

Capítol 1

Introducció i objectius

RESUM

En aquest capítol es realitza una introducció general als temes clau de la present tesi. Es planteja la importància de la utilització de pasta d'eucaliptus així com de potenciar el blanqueig d'aquesta pasta mitjançant tecnologies netes. Concretament, l'aplicació de nous mètodes biotecnològics amb xilanases i lacases semblen ser molt prometedors. Es planteja també la importància dels àcids hexenurònics en aquestes pastes i l'interès que representa la seva eliminació de les pastes. Finalment, es descriuen el plantejament de treball i els objectius de la Tesi.

1.1 INTRODUCCIÓ

La Unió Europea és el segon productor mundial de pasta de paper, representant la cadena fusta-pasta-impressió al voltant del 10% de la nostra activitat industrial (Cepi, 2001).

Cada any es fabriquen al món 367 milions de tones de paper, casi la mateixa quantitat que es consumeix (366, milions de tones). A l'estat Espanyol, cada ciutadà consumeix 183 kg de paper i se'n fabriquen 5,7 milions de tones. La xifres de consum pels Europeus és de 132 kg anuals i de casi 110 milions de tones produïdes cada any. Hi ha 131 empreses que fabriquen paper o pasta de paper a Espanya, que facturen .100 milions d'euros l'any i que donen feina a 18.000 treballadors. Aquestes xifres posen de relleu la importància del sector industrial del paper per a la societat tant des del punt de vista econòmic, social com mediambiental. A Espanya, durant els últims anys, la producció de paper ha crescut significativament. A més, el consum de paper està estretament lligat a l'activitat econòmica d'un país.

La fabricació de pasta de paper consisteix en la separació de les fibres de cel·lulosa, que es troben enganxades per la làmina mitja composta fonamentalment de lignina utilitzant mètodes mecànics i/o químics (Fengel i Wegener, 198 ; Sjöström, 1993). El procés de fabricació de pasta de paper és conegut com a pastejat o cocció. La cocció

kraft es realitza a condicions alcalines, utilitzant per exemple sulfur sòdic i hidròxid sòdic. Aquest tipus de cocció és el més estès a nivell mundial (més del 50% del total de pasta) ja que permet obtenir pastes amb una gran resistència, tot i que amb menor rendiment (al voltant del 50% del material inicial), a partir de diferents tipus de fustes incloent l'eucaliptus (García Hortal i Colom, 1992; Santos *et al.*, 1997).

1.2 PASTA D'EUCALIPTUS

La pasta d'eucaliptus pertany a les frondoses ("hardwood"). Aquest terme s'aplica als arbres de fulles amples i en general, caduques (latifòlies, caducifòlies): pollancre (*Populus sp.*), bedoll (*Betula sp.*), faig (*Fagus sp.*), roure (*Quercus sp.*), eucaliptus (*Eucalyptus sp.*), etc...

Les fibres de frondoses, en comparació amb les fibres de coníferes, són curtes, de paret gruixuda i lumen estret (García Hortal, 2007). Generalment, les frondoses proporcionen papers menys resistents que les coníferes, però milloren la formació de la fulla, llisor, volum específic i opacitat (aplicació interessant en qualitats d'impressió).

Les pastes kraft d'*Eucalyptus globulus* van ser satisfactòriament introduïdes al mercat fa més de 100 anys i els fabricadors de paper van reconèixer que aquesta nova pasta de frondosa era molt especial. La seva producció total és de 10 milions de tones per any i l'increment anual és del 6%, dues vegades més que per la pasta en general. L'interès de la indústria de pasta i paper per aquesta fibra s'està incrementant degut a les seves excel·lents característiques per a obtenir paper d'impressió i escriptura, paper tissú, etc...

La indústria espanyola té un elevat volum de producció de pasta d'eucaliptus (1,6 milions de tones anuals). A més, aquesta pasta és de gran interès estratègic per Espanya a la Unió Europea, ja que és de ràpid creixement i elevada productivitat, i la seva fusta és d'alta qualitat el què li confereix unes propietats especials al producte final. D'altra banda, se sap que extenses masses forestals com les d'eucaliptus de Galícia contribueixen significativament a la fixació de CO₂, reduint per tant les emissions globals de CO₂ a l'atmosfera i contribuint així a la disminució de l'efecte hivernacle.

