschiedene Adhäsionsmodelle in Frage. Durch die Porosität und Anisotropie des Holzes ging man lange Zeit davon aus, dass die Haftung von Klebstoffen allein durch mechanische Verankerung zustande kam (Zeppenfeld und Grunwald, 2005). Heutzutage umfassen die Annahmen auch chemische und physikalische Kräfte zwischen Klebstoff und Holzoberfläche. Schäfer (1964) beschreibt in seinem Bericht, dass neben van-der-Waals'schen Kräften auch Wasserstoffbrückenbindungen für die Adhäsion verantwortlich sind. Durch die Wechselwirkung der genannten Kräfte auf die adhäsierenden Stoffe, würde bei einer idealen Haftung eine Trennkraft von 5.000 kg/cm^2 (500 N/mm^2) nötig

sein (Schäfer, 1964). Zusätzlich zur Ausbildung von van-der-Waals Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen ist das Ziel einer Holzverklebung, zusätzlich chemische Bindungen zwischen Holz und Klebstoff herzustellen. Mit einer echten chemischen (kovalenten) Bindung würde eine Bindekraft von 50.000 kg/cm^2 (5000 N/mm^2) erreicht werden. Sie kommen dadurch zustande, dass zwischen den reagierenden Molekülen Elektronen ausgetauscht werden. Diese Möglichkeit der kovalenten Bindung spielt besonders bei der Verwendung von isocyanathaltigen Klebstoffen eine entscheidende Rolle. So treten im günstigsten Fall alle drei Bindungen (van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoff-Brückenbindung, kovalente chemische Bindungen) auf.

Kohäsion (lat.: *cohaerere* „zusammenhängen“), beschreibt den Zusammenhalt von Molekülen und Atomen innerhalb eines Stoffes, wobei chemische und physikalische Kräfte auftreten, die eine unterschiedlich starke Bindung ausbilden. Wobei auch hier wieder die wichtigsten Bindungen die kovalente Bindung, van-der-Waals Kräfte und die Wasserstoffbrückenbindungen sind. Die Übertragung von mechanischen Kräften zwischen den Fügeteilen erfordert ein optimales Verhältnis zwischen Adhäsion und Kohäsion.

Schwache Grenzschichten (Weak Boundary Layers)

Die Theorie der schwachen Grenzschichten hat ihren Anfang in den 1960er Jahren. Bikerman (1967) beschreibt solche Schichten als Barriere mit niedrigen Kohäsionskräften. Ausgelöst werden diese u.a. durch Verunreinigungen, niedermolekulare Verbindungen oder Holzinhaltsstoffe. Good (1972) definiert schwache Grenzschichten (*weak boundary layer* (WBL)) als eine dünne Schicht, die geringere mechanische Belastungen aufnehmen kann als angrenzende Schichten. Die Grösse einer solchen Schicht kann zwischen einigen Ångström und zehntel Millimetern liegen. Diese beiden Ansätze werden heute als mechanisch und chemisch schwache Grenzschicht bezeichnet (Stehr und Johansson, 2000) (*mechanical weak boundary layer* (MWBL) und *chemical weak boundary layer* (CWBL)). Die schwachen Grenzschichten (MWBL und CWBL) entstehen durch physikalische oder chemische Inaktivierung der Fügeteiloberfläche, so können bei mechanischer Bearbeitung der Holzoberfläche wie Sägen Deformationen von 0,1 bis 0,2 mm Tiefe entstehen, welche eine gute Adhäsion verhindern. Untersuchungen von Christiansen (1990) und Stehr (1999) zeigten, dass sowohl MWBL und CWBL als Holzoberflächeninaktivierung die Festigkeit der Holzverklebung stark herabsetzen.

Vorbehandlung der Holzoberfläche

Um den Effekt der schwachen Grenzschicht zu minimieren und um eine bessere Adhäsion zu erreichen, werden unterschiedliche physikalische und chemische Methoden zur Holzoberflächenbehandlung eingesetzt. Bei der mechanischen Vorbehandlung werden die Fügeflächen vor der Verklebung durch Hobeln (Arnold *et al.* 2010) bearbeitet. Ein neueres Verfahren stellt die Plasmabehandlung der Holzoberfläche dar (Avramidis *et al.*, 2011).

Allerdings ist dieses Verfahren aufwendig sowie kosten- und energieintensiv. Breite Anwendung finden chemische Methoden zur Verbesserung der Holz-Klebstoff-Interaktion (Lu *et al.*, 2000). So genannte Primer (Haftvermittler) werden eingesetzt, wenn die Haftungseigenschaften von Werkstoffoberflächen verbessert werden sollen oder die Klebung unter schwierigen Bedingungen durchgeführt werden müssen (Lu *et al.*, 2000). Ein Beispiel für einen in der Praxis verwendeter Haftvermittler ist der HMR (Hydroxymethylierter Resorcinol Primer) (Vick *et al.*, 1995; Sun & Frazier, 2005; Lopez-Suevos & Richter, 2009). Das Verhalten von HMR im Holz-Klebstoff Verbund wurde in den vergangenen Jahren vielfach untersucht (Vick, 1995; Vick *et al.* 1995; Christiansen, 2005). Allerdings beinhaltet der Einsatz solcher chemischer Haftvermittler auch einige Nachteile. HMR ist eine wässrige alkalische Mixtur von Resorcinol-Formaldehyd und somit aus gesundheitlichen Gesichtspunkten nicht ganz unbedenklich. Ein weiterer Nachteil ist die benötigte Verweilzeit von HMR auf der Holzoberfläche, die eine industrielle Applikation erschwert.

Hier könnte die enzymatische Holzoberflächenbehandlung mit Laccase eine gute Alternative darstellen. Laccase ist umweltverträglich und birgt keine gesundheitsgefährdenden Risiken. Ein weiterer Vorteil ist die im Vergleich zu den chemischen HMR-Primern sehr kurze Verweilzeit von wenigen Minuten.

Laccase-katalysierte Holz-Oberflächen-Funktionalisierung

Das Enzym Laccase gehört zu den kupferabhängigen Polyphenoloxidasen (Benzendiol:Sauerstoff-Oxidoreduktasen, EC1.10.3.2) und ist neben den Ligninperoxidasen (E.C.1.11.1.7.) und Manganperoxidasen (E.C. 1.11.1.13.) eines der wichtigsten ligninabbauenden und –polymerisierenden Enzyme (Baldrian, 2006). Laccasen sind in der Natur weit verbreitet und treten vor allem in Pilzen und Pflanzen, aber auch in Insekten und Bakterien (Claus, 2003; Claus, 2004; Hoegger *et al.*, 2007; Kunamneni *et al.*, 2008) auf. In Pflanzen sind Laccasen an der Ligninsynthese durch radikalische Polymerisation der Monolignole *p*-Cumarylalkohol, *E*-Koniferylalkohol und Sinapylalkohol beteiligt (Boudet, 2000). Die Namensgebung ist auf das Jahr 1883 zurück zu führen, hier wurde das Enzym erstmalig aus dem Lackbaum *Rhus vernicifera* isoliert (Yoshida, 1883). In China wurde bereits vor über 6000 Jahren das Enzym Laccase zur Herstellung von Lack für das Kunsthandwerk eingesetzt. Dafür wurde der Saft des Lackbaumes verwendet, der große Mengen an Urushiol (Phenol) enthält, das in Gegenwart von Sauerstoff und Laccase zu Lack polymerisiert (Huttermann *et al.*, 2001).

Laccase besitzt ein relativ breites Substratspektrum. Es oxidiert verschiedene phenolische Verbindungen wie *o*- und *p*-Diphenole, Aminophenole, Polyphenole und methoxy-substituierte Phenole, sowie einige anorganische Verbindungen (Leonowicz *et al.*, 2001). Bei der Oxidation phenolischer Substrate entstehen unter Freisetzung eines Protons Phenoxyradikale, die spontan zu Dimeren, Oligomeren oder Polymeren reagieren können. Somit umfassen von Laccase katalysierte Reaktionen oxidative Kupplungen von Monomeren, wodurch C–C-, C–O- und C–N-Verbindungen geknüpft werden (Claus, 2003). Wie

beschrieben führt die Laccasebehandlung zur Oxidation und Radikalisierung der sich an der Holzoberfläche befindlichen Ligninmoleküle (Grönqvist *et al.*, 2006; Kudanga *et al.*, 2010). Dadurch wird die Holzoberfläche „aktiviert“ und für eine gewisse Zeit zur weiteren Reaktion mit anderen Stoffen befähigt. Auf diese Weise ist es möglich, verschiedenste Substanzen an die Holzoberfläche kovalent zu binden. In einer Forschungsarbeit von Schubert und Ihssen (2011) wurde durch eine Laccase vermittelte kovalente Bindung von bioaktiven Molekülen an die Ligninstruktur eine Holzoberfläche erzeugt, die eine starke antimikrobielle Wirkung gegen eine Vielzahl von Organismen zeigte und dabei noch auswaschungsresistent war (Schubert *et al.*, 2012).

2. Versuchsprogramm

2.1 Laccasen

2.1.1 Enzymaktivitätsbestimmung

In Anlehnung an Bourbonnais and Paice (1990) wurde die Volumenaktivität der Laccase photometrisch durch Oxidation von 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) bestimmt. Substanzen absorbieren elektromagnetische Strahlung in bestimmten Wellenlängenbereichen. Somit ist das Absorptionsmaximum bei jedem Substrat unterschiedlich (Camarero *et al.*, 2005). Das Absorptionsmaximum von ABTS liegt bei 420 nm. Die Änderung der Absorption, infolge der Oxidation von ABTS, kann somit bei einer Wellenlänge von 420 nm beobachtet werden. In dieser Arbeit geschah dies über einen Zeitraum von drei Minuten. Aus der Absorptionsänderung innerhalb des Messzeitraumes wurde die Aktivität der Laccase berechnet:

Es wurden 200 μ l einer 1:10000 verdünnten Laccase-Lösung, 100 μ l ABTS 3 mM und 700 μ l Citratpuffer pH 4,5 in eine Küvette (1,5 ml halbmikro, Kartell, Mailand, Italien) pipettiert und die Extinktion während 3 Minuten bei 420 nm mit dem Photometer gemessen. Die unverdünnte Laccase-Lösung enthielt 1g Laccase pro ml Citratpuffer. Als Nullwert für die photometrischen Messungen dienten 900 μ l Citratpuffer zusammen mit 100 μ l ABTS.

Zur Berechnung der Volumenaktivität wurde folgende Formel verwendet:

$$V_a = E \times V \times 1000 / (\epsilon_{420} \times d \times v \times t) \times F$$

E entspricht dabei der gemessenen Extinktion, V dem Gesamtvolumen (1 ml), ϵ_{420} dem molaren Extinktionskoeffizienten ($36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d der Schichtdicke der Küvette (1 cm), v dem Probenvolumen (0,2 ml), t der Zeit in Minuten und F dem Verdünnungsfaktor.

Die Volumenaktivität wurde ausgedrückt in units U pro Milliliter (1 U = 1 μmol Substratumsatz pro Minute). Die Laccaseaktivität für die Versuche mit Ligninmodellsubstanzen und Mediatoren wurde in nkat/ml angegeben. 16,66 nkat/ml entspricht 1 U/ml.

Alle photometrischen Messungen erfolgten bei einer Raumtemperatur von ca. 23°C.

2.1.2 Laccaseproduktion

Aufbauend auf den Studien von Ihssen *et al.* (2011) wurden Laccasen mit Hilfe eines einfachen, auf günstig verfügbaren Materialien basierenden Kultivierungsverfahren hergestellt. Für die Herstellung pilzlicher Laccase wurden Petrischalen mit einem

Nährmedium aus 3% Malzextrakt mit verschiedenen Pilzarten inkuliert. Nach einer einwöchigen Inkubationszeit wurde aus den Schalen Agarscheiben mit Pilzmycel (\varnothing 1 cm) ausgestochen. Mit zehn dieser Scheiben wurde in je einem Erlenmeyerkolben die Beimpfung eines Nährmediums durchgeführt. Es wurden drei Erlenmeyerkolben (500 ml) mit jeweils 250 ml „Fichtenhackschnitzel“-Nährmedium und drei Erlenmeyerkolben (500 ml) mit jeweils 250 ml des „Basal semi-defined medium A“ verwendet. Bei beiden Nährmedien wurde der pH-Wert auf 4,5 mit 4 M Natronlauge (NaOH) eingestellt. Ein 3-maliges Dampfsterilisieren der Fichtenhackschnitzel für das entsprechende Nährmedium sollte eine Verunreinigung ausschließen. Als Inducer wurde am vierten Tag nach der Beimpfung der Nährmedien 4 mM Veratrylalkohol hinzugegeben. Die Erlenmeyerkolben mit den Pilzkulturen wurden mit Watte verschlossen und bei 22°C und 70 % relativer Luftfeuchte in einer Klimakabine inkubiert. Eine Aktivitätsmessung der Laccase erfolgte alle drei bis vier Tage mit dem ABTS-Test. Dazu wurde der Überstand des Nährmediums verwendet. Bei Erreichen einer Aktivität von mindestens 2 nkat/ml wurde die Laccase an Ligninmodellsubstanzen getestet. Zudem erfolgte die Bestimmung des Temperaturoptimums, der Temperaturstabilität und des pH-Optimums (siehe folgendes Kapitel).

2.1.3 Charakterisierung der Laccasen

Die Charakterisierung diverser technischer und selbstproduzierter Laccasen erfolgte anhand eines standardisierten Verfahrens (Abb. 2). Es wurde anhand von verschiedenen Ligninmodellsubstanzen, die für phenolische und nicht-phenolische Komponenten des Lignins stehen, die Reaktivität der technischen und der selbstproduzierten Laccasen analysiert (Kinetik). Zudem wurden wichtige Prozessparameter wie bspw. Temperatur, pH-Wert und Inkubationszeit determiniert. Anschliessend wurden diverse Mediatoren getestet und selektiert.

Aufgrund des heterogenen Aufbaus von Lignin ist es in der Forschung üblich, dieses durch Ligninmodellsubstanzen für eine Vielzahl von Versuchen zu ersetzen. Der strukturelle Aufbau dieser Modellsubstanzen ist bekannt, so dass chemische Reaktionen besser kontrolliert und interpretiert werden können, als es mit natürlichem Lignin möglich wäre. Bei den Ligninmodellsubstanzen wurde nach 0, 5, 10, 30 und 24h Minuten ein Scan über einen Wellenlängenbereich von 200 – 900 nm durchgeführt. Zusätzlich wurde die Michaelis-Menten-Konstante für die Substanzen Guaiacol und Syringol bestimmt. Für die Berechnungen wurden folgende molare Extinktionskoeffizienten verwendet: $\epsilon_{456}=27.5\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{468}=27.5\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Heinfling *et al.*, 1998). V_{MAX} wurde aus arithmetischer Mittelbildung der 3 höchsten spezifischen katalytischen Aktivitäten hergeleitet. Durch logarithmische Regression wurde der KM-Wert bestimmt.

Neben Reaktionen mit Ligninmodellspezies wurde auch direkt mit Holz gearbeitet um mögliche Oxidationsprodukte zu detektieren. Laccase bzw. Laccase in Verbindung mit Mediator reagiert mit Holz und die Reaktionsprodukte wurden bei 237 nm (Vivekanand *et al.*, 2008) bzw. deren phenolische Hydroxylgruppen bei 280 nm (Müller *et al.*, 2009) photometrisch detektiert. Eine erhöhte Extinktion in diesen Wellenlängen ließe somit auf eine Reaktion zwischen Holz und Laccase schließen.

Für die Ermittlung des pH-Optimums erfolgte eine Laccaseaktivitätsmessung zwischen pH-Werten von 1 bis 6,5. Der pH Wert wurde schrittweise um 0,5 erhöht. Für die Ermittlung des Temperaturoptimums von Laccasen wurden diese auf Temperaturen zwischen 30°C und 80°C, schrittweise um 10°C, in einem Wasserbad erwärmt. Nachdem die Laccase die entsprechende Temperatur erreichte, erfolgte die Laccaseaktivitätsmessung. Die Temperaturstabilität beschreibt wie sich die Aktivität des Enzyms bei bestimmten Temperaturen über einen längeren Zeitraum verhält. Dazu wurde das Enzym auf dieselben Temperaturen wie bei der Ermittlung des Temperaturoptimums erwärmt und Aktivitätsmessungen nach 5, 10, 20, 30, 40, 50 Minuten sowie nach 1 Stunde durchgeführt.

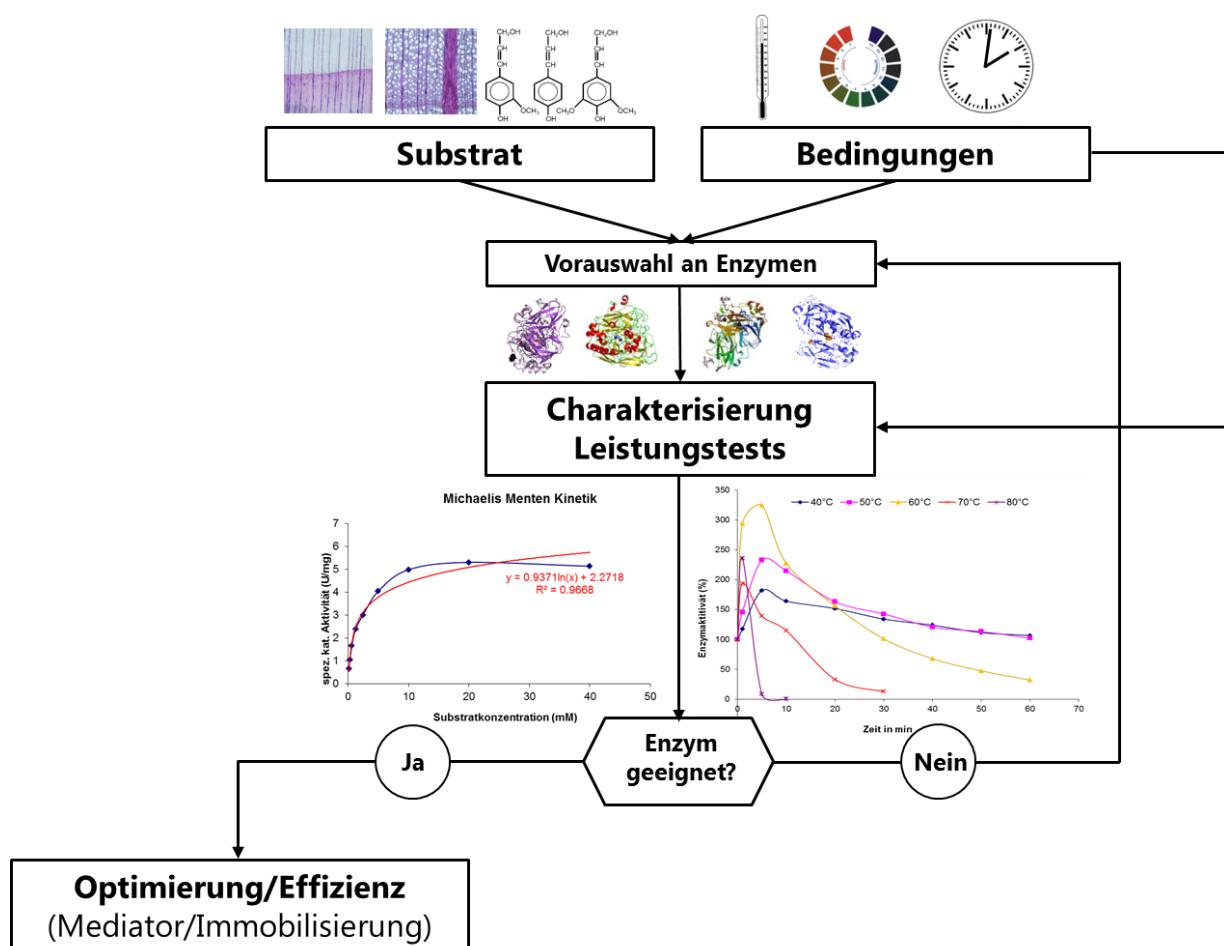


Abbildung 2: Standardisierte Charakterisierung von Laccasen. Mit Hilfe dieser Vorgehensweise war es möglich für die Behandlung von Buchen und Lärchenholz ein geeignetes System zu identifizieren.

Anknüpfend an den Versuch mit den Ligninmodellsubstanzen wurde ein Mediatorenscreening durchgeführt. Untersucht wurde, welchen Einfluss synthetische und natürliche Mediatoren auf die Oxidation der Färbemittel Reactive Black 5, Azure B und Acid Orange 74 haben. Der Anteil des Mediators am Volumen der Küvette entsprach bei Leer- und Messwert 10 % (100 µl). Die Mediatorkonzentration betrug zunächst 50 µM. Zeigte sich bei dieser Konzentration eine Wirkung des Mediators, wurde die Konzentration auf 5 µM heruntergesetzt.

2.2 Laccase-katalysierte Holz-Oberflächen-Funktionalisierung

Die Laccase-katalysierten Holz-Oberflächen-Funktionalisierung beinhaltet die Bindung von Ankermolekülen an die Oberfläche (Abb. 3), welche diese dauerhaft aktiviert und so eine spätere Reaktion mit den gewünschten Klebstoffen ermöglicht und somit zu einer verbesserten Holz-Klebstoff-Interaktion führen soll.

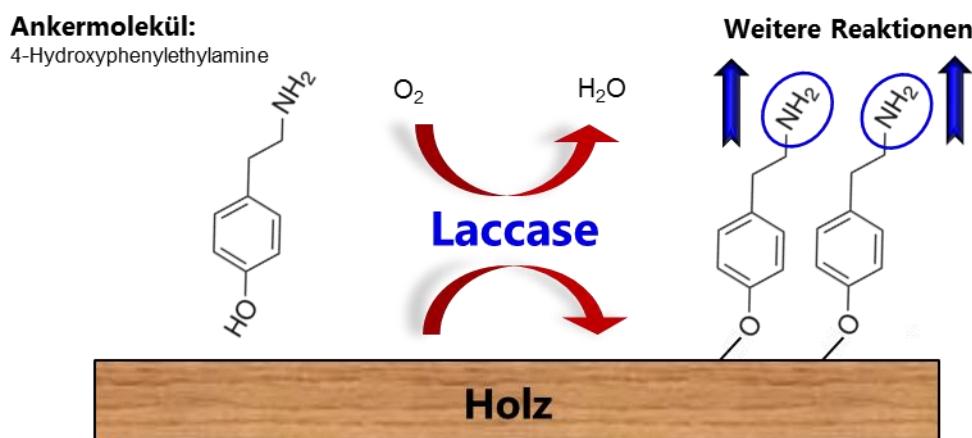


Abbildung 3: Laccase-katalysierte Funktionalisierung der Holzoberfläche durch kovalente Bindung phenolischer Amine (Ankermoleküle) ans Lignin. Die freien funktionellen Gruppen können weitere Bindungen mit anderen Molekülen/Substanzen eingehen.

2.2.1 Applikation

Verwendete Holzarten

Für die Herstellung der Prüfkörper wurden Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) und Lärche (*Larix decidua* Mill.) verwendet. Eine Sortierung des Holzes erfolgte nach den Kriterien Faserverlauf, Rotkern und Holzfehlern. Nach dem Sortiervorgang wurden die Prüfbretter, für die jeweiligen Oberflächenbearbeitungen so aufgeteilt, dass es zu einer guten Durchmischung kam, um einen Einfluss der Lage im Stamm auf das Prüfergebnis der

mechanischen Festigkeiten ausschließen zu können. Für jedes Bearbeitungsverfahren wurden vier Prüfbretter entsprechend der Norm DIN EN 302-1 hergestellt und im Normklima [20°C/65% rel. LF] konditioniert.

Folgende Oberflächenbearbeitungsverfahren wurden eingesetzt:

- Hobeln
- HMR-Primer
- Laccase
- Laccase + Ankermolekül

Das mechanische Bearbeiten der Fügeteiloberfläche erfolgt nach gängiger Praxis. Der HMR-Primer wurde nach der Beschreibung von Lopez-Suevos und Richter (2009) verwendet.

Die Laccase katalysierte Holz-Oberflächen-Funktionalisierung erfolgte in Anlehnung an Kudanga *et al.* (2008) mit leichten Veränderungen. Die Prüfproben wurden mit einer Reaktionslösung (pH 4,5, Laccase [10U/ml], ggf. Acetosyringone [Mediator 10µM] und Ankermolekül [1,7mM]) behandelt. Folgende phenolische Amine kamen zur Anwendung: A1=4-Hydroxy-phenylethylamin; A2=3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-DL-alanine). Die Versuchspröben für die mechanische Prüfung wurden mit der Reaktionslösung bestrichen (gesättigter Auftrag). Um den Einfluss der mechanischen Beanspruchung der Holzoberfläche durch das Streichen auszuschliessen, wurden zusätzlich Proben in der Reaktionslösung getaucht (2h) und analysiert (Kapitel 2.4). Folgende Varianten wurden in die Untersuchungen einbezogen:

- Unbehandelt: natives Buchen und Lärchenholz
- Kontrolle: Proben wurden mit dest. H₂O behandelt (Tauchen)
- Lac: Proben wurden nur mit Laccase behandelt (Streichen/Tauchen)
- Lac-A1/2: Proben wurden mit Laccase und Ankermolekül (A1 oder A2) behandelt (Streichen/Tauchen)

2.3 Mechanische Prüfung

2.3.1 Verklebung

Zum Verkleben der Fügeteile wurde ein Klebstoff der Firma PURBOND® verwendet. PURBOND® Klebstoffe sind nach EN 301 / EN 302, DIN 68141, EN 15425 / EN 15416 und EN 14080, Annex C geprüft, als Typ I Klebstoffe klassifiziert und auf nationaler Ebene zur Herstellung von tragenden Holzbauteilen nach EN 14080 und EN 386 (Brettschichtholz) und EN 385 (Keilzinkenverbindungen in Bauholz) zugelassen. PURBOND HB-Klebstoffe sind für die Verklebung von tragenden Holzbauteilen nach DIN 1052 und Eurocode 5 zugelassen.“ (<http://www.purbond.com/purbond/Europa/DE/Zulassungen/>)

Zum Einsatz kam auf Empfehlung des Klebstoffherstellers der Klebstoff PURBOND® HB S309 mit einer offenen Zeit von 30 Minuten und einer Aushärtungszeit von 75 Minuten. PURBOND® HB S309 ist ein gelblich brauner Klebstoff der fast geruchlos ist und einen Isocyanatanteil von 10%-20% besitzt.

Nach den jeweiligen Holzoberflächenbehandlungen erfolgte die Pressung. Der Klebstoffauftrag für Buche und Lärche entsprach 140 g/m². Für die Prüfbretter von Buche wurde ein Pressdruck von 0,8 N/mm² und für Lärche 0,7 N/mm² bei einer Presszeit von mindestens 2h für Buche und 4h für Lärche verwendet.

2.3.2 Zugscherfestigkeit

Für die Zugscherfestigkeitsprüfung wurden die Prüfkörper aus den fertig gepressten Prüfbrettern wie in Abbildung 4 geschnitten und für weitere 4 Tage konditioniert.