1.2.1 Constituents químics majoritaris

Els constituents químics majoritaris presents a la pasta són hidrats de carboni (cel·lulosa i hemicel·luloses) i la lignina.

La **cel·lulosa** és un polímer lineal, la unitat bàsica de la qual és la D-glucosa que s'enllaça successivament a través d'un enllaç glucosídic en la configuració β (1-), donant lloc a la unitat de cel·lobiosa que és la unitat més petita que es repeteix exactament a la cadena polimèrica (Figura 1-1). Les molècules de cel·lulosa tendeixen a formar enllaços per ponts d'hidrogen intra- i intermoleculars, i la seva presència influeix en la morfologia, rigidesa, orientació, resistència i reactivitat de les cadenes cel·lulòsiques. Són els enllaços d'hidrogen intermoleculars els que permeten una estructura fibril·lar ordenada, és a dir, d'una alta cristallinitat. Les zones d'elevada cristallinitat són difícils de penetrar per dissolvents i reactius, al contrari que les zones relativament més desordenades (amorfes), que són més accessibles i susceptibles a totes les reaccions químiques, i que a més afavoreixen l'inflament, l'allargament i la flexibilitat de la fibra (Annergren, 1996; García Hortal, 2007).

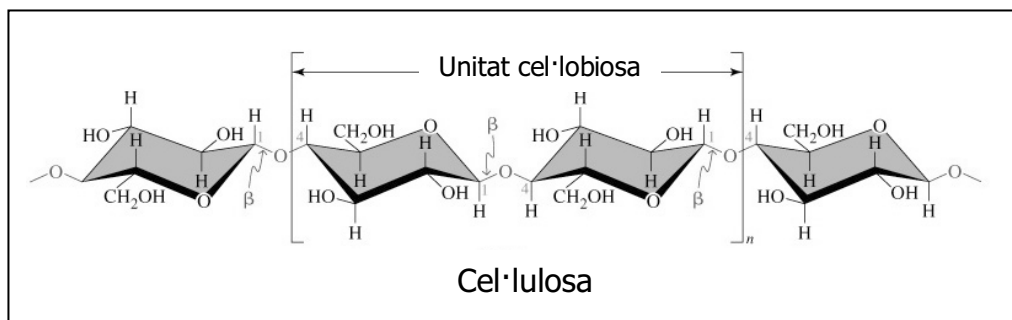


Figura 1-1. Molècula de cel·lobiosa a la cadena de cel·lulosa

A la paret cel·lular, les cadenes de cel·lulosa s'agreguen formant les microfibril·les, que és l'element base dels materials cel·lulòsics. Les dimensions d'aquestes microfibril·les varien en funció del seu origen i la seva posició dins la paret cel·lular.

Les propietats dels materials cel·lulòsics estan relacionades amb el grau de polimerització de la molècula de cel·lulosa (DP). La resistència al paper és deguda en part a la resistència individual de les cadenes de cel·lulosa, que disminueix si aquestes es degraden. Durant el blanqueig de la pasta es pretén eliminar el color que donen altres components (lignina), però es pot produir una degradació de la cel·lulosa, que es tradueix en una disminució del rendiment i en una possible disminució de les propietats físiques i mecàniques de la fibra. Aquesta degradació pot ser de tipus hidrolítica, oxidant, alcalina, tèrmica, microbiològica o mecànica (Reeve, 1996).

Les **hemicel·luloses** són polisacàrids químicament heterogenis, constituïts per combinacions de monosacàrids de cinc carbonis (xilosa i arabinosa) i sis carbonis (glucosa, manosa i galactosa) enllaçats no uniformement. Algunes hemicel·luloses

estan associades a la porció cel·lulòsica mentre que altres ho estan amb la lignina. Actuen com a matriu de suport per a les microfibril·les de cel·lulosa a la paret cel·lular, i a més són de menor pes molecular, més accessibles, més fàcilment degradables i més fàcils de dissoldre que la cel·lulosa. Al mateix temps, són amorfes i molt hidrofíliques, i per tant tenen un paper important en la capacitat d'absorbir aigua durant l'operació de refinat, promovent la fibril·lació interna de la fibra i millorant les propietats físicomecàniques que depenen de l'àrea d'enllaç interfibres (Reeve, 1996).

La **lignina** molt diferent estructuralment de la cel·lulosa i de les hemicel·luloses. És un polímer aromàtic format per la condensació oxidativa de precursors fenòlics, molt ramificat, tridimensional i amorf, el paper principal del qual és el d'actuar com a material incrustant entre làmina mitja i les parets de la fibra. Té un caràcter molt hidrofòbic, pel què la seva presència en les pastes inhibeix l'absorció d'aigua, l'inflament de la fibra i dificulta el refinatge. La seva quantitat i distribució a través de les parets cel·lulars difereix segons els seus orígens, així, per exemple, les coníferes presenten un major percentatge de lignina que les frondoses. A la Figura 1-2 es mostra la complexitat de l'estructura de la lignina, d'una fusta de frondoses.

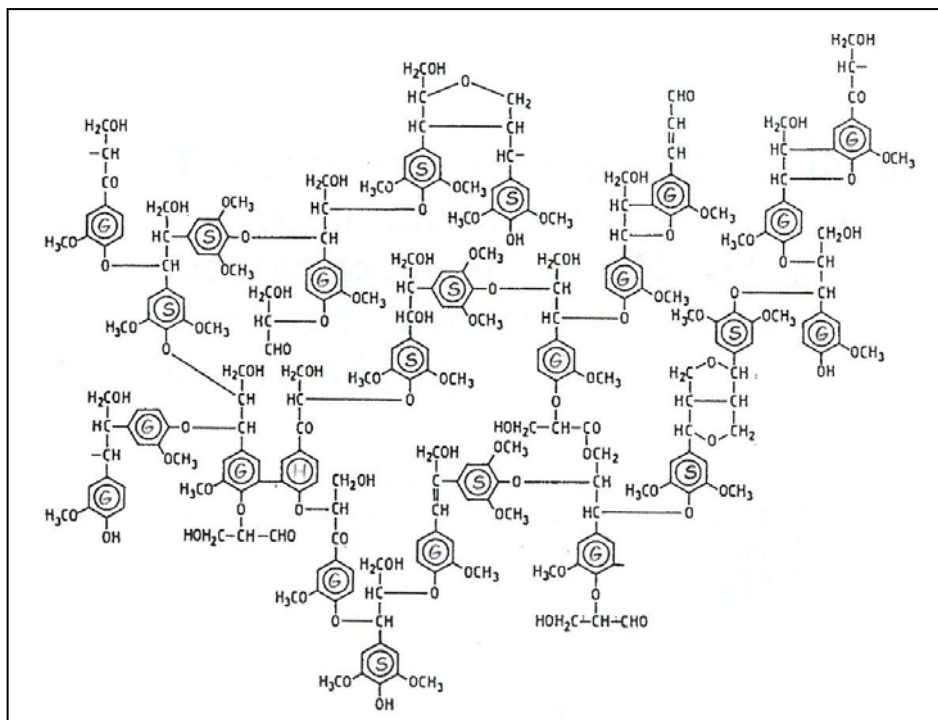


Figura 1-2. Estructura química de la lignina de frondoses formada per diferents tipus de subestructures (Nimz, 197)

L'estructura bàsica de la lignina difereix entre coníferes i frondoses. En les coníferes, l'estructura predominant que es repeteix es coneix com la unitat Guaiacil (G), la qual conté un únic grup metoxil a l'anell fenilpropà i deriva de l'alcohol coniferilic. En les frondoses, la lignina és un copolímer o mescla entre unitats Guaiacil i Siringil (S), contenint aquesta última dos grups metoxil per nucli fenilpropà i derivat de l'alcohol sinapílic (Parham, 1983; Higuchi, 1985). Així mateix, és conegut que les unitats S són més reactives que les unitats G, per tant, les lignines en les que predominin S seran més fàcils d'eliminar (Dence, 1996; del Río *et al.*, 2001).

Durant la cocció kraft s'allibera una lignina degradada, anomenada lignina kraft, mentre que la lignina residual que queda a la pasta kraft ha sofert reaccions d'oxidació i és la responsable del color fosc d'aquestes pastes. Per aquest motiu, per a l'obtenció de papers i escriptura i altres és necessari eliminar la lignina residual mitjançant un procés de blanqueig. A la Figura 1-3 es mostra un esquema simplificat de l'estructura de la lignina d'eucaliptus d'una pasta al final d'una seqüència de blanqueig TCF amb una etapa amb el sistema lacasa-mediador (Ibarra, 2006).