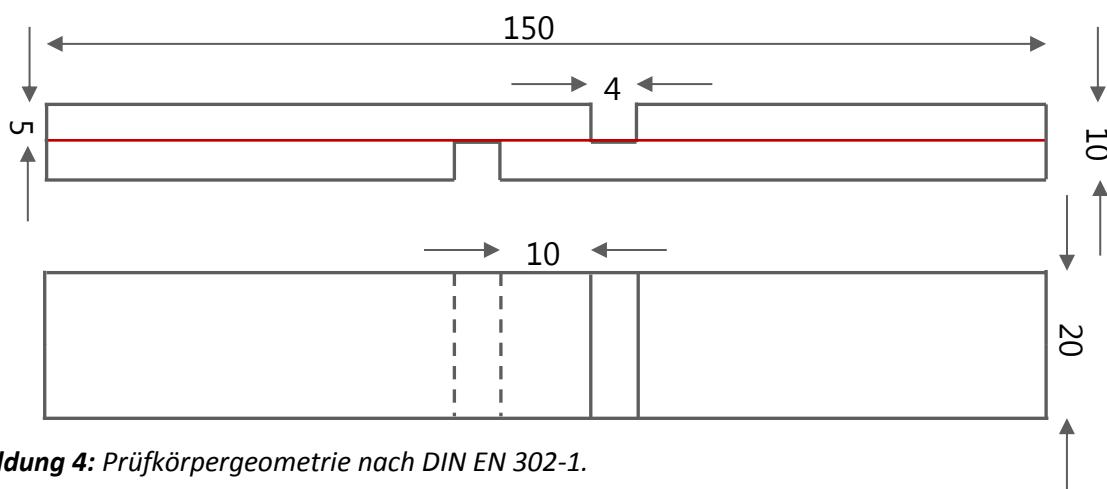


Abbildung 4: Prüfkörpergeometrie nach DIN EN 302-1.

Für die Prüfung wurde eine Universalprüfmaschine der Firma Zwick/Roell verwendet. Die Prüfkörper wurden so eingespannt, dass der Schwerpunkt des Prüfkörperquerschnitts in der Kraftachse der Maschine liegt. Die eingespannten Prüfkörper wurden mit einer Kraft von 20 N vorbelastet. Die Vorschubgeschwindigkeit betrug für alle Prüfkörper und Lagerfolgen 1 mm/min. Als Bruchkriterium wurde ein Kraftabfall von 50% der maximalen Kraft angenommen. Nach dem Bruch wurde die Zugscherfestigkeit anhand folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Zugscherfestigkeit} = \frac{\text{Bruchkraft}}{\text{Scherfläche}} \left[\frac{\text{N}}{\text{mm}^2} \right]$$

Die Zugscherfestigkeit wurde nach DIN EN 302-1 in zwei verschiedenen Lagerfolgen (A1 und A4) geprüft. Die verschiedenen Behandlungen der einzelnen Lagerfolgen sind in Tabelle 1

aufgelistet. Die Beurteilung des Holzbruchanteils erfolgte normgemäß visuell nach der Prüfung und wurde auf 10% Genauigkeit geschätzt.

Tabelle 1: Lagerfolgen mit unterschiedlichen Behandlungen

| Lagerfolge | Behandlung |
|------------|--|
| A1 | Mindestens 7 Tage Lagerung im Klima [20°C/65 rel. LF] |
| A4 | 6 Stunden Lagerung in kochendem Wasser 2 Stunden Lagerung im kalten Wasser (20 ± 5°C) Prüfung erfolgt dann im nassen Zustand |

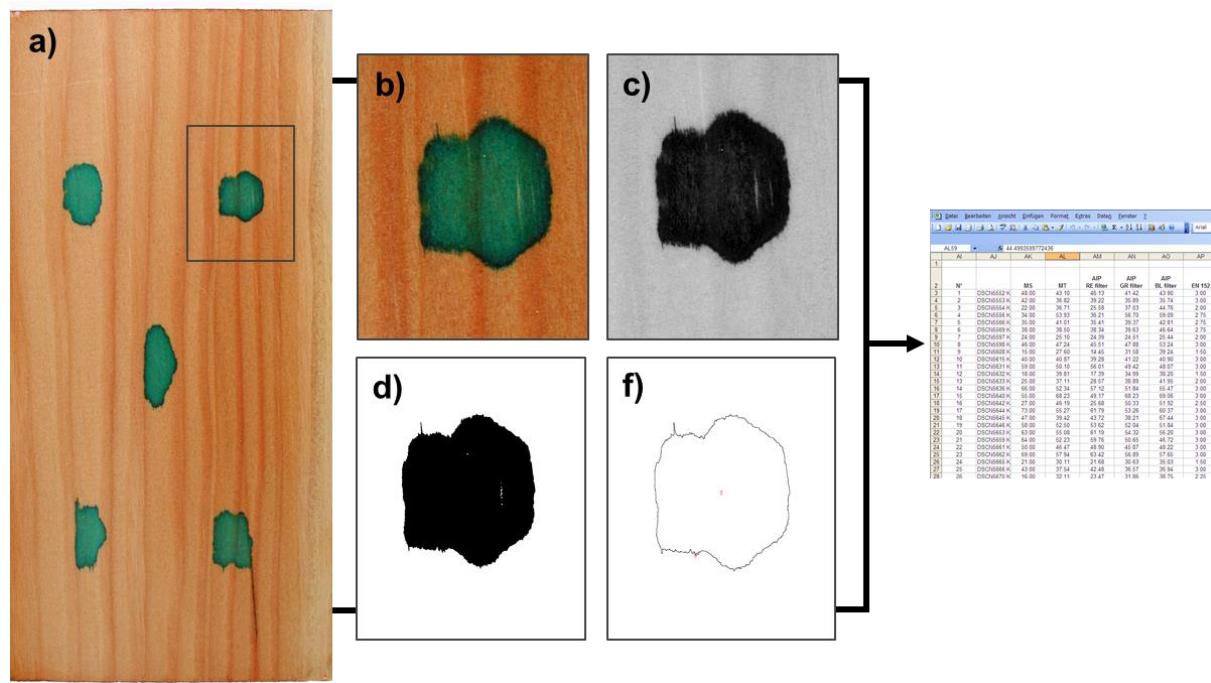
2.4 Oberflächenanalytik

2.4.1 Benetzungsverhalten Holzoberfläche

Das Benetzungsverhalten einer Holzoberfläche wird als Indikator für die Filmbildung und das Eindringen von Beschichtungs- und Klebstoffen angesehen. Das Benetzungsverhalten wurde in Anlehnung an Arnold *et al.* (2008) im vorliegenden Projekt anhand des Kontaktwinkels zwischen Oberfläche und einem aufgebrachten Tropfen sowie anhand der Verlaufsform des Tropfens auf der Holzoberfläche charakterisiert.

Die Kontaktwinkelmessung erfolgte nach der Sessile-Drop-Methode an kleinen Tropfen, welche mittels Dosierspritze auf die Oberfläche aufgetragen und mit einer Videokamera während einer definierten Messzeit gefilmt wurden (dataphysics SCA 20). Die optischen Daten wurden mit der integrierten Software ausgewertet, wobei zur Tropfenkonturerkennung das Ellipsen-Fitting gewählt wurde. An jeweils 3-5 Tropfen pro Probe wurde so der Verlauf des Kontaktwinkels für Wasser über eine Messzeit von 60s erfasst. Für die weitere Auswertung wurde der Kontaktwinkel nach 5s und 30s verwendet.

Als weiteres Kriterium für das Benetzungsverhalten der Holzoberfläche wurde das Ausbreitungsverhalten anhand der Form von (teilweise auch eingedrungenen) Tropfen erfasst. Hierzu wurden 5 Tropfen je 12,5 µl (Wasser gefärbt mit Neolan Glaucin) auf die Holzoberfläche aufgebracht und nach vollständiger Trocknung wurde die Tropfenform (Formfaktor) und die Fläche (mm²) der Tropfen fotografiert und in Anlehnung an Schubert *et al.* (2011) bildanalytisch ausgemessen (Abb. 5).



Je drei Messungen pro Holzprobe wurden durchgeführt. Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit der Spektren untereinander wurden diese entweder über den zu vergleichenden Bereich oder über den gesamten Bereich des Spektrums vektornormiert. Dazu wird ein Spektrum als Vektor angesehen, dessen Koordinaten durch die Datenpunkte im betrachteten Spektralbereich gebildet werden. Bei einer Vektornormierung wird jede Koordinate y_i (Absorptionswert) des Vektors durch seinen Betrag dividiert:

$$x_i = \frac{y_i}{\sqrt{\sum_{j=1}^n (y_j)^2}}$$

Damit ist die Summe der Quadrate aller normierten Funktionswerte $\sum x_i^2 = 1$ (Euklidische Norm):

$$\sum_{i=1}^n (x_i)^2 = 1$$

In den Tabellen 2 und 3 sind die Banden aufgelistet, welche für die Analyse berücksichtigt wurden (Fengel & Wegener, 2003). Zusätzlich wurden Absorptionswerte von Lignin Banden durch die Werte von (Hemi-) Cellulose Banden dividiert.

Tabelle 2: (Hemi-) Cellulose Banden

| Wellenlänge cm ⁻¹ | Zuordnung |
|------------------------------|---|
| 1733 | unkonjugierte C=O Valenzschwingungen in Hemicellulose |
| 1367 | C-H Deformationsschwingungen in Cellulose und Hemicellulose |
| 1157 | C-O-C Vibration in Cellulose und Hemicellulose |
| 1085 | OH- in Hemicellulose und Hemicellulose |
| 898 | C-O-Deformationschwingungen in Cellulose |

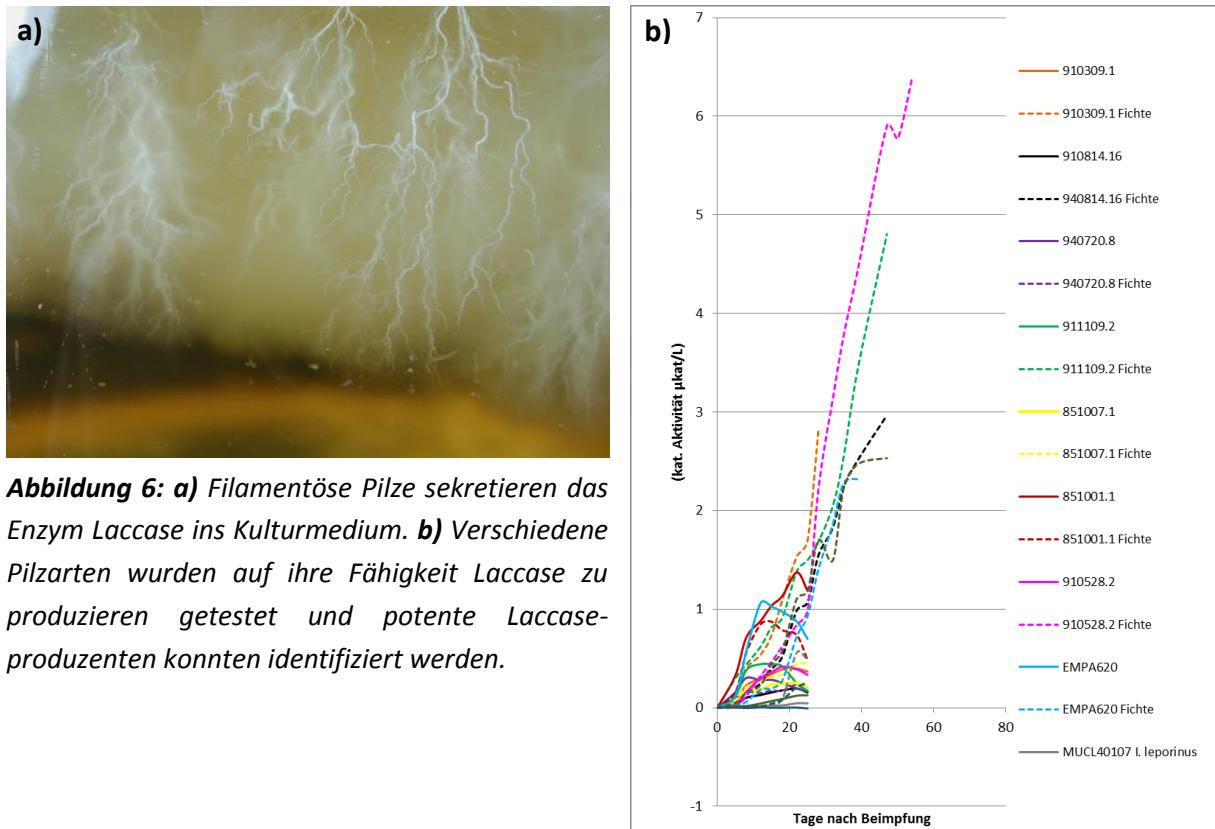
Tabelle 3: Lignin Banden

| Wellenlänge cm ⁻¹ | Zuordnung |
|------------------------------|---|
| 1646 | konjugierte Carbonylgruppen (C=O in Lignin) |
| 1596 | aromatische Ringschwingungen |
| 1510 | aromatische Ringschwingungen, in Guajacyl-Lignin stärker als in Syringyl-Lignin |
| 1464 | C-H Deformationsschwingungen |
| 1423 | aromatische Ringschwingungen kombiniert mit C-H Valenzschwingungen |
| 1326 | C-O-Valenzschwingungen |
| 1269 | Guajacyl-Einheiten und C=O-Valenzschwingungen |

3 Ergebnisse

3.1 Laccasen

Aufbauend auf den Studien von Ihssen *et al.* (2011) wurden Laccasen mit Hilfe eines einfachen, auf günstig verfügbaren Materialien basierenden Kultivierungsverfahren (Erlenmeyerkolben und Bioreaktor) hergestellt. Der in der Arbeit von Ihssen *et al.* (2011) beschriebene *Heterobasidion annosum* Stamm 620 diente in diesen Studien als Benchmark. Ein Vergleich mit weiteren Stämmen von *H. annosum* zeigte, dass insbesondere der Stamm 910528.2 auf Fichtensägemehl ein vielversprechender Laccaseproduzent ist (Abb. 6b)



Im Folgenden werden anhand der Laccasen *Trametes versicolor* [Tve] (Sigma Aldrich) und *Myceliophthora thermophila* [Mth] (Novozymes) die Ergebnisse der Enzymcharakterisierung besprochen. In Tabelle 4 ist das Oxidationspotential der beiden Laccasen gegenüber diversen Substraten (Ligninmodellsubstanzen) dargestellt.