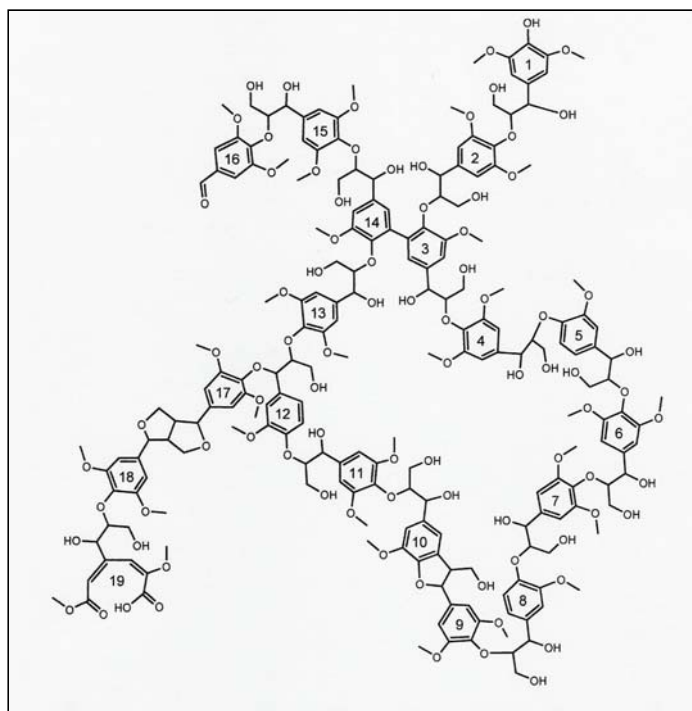


Figura 1-3. Model estructural simplificat de la lignina residual a la pasta kraft d'*E.globulus* després del blanqueig TCF incloent una etapa L. S'inclouen les unitats S (1 i altres) i G (3 i altres) (Ibarra, 2006).

Les cèl·lules vegetals posseeixen parets cel·lulars que contenen microfibril·les de cel·lulosa formant l'esquelet, que a la vegada està rodejat d'altres substàncies que actuen com a matriu (hemicel·luloses) i material incrustant (lignina). El model generalitzat de l'organització típica de la paret cel·lular es mostra a la Figura 1- . Les fibres estan constituïdes de varies capes: paret primària (P), paret secundària externa (S_1), paret secundària mitja (S_2) i paret secundària interna (S_3). En les cèl·lules madures, la part interna està buida i es denomina lumen. Les diferents capes difereixen respecte al seu espessor, estructura, composició química i orientació de les microfibril·les en respecte a l'eix de la fibra. La lignina que es troba a la làmina mitja, s'elimina en gran part en el procés de cocció, on s'individualitzen les fibres. La lignina residual de la fibra a blanquejar es localitza principalment a la paret secundària mitja (S_2), al constituir aquesta la porció principal de la paret cel·lular (Parham, 1983).

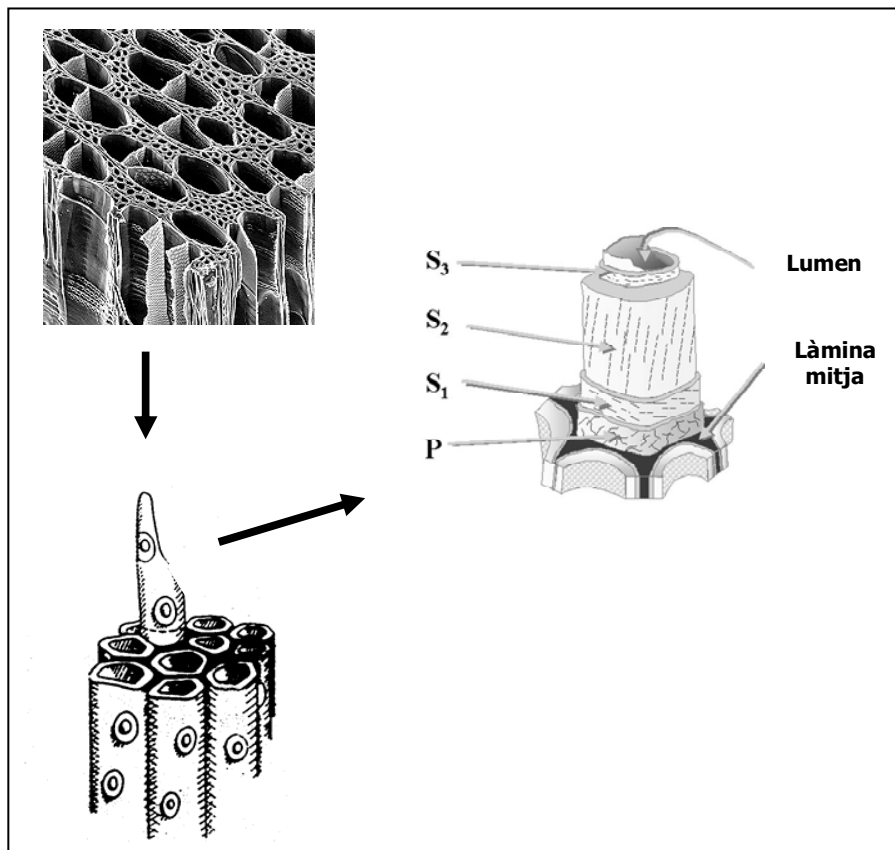


Figura 1- . Estructura simplificada de la paret d'una cèl·lula (Rydholm, 1967)

A la Figura 1-5 es mostra la representació esquemàtica de les relacions entre els principals constituents de la paret secundària (cel·lulosa, lignina i hemicel·lulosa) d'una

angiosperma herbàcia. Es mostren les microfibril·les de cel·lulosa immerses en una matriu de lignina en la que també s'inclou l'hemicel·lulosa. Les unions entre aquests polímers es completen mitjançant punts intermoleculars formats pels àcids *p*-hidroxicinàmics (Bidlack *et al.*, 1992).