Tabelle 4: Aktivität gegenüber diversen Substraten (Reaktion: pH 4,5 und 24h)

| Substanz | Mth | Tve |
|---|-----|-----|
| 2-Methoxyphenol | + | + |
| 2,6-Dimethoxyphenol | + | + |
| 3,4-Dimethoxybenzylalkohol | - | - |
| 1,2-Benzenediol | + | + |
| 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde | - | - |
| 4-Hydroxyphenoxyacetic acid | - | +/- |
| 4-Hydroxy-3-methoxybenzylamin hydrochloride | - | - |
| 3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid | - | - |
| 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde azine | + | + |
| 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid | + | + |
| trans-4-Hydroxycinnamic acid | - | +/- |
| 2,5-Dimethyl aniline | + | + |
| 4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-cinnamic acid | + | + |
| trans-4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid | + | + |
| 2-(4-hydroxyphenyl)ethylamine | + | + |
| 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid | - | - |
| 3,4-Dihydroxy-DL-phenylalanine | +/- | +/- |
| N-Methylphenethylamine | +/- | +/- |
| 4 Hydroxybenzoic acid | - | - |
| 1,2,3-Trihydroxybenzene | + | + |

(+) = Oxidation, (-) = keine Oxidation, (+/-) = nicht eindeutig

Die Ergebnisse der pH-Optima und der Thermotoleranzen der Laccasen Tve und Mth sind in der Abbildung 7 illustriert.

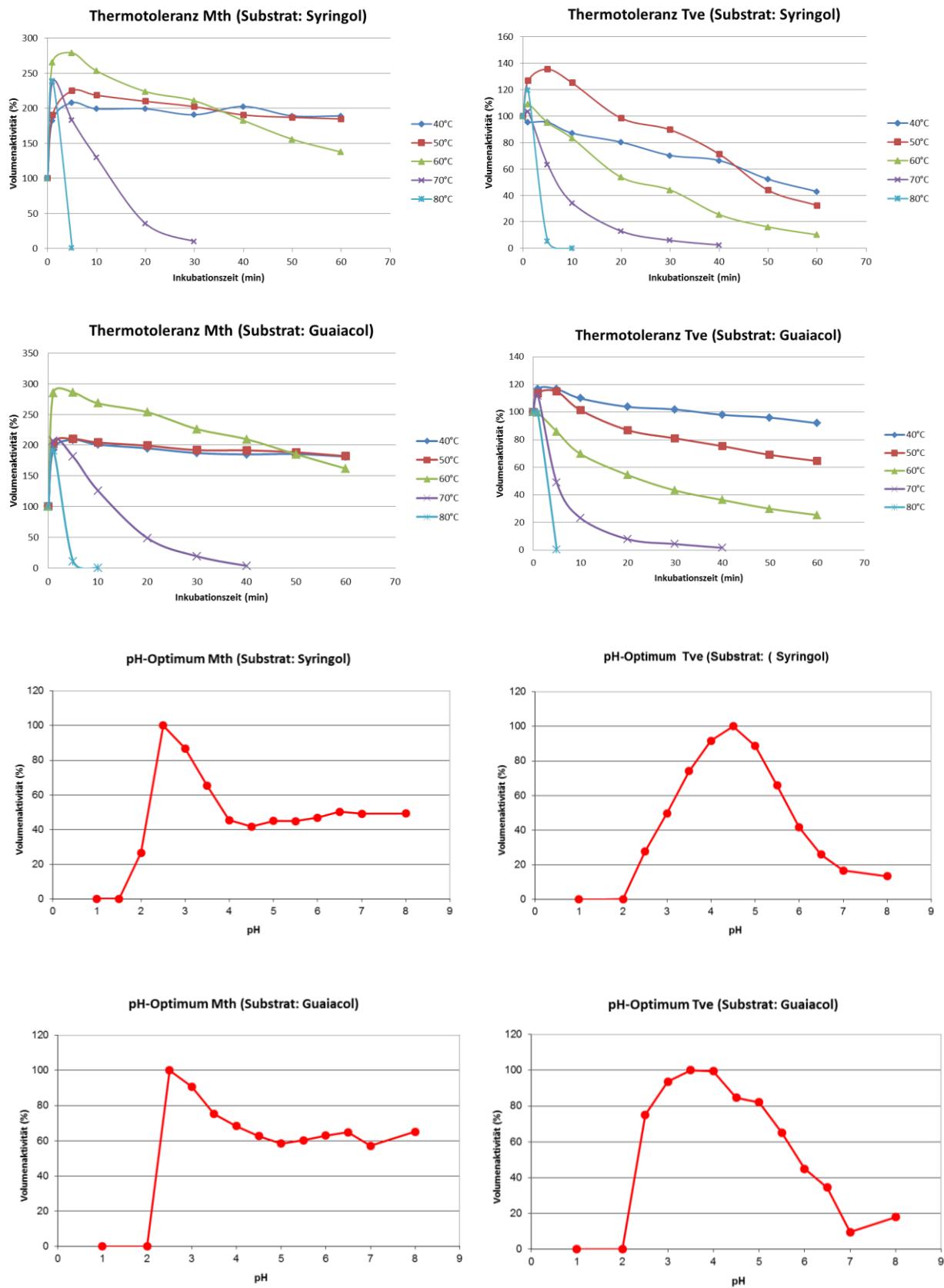


Abbildung 7: pH-Optimum und Thermotoleranz der Laccasen Tve und Mth.

Beurteilung

Verschiedene Pilzarten wurden auf ihre Fähigkeit Laccase zu produzieren getestet und vielversprechende Laccaseproduzenten konnten identifiziert werden. Insbesondere sekretierte der *H. annosum* Stamm 910528.2 auf Fichtensägemehl im Vergleich zu den anderen getesteten Pilzarten viel Laccase. Die Charakterisierung und Leistungstests diverser technischer und selbstproduzierter Laccasen erfolgte anhand eines standardisierten Verfahrens (Abb. 2). Dieses Vorgehen ermöglichte die Identifizierung eines geeigneten Systems für die Laccase-katalysierte Holzfunktionalisierung. Das Screening von diversen Substanzen zeigte, dass insbesondere Acetosyringone als Mediator die Reaktivität der Laccasen gegenüber verschiedenen Substraten erhöhen konnten. Zwar zeigte die Mth Laccase im Vergleich mit der Tve eine geringere Aktivität gegenüber den getesteten Ligninmodellsubstanzen, dennoch wurde für die nachfolgenden Studien aufgrund der höheren pH-Wert und Temperatur Toleranz die Mth Laccase (Novozymes) verwendet.

3.2 Mechanische Prüfung

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der Zugscherprüfung unbehandelter und funktionalisierter Proben. In EN 301 (2006) für tragende sowie EN 204 (2001) für nichttragende Holzbauteile wird bei Beanspruchung nach A1 eine mittlere Zugscherfestigkeit von 10 N/mm² gefordert. Ziel der Verklebung ist es, die Festigkeit des reinen Holzes zu überschreiten und dadurch eine maximale Sicherheit zu erreichen. Demzufolge ist ein vollständiger Holzbruch anzustreben. In den folgenden Abbildungen und Tabellen sind Zugscherfestigkeiten, Holzbruchanteil und die Ergebnisse der statistischen Auswertung dargestellt.

Tabelle 5: Zugscherfestigkeitsprüfung nach Din EN 302-1 (2004) n=10.

| Serie | Vorbehandlung | Holzart | Lagerungsfolge EN 302-1 | Zugscherfestigkeit [N/mm ²] | | Holzfaserbelag [%] | |
|-------|--------------------------|---------|----------------------------|---|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | | Mittelwert | Standardabweichung | Mittelwert | Standardabweichung |
| 1 | ohne | Buche | A1 | 13.2 | 1.08 | 100 | 0.0 |
| 2 | ohne | Buche | A2 | 6.9 | 0.46 | 8 | 15.5 |
| 3 | Laccase | Buche | A1 | 7.8 | 0.63 | 31 | 22.8 |
| 4 | Laccase | Buche | A2 | 2.5 | 0.63 | 0 | 0.0 |
| 5 | Laccase + Ankermolekül 1 | Buche | A1 | 8.5 | 0.70 | 29 | 29.2 |
| 6 | Laccase + Ankermolekül 1 | Buche | A2 | 2.7 | 0.51 | 0 | 0.0 |
| 7 | Laccase + Ankermolekül 2 | Buche | A1 | 9.1 | 0.79 | 18 | 14.0 |
| 8 | Laccase + Ankermolekül 2 | Buche | A2 | 0.9 | 0.23 | 0 | 0.0 |
| 9 | HMR-Primer | Buche | A1 | 12.2 | 0.76 | 100 | 0.0 |
| 10 | HMR-Primer | Buche | A2 | 8.4 | 0.70 | 100 | 0.0 |
| 11 | ohne | Lärche | A1 | 8.9 | 0.84 | 64 | 20.7 |
| 12 | ohne | Lärche | A2 | 4.1 | 0.42 | 0 | 0.0 |
| 13 | Laccase | Lärche | A1 | 6.5 | 0.66 | 11 | 8.8 |
| 14 | Laccase | Lärche | A2 | 1.3 | 0.49 | 0 | 0.0 |
| 15 | Laccase + Ankermolekül 1 | Lärche | A1 | 6.1 | 0.84 | 9 | 5.7 |
| 16 | Laccase + Ankermolekül 1 | Lärche | A2 | 1.6 | 0.51 | 0 | 0.0 |
| 17 | Laccase + Ankermolekül 2 | Lärche | A1 | 7.8 | 0.70 | 17 | 10.6 |
| 18 | Laccase + Ankermolekül 2 | Lärche | A2 | 1.6 | 0.47 | 0 | 0.0 |
| 19 | HMR-Primer | Lärche | A1 | 11.4 | 0.56 | 100 | 0.0 |
| 20 | HMR-Primer | Lärche | A2 | 7.0 | 0.50 | 91 | 11.0 |

Um die Ursache des Bruchs zu erklären, wurde der Holzbruchanteil in der Klebefuge bestimmt. Diese Beurteilung erfolgt durch eine visuelle Schätzung durch den Prüfenden auf 10% Genauigkeit. Der Bruch erfolgt entweder vollständig im Holz (Abb. 8a), direkt in oder an der Klebefuge (Abb. 8b) oder als Mischbruch, teilweise in der Klebefuge und teilweise im Holz (Abb. 8c).

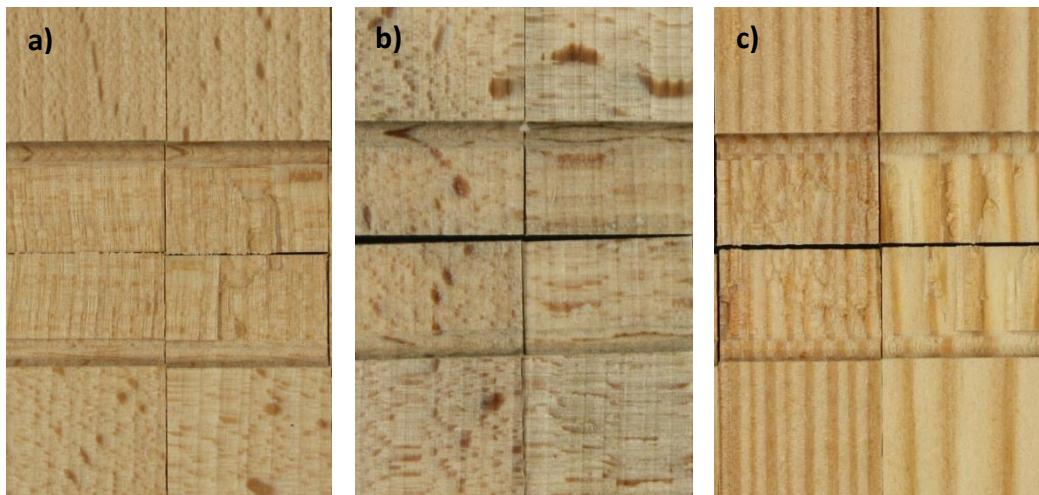


Abbildung 8: Varianten des Bruchbildes.

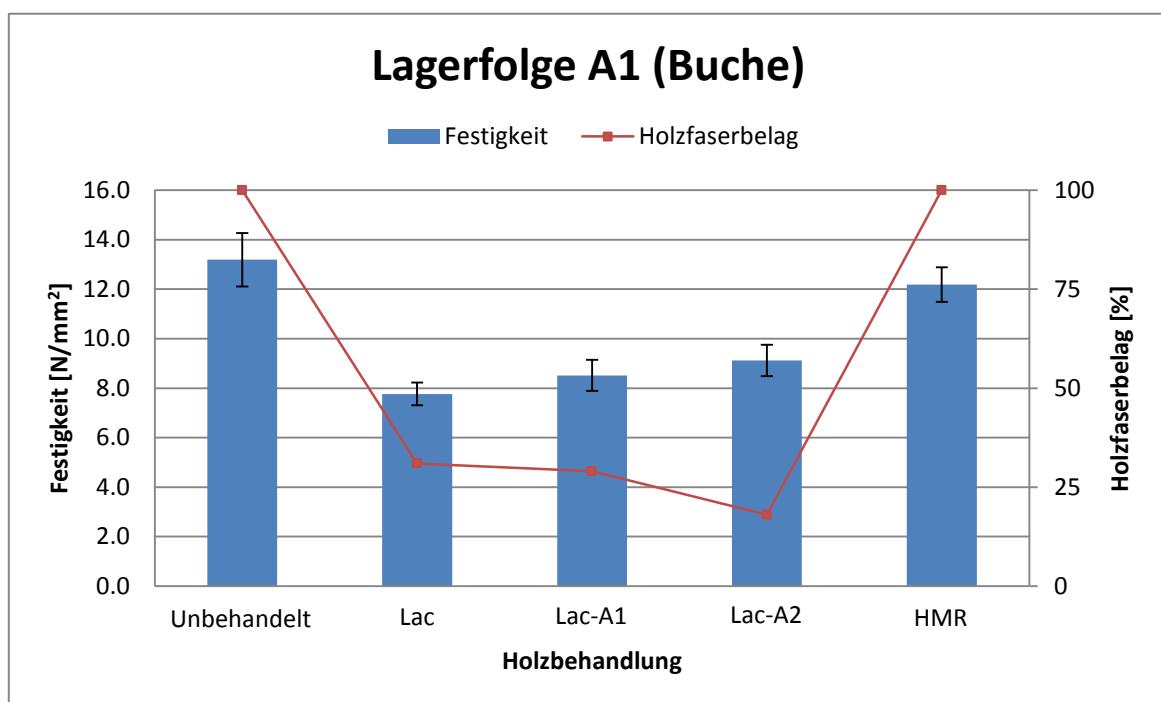


Abbildung 9: Zugscherfestigkeiten Buche.