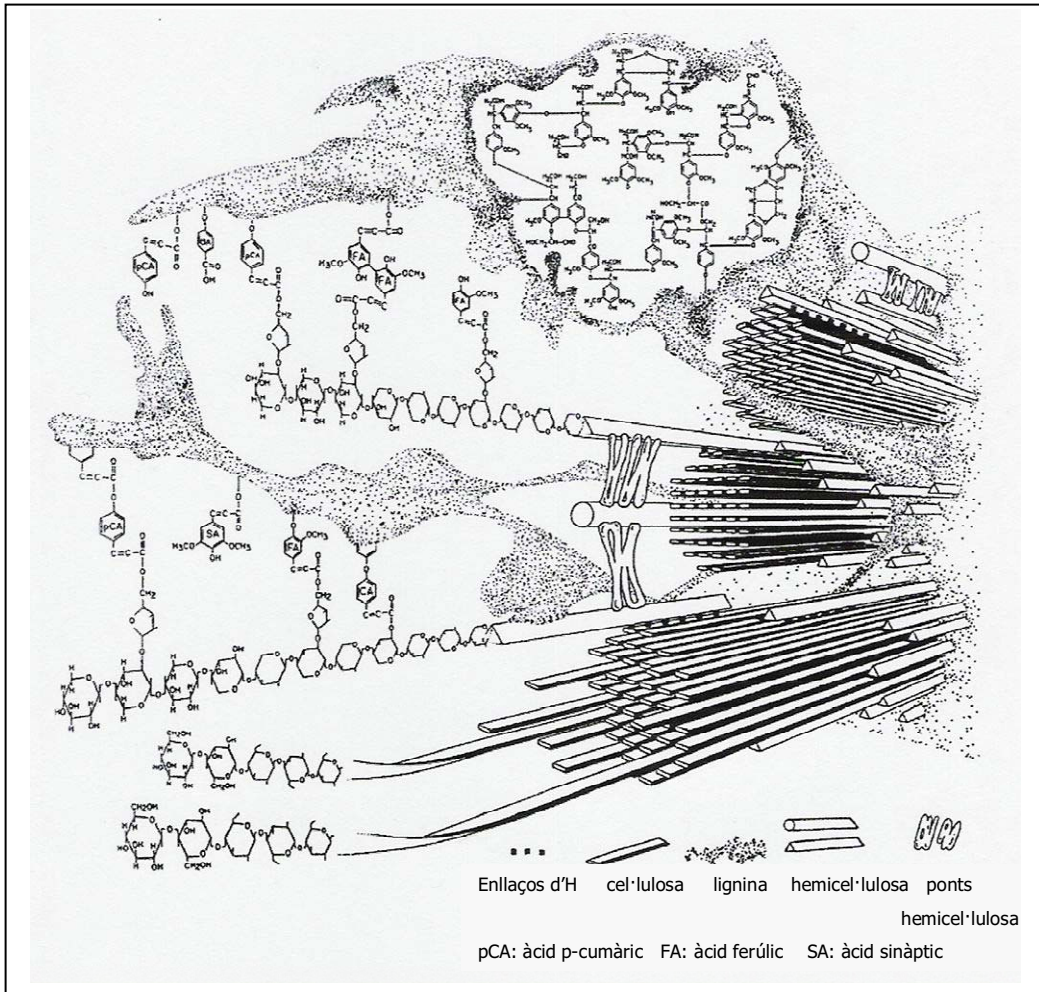


Figura 1-5. Polisacàrids i lignina de la paret cel·lular de les plantes: relació i estructura molecular de la lignina, hemicel·lulosa i cel·lulosa (Bidlack *et al.*, 1992)

La fusta d'eucaliptus té la següent composició química (Sjöström, 1993), en tant per cent de pes sec de la fusta: 51,3% de cel·lulosa; 1, % de glucomanà; 19,9% de xilà; 3,9% d'altres carbohidrats; 21,9% de lignina i 1,3% d'extractius. Es caracteritza per contenir **gran quantitat de xilans** els quals formen part de les hemicel·luloses

presentes en les fibres cel·lulòsiques (Grant, 1992; Senior i Hamilton, 1992 (a)). A la Figura 1-6 es mostra l'estructura d'una molècula de xilà amb les seves ramificacions.

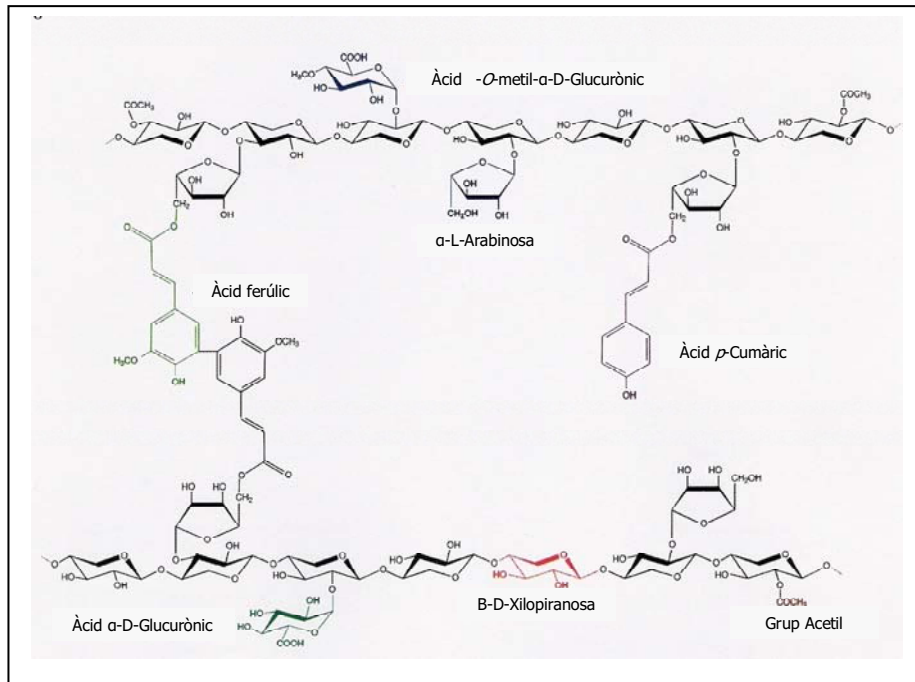


Figura 1-6. Esquema de l'estructura d'una molècula de xilà i les seves ramificacions

Els **extractius** de la fusta són aquells compostos que són extrets de la fusta amb solvents orgànics i són importants ja que causen problemes ambientals i de producció durant la fabricació de pastes i papers. Així, els coneguts dipòsits de "pitch" tenen l'origen en els components lipofílics de la matèria prima (fusta) que no són afectats durant els processos de cocció i blanqueig.