Tabelle 6: Statistische Auswertung Zugscherfestigkeit Lagerfolge A1 (Buche)Tukey-HSD^a

| key | N | Untergruppe für Alpha = 0.05. | | |
|-------------|----|-------------------------------|--------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Lac | 10 | 7.7680 | | |
| Lac-A1 | 10 | 8.5170 | 8.5170 | |
| Lac-A2 | 10 | | 9.1190 | |
| HMR | 10 | | | 12.1850 |
| Unbehandelt | 10 | | | 13.1920 |
| Signifikanz | | .248 | .463 | .056 |

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

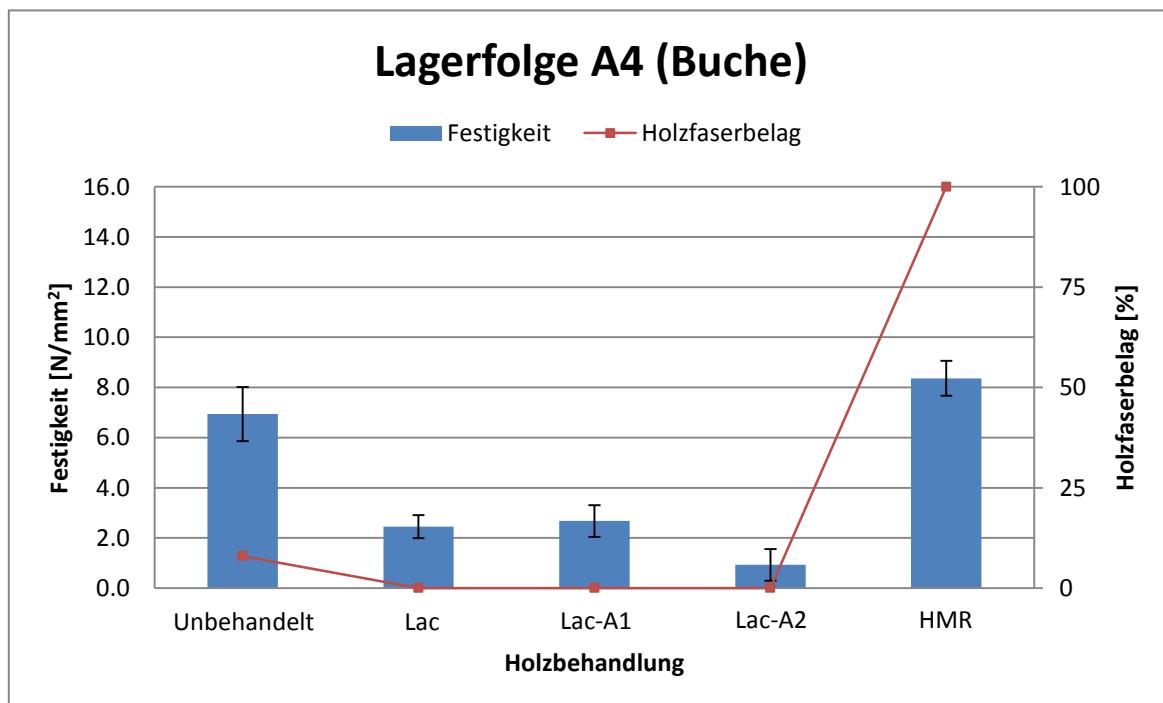
**Abbildung 10:** Zugscherfestigkeiten Buche.

Tabelle 7: Statistische Auswertung Zugscherfestigkeit Lagerfolge A4 (Buche)Tukey-HSD^a

| key | N | Untergruppe für Alpha = 0.05. | | | |
|-------------|----|-------------------------------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Lac-A2 | 10 | .9250 | | | |
| Lac | 10 | | 2.4510 | | |
| Lac-A1 | 10 | | | 2.6760 | |
| Unbehandelt | 10 | | | | 6.9390 |
| HMR | 10 | | | | 8.3650 |
| Signifikanz | | 1.000 | .878 | 1.000 | 1.000 |

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

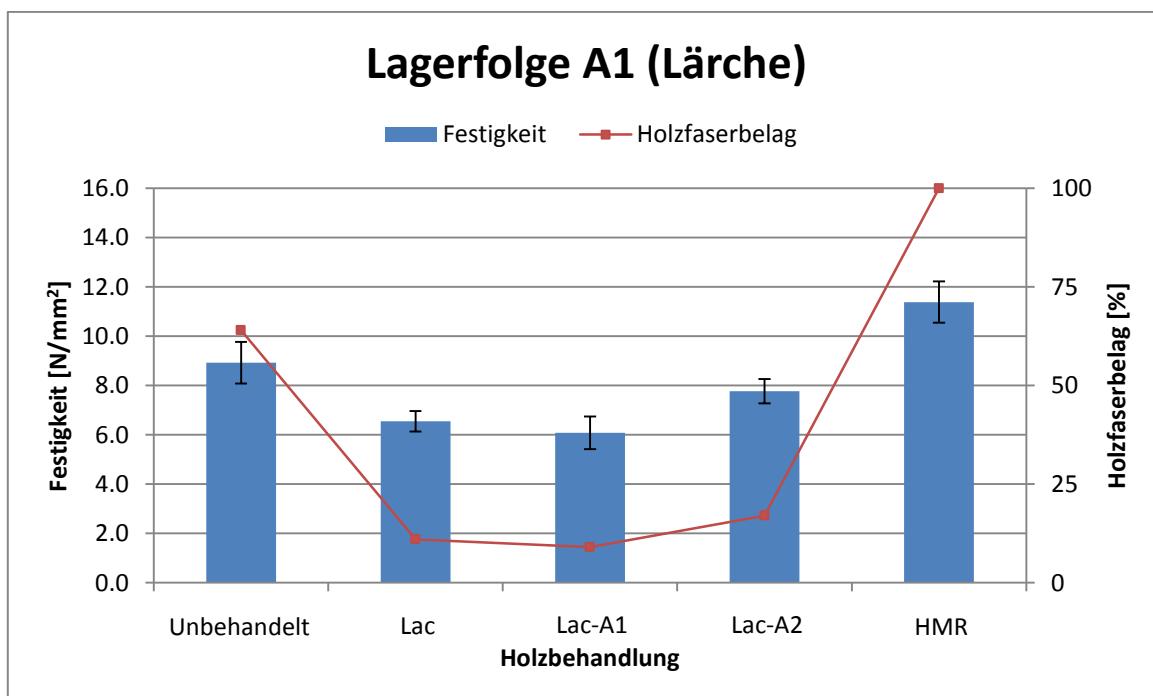
**Abbildung 11: Zugscherfestigkeiten Lärche.**

Tabelle 8: Statistische Auswertung Zugscherfestigkeit Lagerfolge A1 (Lärche)Tukey-HSD^a

| key | N | Untergruppe für Alpha = 0.05. | | | |
|-------------|----|-------------------------------|--------|--------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Lac-A1 | 10 | 6.0800 | | | |
| Lac | 10 | 6.5470 | | | |
| Lac-A2 | 10 | | 7.7710 | | |
| Unbehandelt | 10 | | | 8.9290 | |
| HMR | 10 | | | | 11.3860 |
| Signifikanz | | .609 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

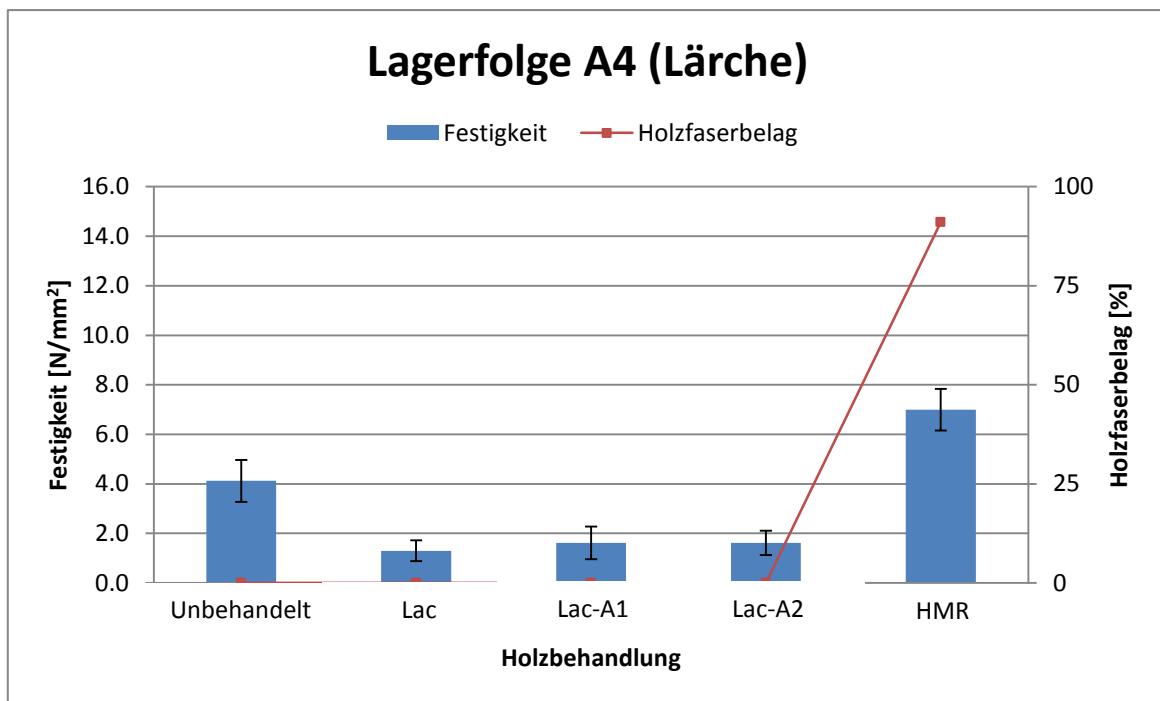
**Abbildung 12:** Zugscherfestigkeiten Lärche.

Tabelle 9: Statistische Auswertung Zugscherfestigkeit Lagerfolge A4 (Lärche)Tukey-HSD^a

| key | N | Untergruppe für Alpha = 0.05. | | |
|-------------|----|-------------------------------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Lac | 10 | 1.2990 | | |
| Lac-A2 | 10 | 1.6150 | | |
| Lac-A1 | 10 | 1.6190 | | |
| Unbehandelt | 10 | | 4.1210 | |
| HMR | 10 | | | 6.9890 |
| Signifikanz | | .574 | 1.000 | 1.000 |

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

Beurteilung

Die Zugscherfestigkeiten für die Baumarten Buche und Lärche im Normalklima sind 13,2 und 8,9 N/mm². Die Adhäsion zwischen Klebstoff und Fügeteil ist ein komplexes Zusammenspiel von Holz, Oberflächenbearbeitung, Klebstoff, Auftrag und Einsatzbedingungen. In allen Gruppen zeigt sich, dass bei Lagerfolge A4 die Zugscherfestigkeit gegenüber Lagerfolge A1 abnimmt. Gründe für die niedrige Zugscherfestigkeit bei A4 sind im Klebstoff, Holz und Verbund zu finden: Durch die Lagerung im Wasser erhöht sich die Holzfeuchte, das Holz quillt und es entstehen Eigenspannungen im Holz-Klebstoffverbund, die Zugspannungen in der Klebfuge verursachen, welche sich dann bei der Prüfung überlagern.

Die Verklebungsgüte konnte weder bei Buche noch bei Lärche durch die Laccase-Behandlungen verbessert werden, sie wurde sogar meistens negativ beeinflusst. Die Zugscherfestigkeit und der Holzbruchanteil konnten auch durch die Verwendung der Ankermoleküle A1 und A2 nicht erhöht werden. Isocyanate sind chemisch sehr reaktiv und reagieren mit allen beweglichen Wasserstoffatomen. Das angestrebte Ziel ist es mit der Hydroxylgruppe des Fügeteils zu reagieren, um eine kovalente Bindung auszubilden. Ein Grund für die schlechte Verklebungsgüte kann sein, dass die Holzfunktionalisierung unzureichend war. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Holzfunktionalisierung zwar erfolgreich war, aber zum einen die freien Hydroxylgruppen im Holz reduziert wurden bzw. die chemische Reaktion der funktionellen Aminogruppen der Ankermoleküle mit dem Klebstoff zu einem Kohäsionsversagen geführt hat. Um dies zu untersuchen wurden weitere Arbeiten (Oberflächenanalytik) durchgeführt. Die Ergebnisse des HMR-Primers zeigen, dass ein Einsatz die Festigkeit sowohl bei Buche als auch Lärche erhöht und für einen höheren Holzbruchanteil sorgt. Insbesondere wird die verbesserte Verklebungsgüte nach der Lagerfolge A4 deutlich.

3.3 Oberflächenanalytik

3.3.1 Benetzungsverhalten

Der Einfluss der unterschiedlichen Holz-Oberflächen-Funktionalisierungen auf das Benetzungsverhalten der Holzoberflächen bezüglich Kontaktwinkel an Wasser geht aus den Bildern 14-16 hervor. Zur Interpretation des Kontaktwinkels: Bei einer Messung an Wassertropfen bezeichnet man bei geringen Kontaktwinkeln ($<90^\circ$) eine Oberfläche als hydrophil, bei Winkeln $>90^\circ$ als hydrophob (wasserabweisend). Für die detaillierte Auswertung wird als Kennwert der Kontaktwinkel nach 30s nach der Tropfenbeaufschlagung verwendet, weil dieser Wert für alle Oberflächen und Testflüssigkeiten verfügbar ist.

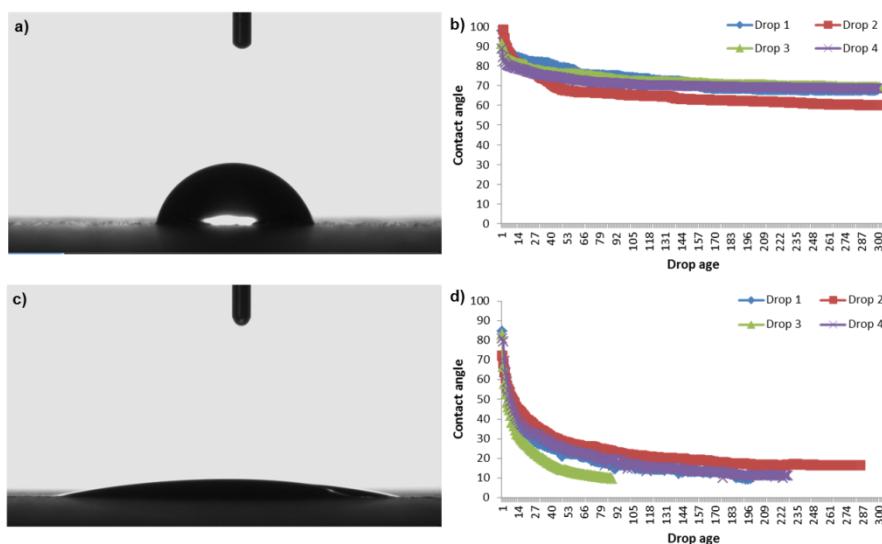


Abbildung 13: Verlauf des Kontaktwinkels an einem Wassertropfen bei verschiedenen Behandlungsvarianten während 60s nach Beaufschlagung. **a)** Lärche unbehandelt. **b)** Lärche nach Oberflächenbehandlung mit A1.

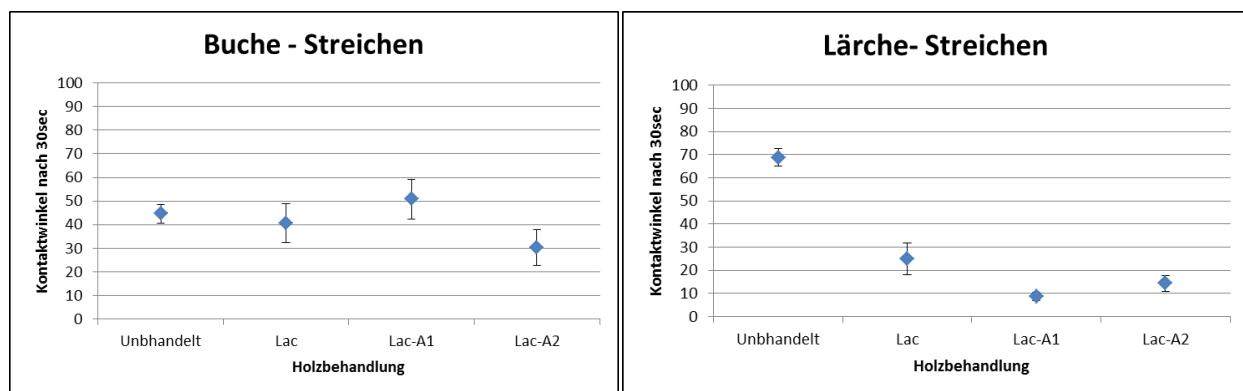


Abbildung 14: Mittelwert und Streuung des Kontaktwinkels an Wasser-Tropfen bei den unterschiedlichen Holzbehandlungsvarianten nach der Applikationsart Streichen und der entsprechenden statischen Auswertung.

Tabelle 10: Statistische Auswertung Kontaktwinkel nach 30sec.Tukey-HSD^{a,b} Buche - Streichen

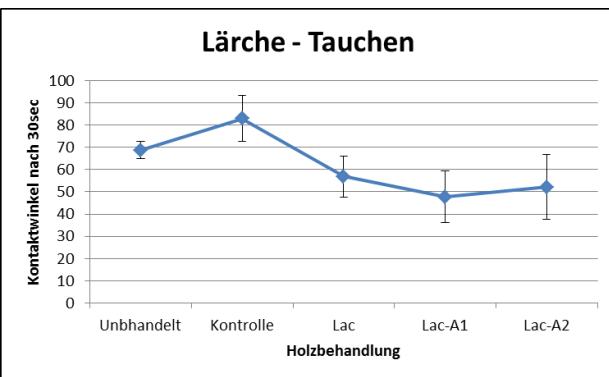
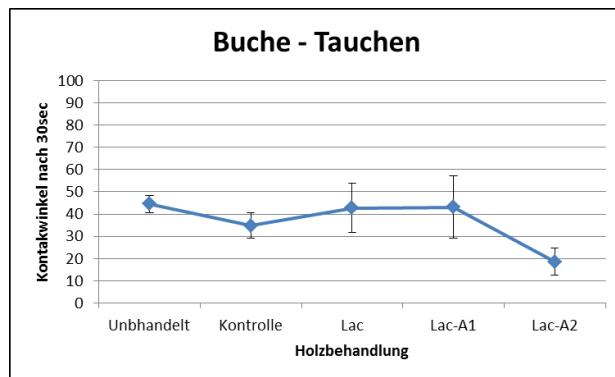
| key | N | Untergruppe für Alpha = 0.05. | |
|-------------|---|-------------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| Lac-A2 | 5 | 30.2100 | |
| Lac | 4 | 40.4900 | 40.4900 |
| Unbehandelt | 4 | | 44.5950 |
| Lac-A1 | 5 | | 50.8400 |
| Signifikanz | | .203 | .199 |

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

Tukey-HSD^a Lärche - Streichen

| key | N | Untergruppe für Alpha = 0.05. | | |
|-------------|---|-------------------------------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Lac-A1 | 5 | 8.6780 | | |
| Lac-A2 | 5 | 14.3840 | 14.3840 | |
| Lac | 5 | | 22.9620 | |
| Unbehandelt | 5 | | | 66.4780 |
| Signifikanz | | .325 | .074 | 1.000 |

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

**Abbildung 15:** Mittelwert und Streuung des Kontaktwinkels an Wasser-Tropfen bei den unterschiedlichen Holzbehandlungsvarianten nach der Applikationsart Tauchen und der entsprechenden statischen Auswertung.**Tabelle 11:** Statistische Auswertung Kontaktwinkel nach 30sec.Tukey-HSD^a Buche - Tauchen

| key | N | Untergruppe für Alpha = 0.05. | |
|-------------|---|-------------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| Lac-A2 | 4 | 18.4975 | |
| Kontrolle | 4 | 34.8250 | 34.8250 |
| Lac-A1 | 4 | | 43.0775 |
| Lac | 4 | | 44.1700 |
| Unbehandelt | 4 | | 44.5950 |
| Signifikanz | | .149 | .589 |

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

Tukey-HSD^a Lärche - Tauchen

| key | N | Untergruppe für Alpha = 0.05. | |
|-------------|---|-------------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| Lac-A1 | 4 | 47.6900 | |
| Lac-A2 | 4 | 52.1800 | |
| Lac | 4 | 59.6700 | |
| Unbehandelt | 4 | 68.7375 | 68.7375 |
| Kontrolle | 4 | | 82.9700 |
| Signifikanz | | .072 | .333 |

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

Als weiteren Aspekt der Benetzbarkeit der Holzoberflächen diente die Fläche (mm^2) von getrockneten Tropfen, welche fotografiert und bildanalytisch analysiert wurden (Abb. 5). Die statistischen Mittelwertsvergleiche sind in der Abbildung 16 ersichtlich. Zusätzlich wurde noch der Formfaktor (Tropfenlänge/Tropfenbreite) berechnet (Arnold *et al.* 2010).

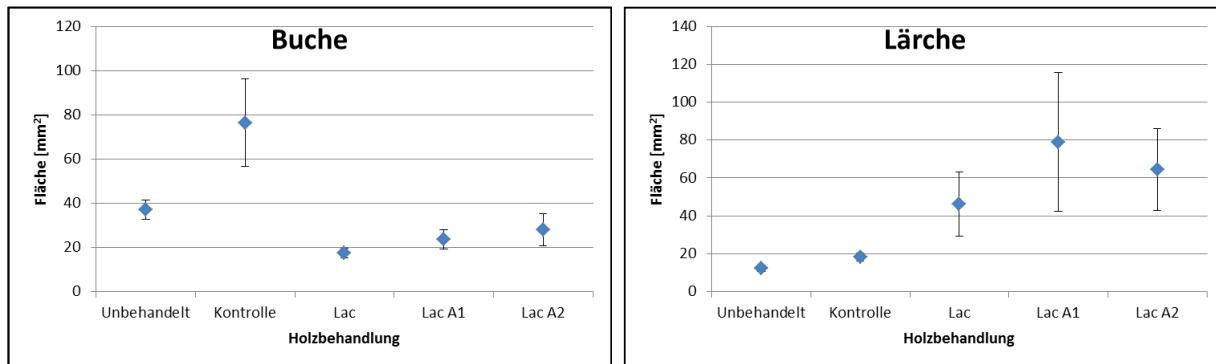


Abbildung 16: Tropfenfläche (mm^2) nach vollständiger Spreitung und Trocknung.

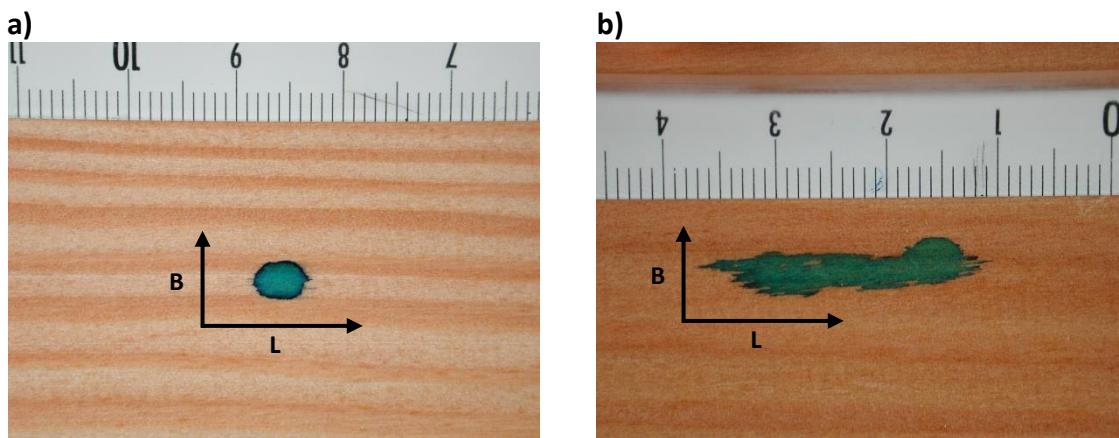


Abbildung 17: Tropfenform (Länge L und Breite B) nach vollständiger Spreitung und Trocknung. **a)** Lärche unbehandelt. **b)** Lärche mit A1.

Beurteilung

Bereits aus dem Verlauf des Kontaktwinkels an einem Wassertropfen über eine Beobachtungszeit von 60s sind Unterschiede zwischen den Behandlungsvarianten zu erkennen (Abb. 13). Das native Lärchenholz wies höhere Kontaktwinkel (schlechtere Benetzbarkeit) auf, als das native Buchenholz. Die mit Laccase (+Ankermolekül) behandelten (bestrichenen) Buchen Holz-Oberflächen liessen nur kleine Unterschiede im Vergleich mit der unbehandelten Buchenprobe in der Benetzbarkeit erkennen. Die Behandlung mit Lac-A2 bewirkte eine signifikante verbesserte Benetzbarkeit der Buchenholzoberfläche (kleinerer Kontaktwinkel; Abb. 14, Tab. 10). Die behandelten Lärchenproben zeigten deutliche

Unterschiede in der Benetzbarkeit. So wiesen die mit Laccase (+Ankermolekül), insbesondere Lac-A1, deutlich geringere Kontaktwinkel auf als die unbehandelte Lärchenholzoberfläche (Abb. 14, Tab. 10).

Um den mechanischen Einfluss des Streichens auf die Holzoberfläche ausschliessen zu können, wurden zusätzlich Holzproben in den Reaktionslösungen getaucht. Zusätzlich wurden weitere Holzproben mit Wasser behandelt (Kontrolle). Grundsätzlich zeigten die getauchten Proben einen leicht höheren Kontaktwinkel als die bestrichenen Proben, was auf einen mechanischen Einfluss des Pinsels beim Streichen auf die Holzoberfläche hindeutet. Dennoch konnte auch bei den getauchten Proben ein Einfluss der Funktionalisierung auf die Benetzbarkeit festgestellt werden. So zeigte die Lac-A2 Variante bei Buche den kleinsten Kontaktwinkel (beste Benetzbarkeit) im Vergleich mit der unbehandelten Holzprobe und der Kontrolle (Abb. 15, Tab. 11). Die Funktionalisierung, insbesondere die Lac-A1 Variante führte bei den Lärchenproben zu einer besseren Benetzbarkeit mit Wasser (kleinsten Kontaktwinkel, Abb. 15, Tab. 11). Inwieweit die Funktionalisierung die Benetzung des Klebstoffes beeinflusst, wurde in dieser Arbeit nicht ermittelt. Somit sind Rückschlüsse auf das Benetzungsverhalten des Klebstoffes nicht möglich.

Als weiteren Indikator für eine veränderte Benetzbarkeit wurde die Tropfenfläche (mm^2) und Form nach vollständiger Spreitung und Trocknung bestimmt. Auf den nativen Buchen- und Lärchenproben wiesen die Tropfen eine mehr oder weniger runde Form auf, während auf den behandelten Proben die Tropfen sich verstärkt in Faserrichtung, insbesondere bei Lärche, ausbreiten und dadurch länglich werden (Abb. 17). Eine Erhöhung der Tropfenfläche konnte bei Buche nicht festgestellt werden (Abb. 16). Hingegen war die Tropfenfläche bei den funktionalisierten Lärchenholzproben (insbesondere bei Lac-A1) deutlich grösser als die Tropfenfläche der unbehandelten Proben und den Proben, welche nur mit Wasser behandelt wurden (Kontrolle, Abb. 16).