1.3 BLANQUEIG DE PASTES

L'aparició en els últims anys de noves legislacions reguladores dels processos contaminants és conseqüència de la nova conscienciació ecològica i mediambiental de la societat. Aquesta preocupació mediambiental recolzada per les noves lleis està pressionant a les indústries que es veuen forçades a realitzar canvis, adaptacions i/o millores dels seus processos, amb la finalitat d'aconseguir processos més respectuosos amb el medi ambient, amb un menor impacte mediambiental; és a dir, processos de producció sostenible.

En concret la indústria paperera ha estat moltes vegades motiu de controvèrsies i ha aparegut com l'objectiu de moltes accions ecologistes. Aquesta pressió exercida tant per a la societat com per a la nova legislació mediambiental també ha suposat canvis importants en tal sector.

Respecte a les innovacions realitzades per a la indústria paperera, la planta de blanqueig de pasta ha estat la que més modificacions ha dut a terme, ja que de fet és la secció del procés d'obtenció de pasta i paper la que major contaminació provoca. L'objectiu del procés de blanqueig és incrementar la blancor de la pasta per eliminació o modificació de la residual i els seus productes de degradació (Fengel i Wegener, 198). A la dècada dels setanta, la indústria paperera va acceptar l'efecte negatiu que l'ús del clor com agent de blanqueig té en el medi ambient, i els seus esforços es van centrar en la reducció del volum dels efluent generats en les etapes oxidants o en la seva eliminació total, mitjançant el seu reciclat cap a la caldera de recuperació. Aquests intents van resultar fallits pels efectes corrosius que el clor presenta sobre els equips del procés. Tot i així, la pressió ambiental exercida per a disminuir o eliminar la formació de compostos organoclorats (AOX), d'elevada toxicitat, durant els processos de blanqueig ha conduït a una substitució total del clor pel diòxid de clor, a un major ús de la deslignificació amb oxigen o a un major consum de peròxid d'hidrogen i d'ozó (van Lierop *et al.*, 1996), donant lloc a l'aparició de nous productes en el mercat tals com les pastes **ECF** (Elemental Chlorine Free) i les pastes **TCF** (Totally Chlorine Free).

La utilització de la **biotecnologia** en el blanqueig de pasta de paper ha suscitat una gran atenció, aconseguint-se en els últims anys resultats de gran interès. L'ús d'enzims com les **xilanases** determina una molt important millora tecnològica degut a que el seu ús potencia l'efecte blanquejant dels agents químics, permetent un important estalvi dels mateixos i, més important, disminuint notablement la generació de contaminants en el procés de blanqueig (Roncero *et al.*, 2005; Amin, 2006). D'altra banda, la utilització de **lacases** a través del sistema lacasa-mediador constitueix una nova generació d'enzims diferent a les xilanases ja que aquest actua directament sobre la lignina de la pasta. El sistema lacasa-mediador permet desenvolupar seqüències de blanqueig TCF, substituir l'etapa de deslignificació amb oxigen o la d'ozó, estalviar reactius, blanquejar la pasta i reduir l'índex kappa (Bajpai *et al.*, 200).

1. ÀCIDS HEXENURÒNICS (HEXA)

Les pastes de frondoses, entre elles la pasta d'eucaliptus, es caracteritzen per a contenir gran quantitat d'àcids hexenurònics (HexA). Els HexA es formen durant la cocció kraft on l'àcid -*O*-metilglucurònic present en els xilans es converteix en el seu

corresponent insaturat àcid hexenurònic (àcid -deoxi-β-L-threo-hex- -enopiranosilurònic) per la pèrdua del metanol tal com es mostra a la Figura 1-7, (Buchert *et al.*, 1995; Teleman *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2000; Daniel *et al.*, 2003; Shatalov i Pereira, 200 ; Danielsson *et al.*, 2006; Johansson i Germgard, 2006).