Die Holzoberflächenbehandlung mit Laccase (+Ankermolekül) führte in den meisten Fällen zu einer besseren Benetzbarkeit (kleinere Kontaktwinkel und grössere Tropfenform). Dennoch konnte keine Erhöhung von Festigkeit und Holzbruch bei den funktionalisierten Holzproben festgestellt werden.

3.3.2 Fourier Transform Infrarot Spektroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der FTIR-ATR Spektroskopie untersucht, inwieweit die chemischen Bestandteile des Holzes und insbesondere des Klebstoffes durch die Laccase-katalysierte Holz-Oberflächen-Funktionalisierung verändert wurden.

Hierfür wurden die FTIR-Spektrum-Banden analysiert, die repräsentativ für Lignin und (Hemi-) Cellulose stehen (Tab. 2 und 3). Zusätzlich wurden die Banden der funktionalisierten

Holzproben mit Klebstoff, welche die höchsten Intensitäten aufwiesen, ausgewertet (Abb. 18-21).

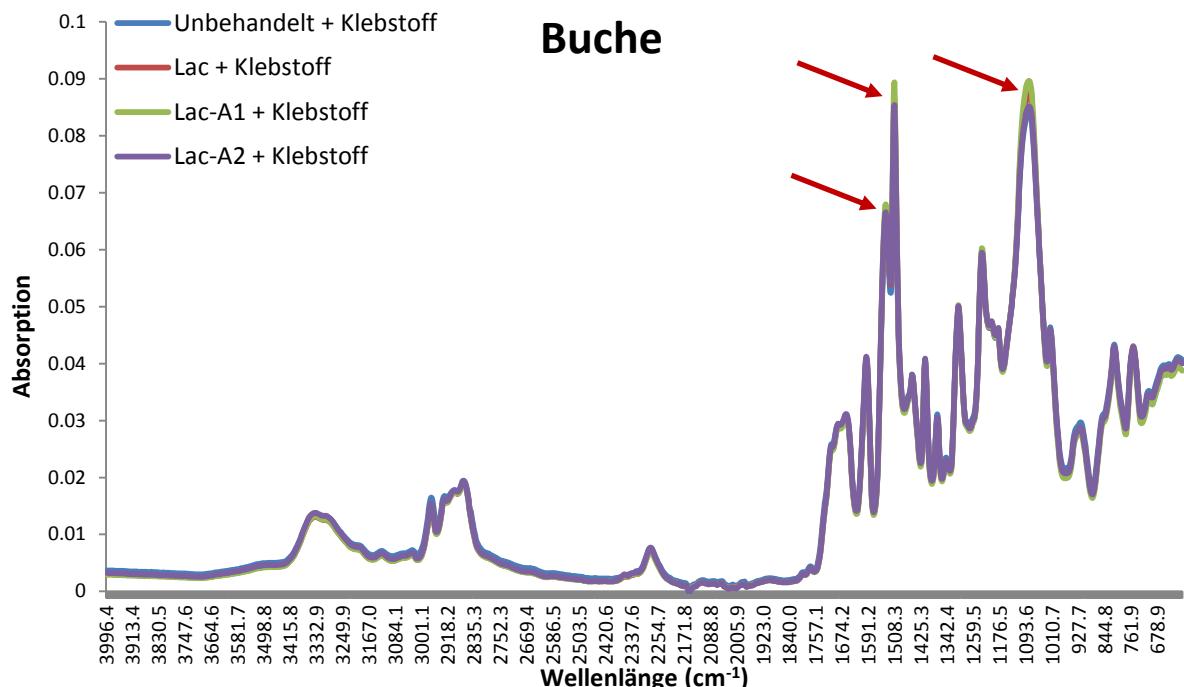


Abbildung 18: FTIR-Spektren von behandelten Buchen Holzproben mit Klebstoff.

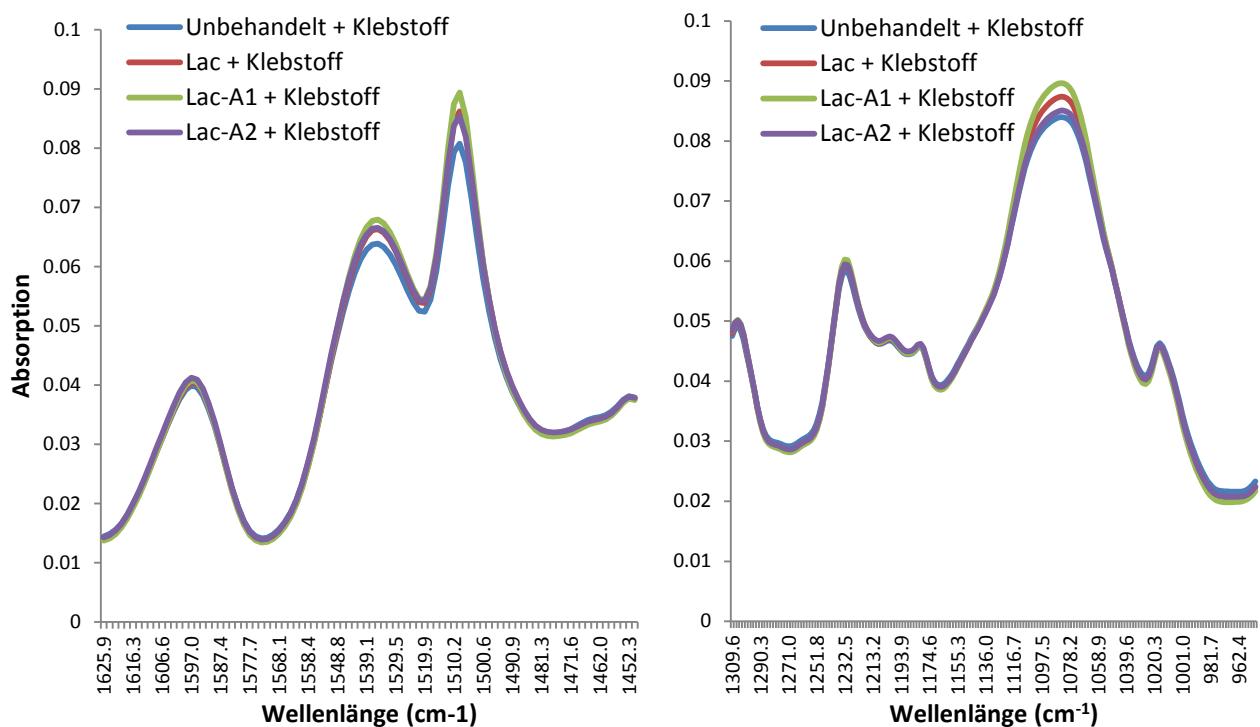


Abbildung 19: Ausschnitte der FTIR-Spektren von behandelten Buchen Holzproben mit Klebstoff.

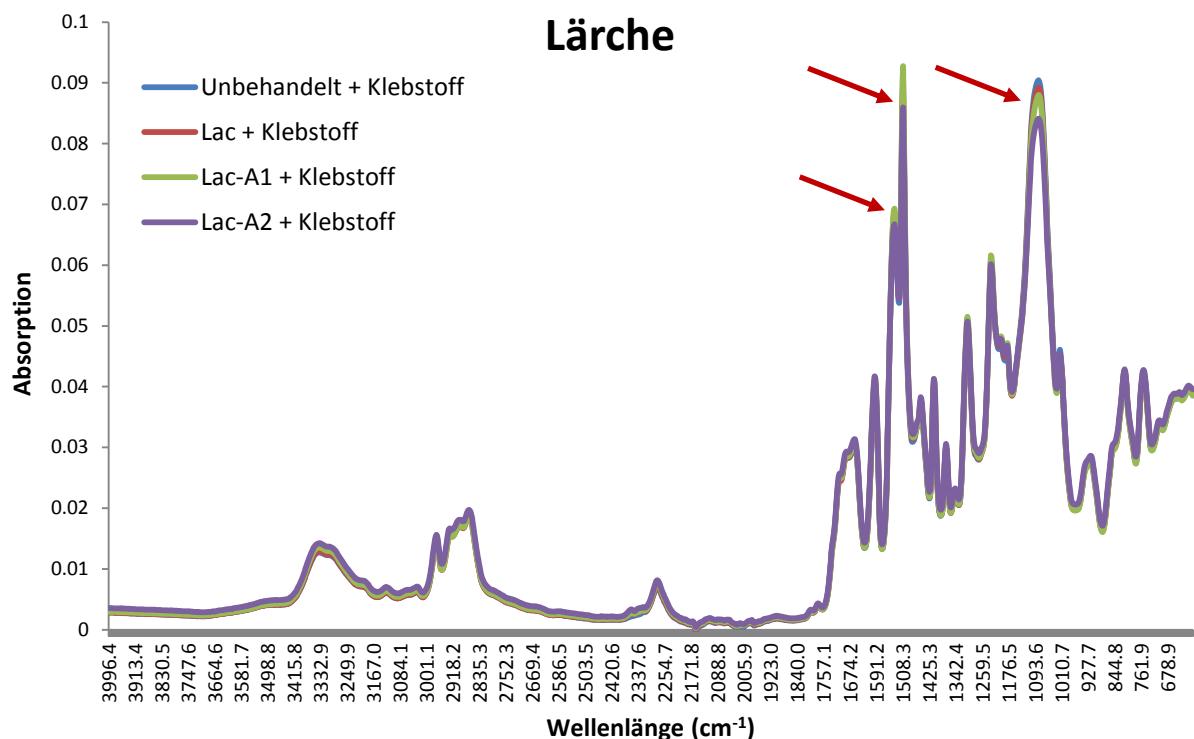


Abbildung 20: FTIR-Spektren von behandelten Lärchen Holzproben mit Klebstoff

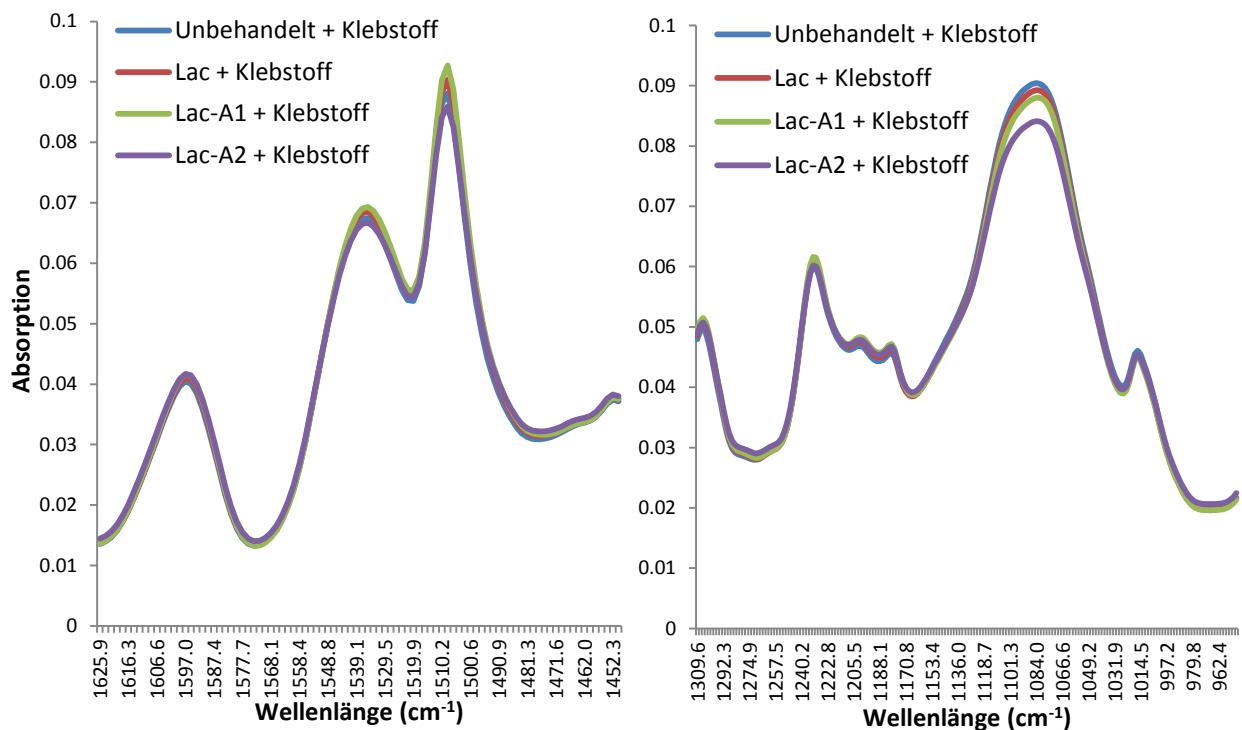


Abbildung 21: Ausschnitte der FTIR-Spektren von behandelten Lärchen Holzproben mit Klebstoff.

Beurteilung

Grundsätzlich bewirkt ein pilzlicher Abbau durch selektive Weißfäuleerreger eine Zunahme der Bande 1646cm^{-1} (konjugierte Carbonylgruppen) und eine Abnahme der Banden 1596cm^{-1} und 1510cm^{-1} (Öffnung aromatischer Ringe). Es findet eine Aufspaltung der Seitenketten des Ligninmoleküls zwischen α - und β -Kohlenstoffatomen statt. Bei keiner Behandlung war eine Abnahme der Absorption bei 1596 cm^{-1} mit einer gleichzeitigen Zunahme der Bande 1646 cm^{-1} verbunden. Dies zeigt, dass die Laccase-katalysierte Holzfunktionalisierung mittels Streichen und Tauchen keine messbare Delignifizierung des Holzes zur Folge hatte.

Dennoch konnten Modifizierungen des Polymerlignins festgestellt werden. So wurden die Extinktionsspektren durch Laccase und Laccase-Ankermolekül u.a. im Bereich der Wellenzahlen $1718\text{-}1715$, $1666\text{-}1659$, $1602\text{-}1594$, $1510\text{-}1507$ und 1421 cm^{-1} verändert. Bei diesen Wellenzahlen absorbieren v.a. Lignin und C=O Gruppen. So könnten etwa phenolische Hydroxylgruppen ($-\text{OH}$) zu Carbonylgruppen ($-\text{C=O}$) oxidiert worden sein (Xu *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009). Weitere Reaktionen, wie etwa die Bildung von Carboxylgruppen (Ibarra *et al.*, 2007), Veresterungen (Grönqvist *et al.*, 2006), Demethylierungen oder Polymerisierungen (Kim *et al.*, 2008) könnten ebenfalls stattgefunden haben. Insbesondere ist die Tatsache interessant, dass die Oxidation von phenolischen OH-Gruppen zu Carbonylgruppen die Anzahl an diesen Gruppen reduziert haben könnte und somit die Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen Klebstoff und Holzfügeteil möglicherweise reduziert wurde.

Zusätzlich liessen die Banden $1553\text{-}1535$, $1510\text{-}1508$ und $1085\text{-}1083\text{ cm}^{-1}$ der funktionalisierten Buchen und Lärchen Holzproben mit Klebstoff Veränderungen im Vergleich mit den unbehandelten Holzproben erkennen. Insbesondere die Bande $1510\text{-}1508$ (aromatische Ringschwingung im Lignin) zeigte eine veränderte Interaktion mit dem Klebstoff. Die Bande $1085\text{-}1083\text{ cm}^{-1}$, welche OH-Gruppen der Hemi- und Cellulose repräsentiert, war ebenfalls deutlich verändert. Dies kann als weiteres Indiz gesehen werden, dass die Reaktion zu kovalenten Bindungen des Klebstoffes (Isocyanate) mit den OH-Gruppen des Holzes durch die Funktionalisierung gestört war. Inwiefern die freien Aminogruppen der funktionalisierten Holzoberfläche mit dem verwendeten Klebstoff reagiert hat und, anstatt zu einer verbesserten Adhäsion zwischen Holz und Klebstoff, zu einem möglichen Kohäsionsversagen des Klebstoffes geführt hat, konnte nicht abschliessend geklärt werden.

4 Zusammenfassung

Der vorliegende Bericht dokumentiert die Ergebnisse der Machbarkeitsstudie „Enzymatische Holz-Oberflächen-Funktionalisierung zur Verbesserung der Verklebungsgüte“

Problemstellung / Ziele

Neben der Auswahl eines geeigneten Klebstoffs ist die Beschaffenheit der Fügeteiloberfläche von entscheidender Bedeutung für die erzielbaren Verbundfestigkeiten und vor allem für die Langzeitbeständigkeit der Holzverklebung. Holzinaktivierung ist ein Oberflächenphänomen, welches die äusseren Holzschichten betrifft und durch diverse Einflüsse wie Temperatur oder Verschmutzung hervorgerufen wird. Diese physikalische und chemische Veränderung der Holzoberflächeneigenschaften kann zur Folge haben, dass sich die Verklebungsgüte wegen des veränderten Benetzungs-, Fliess und Eindringverhalten des Klebstoffes verschlechtern kann.

Ziel der Machbarkeitsstudie war es, die Möglichkeit der Laccase-katalysierten Holz-Oberflächen-Funktionalisierung zur Verbesserung der Holz-Klebstoff-Interaktionen zu evaluieren.

Schlussfolgerungen

Die gewonnenen Ergebnisse des Projektes erlauben folgende Schlussfolgerungen:

- Charakterisierung und Leistungstests der kommerziellen und selbsthergestellten Laccasen wurden in einem standardisierten Verfahren durchgeführt. Es konnte für die Holz-Oberflächen-Funktionalisierung ein geeignetes System bestimmt werden.
- Die Laccase-katalysierte Holzfunktionalisierung mit den phenolischen Aminen (Ankermoleküle) wurde mittels Streichen und Tauchen durchgeführt. Das Benetzungsverhalten der Holzoberfläche (Buche, Lärche) wurde bestimmt (Kontaktwinkelmessung und Tropfenform). Die funktionalisierten Proben (insbesondere Lärche) zeigten ein verbessertes Benetzungsverhalten gegenüber Wasser.
- Die Verklebungsgüte konnte weder bei Buche noch bei Lärche durch die Laccase-Behandlungen verbessert werden. Die Zugscherfestigkeiten und die Holzbruchanteile wurden durch die Laccase-katalysierte Holzfunktionalisierung sogar signifikant reduziert. Ein Grund für die schlechte Verklebungsgüte könnte sein, dass die Holzfunktionalisierung unzureichend war. Dagegen spricht allerdings, dass die Performance durch die Behandlung deutlich verringert wurde und dies auf eine physikalisch-chemische Veränderung der Holzoberfläche hindeutet.
- Die FTIR-ATR Analyse liess eine Modifizierung des Polymerlignins erkennen. Zudem wurden veränderte Interaktionen zwischen Klebstoff und Holzfügeteil beobachtet. Die Reaktion zu kovalenten Bindungen des Klebstoffes (Isocyanate) mit freien OH-Gruppen des Holzes war höchstwahrscheinlich durch die Funktionalisierung (Reduzierung freier Hydroxylgruppen) gestört (reduzierte Adhäsion). Inwieweit die funktionellen

Aminogruppen der Ankermoleküle mit dem verwendeten Klebstoff reagiert haben und zu einem möglichen Kohäsionsversagen des Klebstoffes führten, konnte nicht abschliessend geklärt werden.

Aufgrund der komplexen Wechselwirkungen zwischen funktionalisierter Holzoberfläche und Klebstoff sowie zwischen Benetzungsverhalten und Verklebungsgüte ist kein einfacher Kausalzusammenhang (Holz-Funktionalisierung → gesteigerte Holz-Klebstoff-Interaktionen) zu erkennen.

Die durchgeführte Machbarkeitsstudie weist auf die Möglichkeit der gezielten physikalisch-chemischen Veränderung der Holzoberfläche hin. Eine Fortsetzung der Arbeiten scheint daher sinnvoll. Im Hinblick auf eine verbesserte Verklebung könnten ggf. andere Ankermoleküle die Adhäsion zwischen Fügeteil und Klebstoff verbessern. Allerdings sollte in Voruntersuchungen die Reaktion des Moleküls mit dem Klebstoff genau analysiert werden, um einen möglichen negativen Einfluss auf den Klebstoff (verminderte Kohäsion) auszuschliessen. In grundlagenorientierten Arbeiten sollte die Methode der enzymatischen Kopplung funktioneller Moleküle zur Modifizierung des Holzes ausführlich untersucht und auf neue Einsatzgebiete/Anwendungen erweitert werden.

Literaturverzeichnis

- Arnold M, Fischer A, Künniger T. 2010.** Strukturhobeln - Charakterisierung und Auswirkungen einer innovativen Oberflächenbearbeitung für zu beschichtende Hobelware. Wissenschaftlicher Schlussbericht, WHFF-Projekt Nr. 2008.01. S. 59
- Avramidis G, Scholz G, Nothnick E, et al. 2011.** Improved bondability of wax-treated wood following plasma treatment. *Wood Science and Technology* **45**(2): 359-368.
- Baldrian P. 2006.** Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* **30**(2): 215-242.
- Bikerman J 1967.** Causes of poor adhesion - Weak Boundary Layers. *Industrial & Engineering Chemistry* **59**: 40-44
- Boudet AM. 2000.** Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**(1-2): 81-96.
- Bourbonnais R, Paice MG. 1990.** Oxidation of nonphenolic substrates - an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* **267**(1): 99-102.
- Camarero S, Ibarra D, Martinez MJ, Martinez AT. 2005.** Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(4): 1775-1784.
- Christiansen AW. 1990.** How overdrying wood reduces its bonding to phenol-formaldehyde adhesives - a critical review of the literature 1. physical responses. *Wood and Fiber Science* **22**(4): 441-459.
- Christiansen, A. 2005.** Chemical and mechanical aspects of HMR primer in relationship to wood bonding. *Forest Products Journal* **55**: 73-78
- Claus H. 2003.** Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology* **179**(3): 145-150.
- Claus H. 2004.** Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* **35**(1-2): 93-96.
- Elstermann F. 2011.** Einfluss der Oberflächenqualität des Holzes auf die Verklebungsgüte. Diplomarbeit. Institut für Baustoffe/Holzphysik, ETH Zürich. S. 65.
- Faix O. 1991.** Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforschung* **45**: 21-27.
- Fengel D, Wegener G. 2003.** *Wood - Chemistry, Ultrastructure, Reactions*: Walter de Gruyter.
- Good R. 1972.** Theory of "Cohesive" vs "Adhesive" Separation in an Adhering System. *The Journal of Adhesion* **4**:133-154.
- Grönqvist S, Rantanen K, Alén R, et al. 2006.** Laccase-catalysed functionalisation of TMP with tyramine. *Holzforschung* **60**(5): 503-508.

- Habenicht G.** 2009. Kleben – Grundlagen, Technologien, Anwendungen. 6., aktual. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Heinfling A, Martinez MJ, Martinez AT, et al.** 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(8): 2788-2793.
- Hoegger PJ, Majcherczyk A, Dwivedi RC, et al.** 2007. Enzymes in wood degradation. In: Kües U ed. *Wood production, wood technology, and biotechnological impacts*. Göttingen: Universitätsverlag, 383-432.
- Huttermann A, Mai C, Kharazipour A.** 2001. Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**(4): 387-394.
- Ibarra D, Chavez MI, Rencoret J, et al.** 2007. Structural modification of eucalypt pulp lignin in a totally chlorine-free bleaching sequence including a laccase-mediator stage. *Holzforschung* **61**(6): 634-646.
- Ihsen J, Schubert M, Schwarze FWMR, Thöny-Meyer L.** 2011. Efficient production of Al(OH)₃-immobilized laccase with a *Heterobasidion annosum* strain selected by microplate screening. *Journal of Applied Microbiology* **110**(4): 924-934.
- Kim S, Silva C, Zille A, et al.** 2009. Characterisation of enzymatically oxidised lignosulfonates and their application on lignocellulosic fabrics. *Polymer International* **58**(8): 863-868.
- Kudanga T, Prasetyo EN, Sipilä J, et al.** 2008. Laccase-mediated wood surface functionalization. *Engineering in Life Sciences* **8**(3): 297-302.
- Kudanga T, Prasetyo EN, Sipilä J, et al.** 2010. Enzymatic grafting of functional molecules to the lignin model dibenzodioxocin and lignocellulose material. *Enzyme and Microbial Technology* **46**(3-4): 272-280.
- Kunamneni A, Camarero S, Garcia-Burgos C, et al.** 2008. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories* **7**: 32.
- Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, et al.** 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology* **41**(3-4): 185-227.
- Lopez-Suevos F, Richter K.** 2009. Hydroxymethylated resorcinol (HMR) and novolak-based HMR (n-HMR) primers to enhance bond durability of *Eucalyptus globulus* glulams. *Journal of Adhesion Science and Technology* **23**(15): 1925-1937.
- Lu JZ, Wu QL, Mcnabb HS.** 2000. Chemical coupling in wood fiber and polymer composites: A review of coupling agents and treatments. *Wood and Fiber Science* **32**(1): 88-104.
- Marra A.** 1992. Technology of wood bonding: principles in practice. New York, London, Victoria, Scarborough: Van Nostrand Reinhold.

- Müller C, Euring M, Kharazipour A. 2009.** Enzymatic modification of wood fibres for activating their ability of self bonding. *International Journal of Materials and Product Technology* **36**: 189-199.
- Schäfer, K. 1964.** Zwischenmolekulare Kräfte. In: BEHRENS, D/FISCHBECK, K (Hrsg): Dechema-Monographien - Haftsysteme und Haftfestigkeit. Frankfurt am Main: Chemie, 1964, Seiten 1 - 14
- Schubert, M und Ihssen, J. 2010.** Behandlung von Nadelholz mit Laccase zur Verbesserung der Widerstandsfähigkeit gegenüber holzverfärbenden Pilzen. Wissenschaftlicher Schlussbericht, WHFF-Projekt Nr. 2009.03. S. 47.
- Schubert M, Engel J, Thöny-Meyer L, et al. 2012.** Protection of wood from microorganisms by laccase-catalyzed iodination. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(20): 7267-7275.
- Schubert MS, M., Mourad S, Schwarze FWMR. 2011.** Automated image processing for quantification of blue-stain discolouration of Norway spruce wood. *Wood Science and Technology* **45**(2): 331-337.
- Stehr M. 1999.** Laser ablation of machined wood surfaces. 2. Effect on end-grain gluing of Pine (*Pinus silvestris* L.). *Holzforschung* **53**: 655-661.
- Stehr M, Johansson I. 2000.** Weak boundary layers on wood surfaces. *Journal of Adhesion Science and Technology* **14**: 1211-1224.
- Sun NJ, Frazier CE. 2005.** Probing the hydroxymethylated resorcinol coupling mechanism with stress relaxation. *Wood and Fiber Science* **37**(4): 673-681.
- Vick CB, Richter K, River BH, Fried AR. 1995.** Hydroxymethylated Resorcinol Coupling Agent for Enhanced Durability of Bisphenol-a Epoxy Bonds to Sitka Spruce. *Wood and Fiber Science* **27**(1): 2-12.
- Vivekanand V, Dwivedi P, Sharma A, et al. 2008.** Enhanced delignification of mixed wood pulp by *Aspergillus fumigatus* laccase mediator system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**: 2799-2804.
- Xu QH, Qin MH, Shi SL, et al. 2006.** Structural changes in lignin during the deinking of old newsprint with laccase-violuric acid system. *Enzyme and Microbial Technology* **39**(5): 969-975.
- Yoshida H. 1883.** Chemistry of lacquer (Urushi). *Journal of the Chemical Society* **43**: 472-486.
- Zeppenfeld G, Grunwald D 2005.** Klebstoffe in der Holz- und Möbelindustrie. 2., überarb. und erw. Aufl. Leinfelden-Echterdingen: DRW.