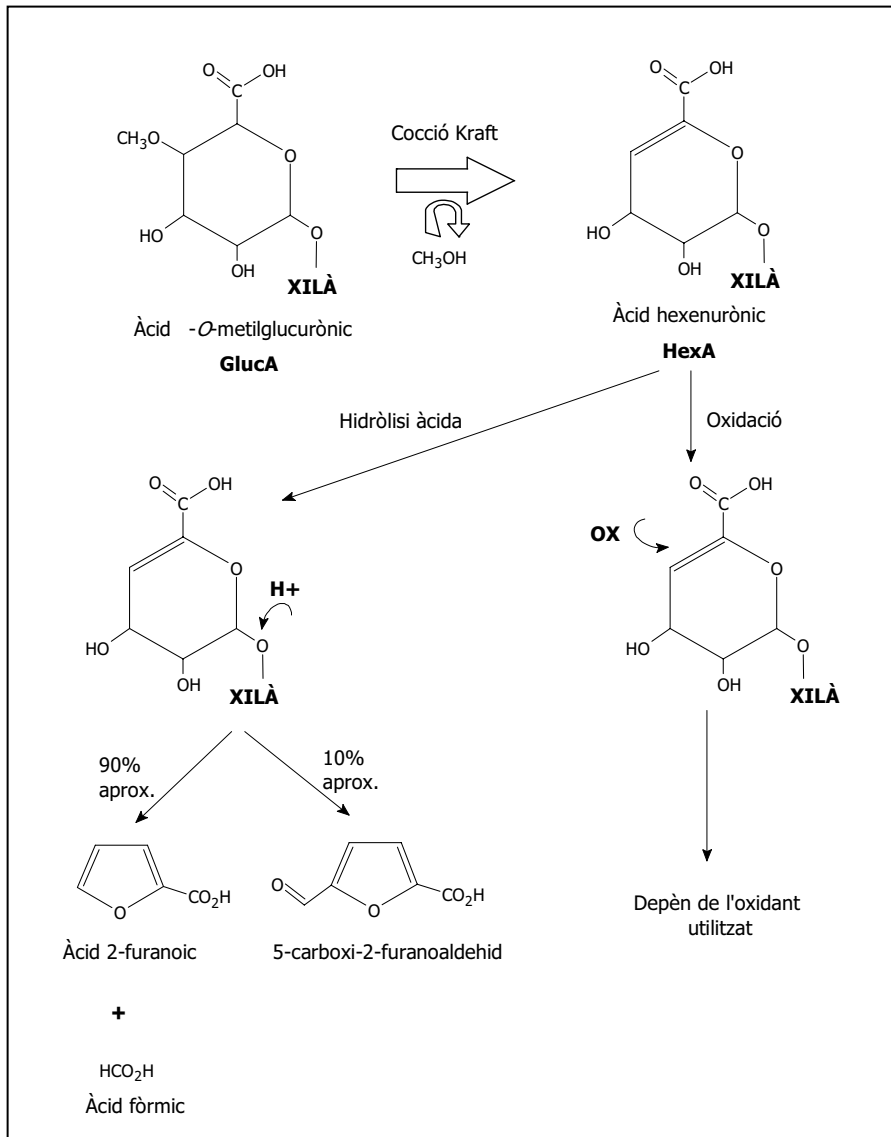


Figura 1-7. Formació dels àcids hexenurònics (HexA) i la seva destrucció mitjançant hidròlisi o oxidació

La importància de la presència de grups HexA radica en la influència que aquests tenen en el procés de blanqueig i en les propietats finals de la pasta. És conegut que els HexA tenen els següents efectes:

- 1- **Contribució a l'índex kappa:** els HexA contribueixen en el mètode estàndard de determinació de l'índex kappa el qual es realitza amb permanganat potàssic a condicions àcides. El consum de permanganat és una mesura indirecta de la quantitat de lignina present a la pasta. El permanganat potàssic reacciona amb els dobles enllaços carboni-carboni sota condicions àcides, de manera que també pot reaccionar amb els HexA per oxidació donant lloc a una mesura errònia del contingut en lignina d'una pasta (Gellerstedt i Li, 1996; Allison *et al.*, 1999; Vuorinen *et al.*, 1999; Li i Gellerstedt, 2002; Costa i Colodette, 2007)
- 2- **Consum de reactius de blanqueig:** els HexA consumeixen una quantitat important d'agents químics durant el blanqueig ja que degut a la seva naturalesa insaturada, l'àcid hexenurònic és capaç de reaccionar amb la majoria d'agents electrofílics de blanqueig, particularment aquells que siguin àcids com el clor, el diòxid de clor, l'ozó i els peràcids (Bergnor-Gidnert *et al.*, 1998; Vuorinen *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2000; Tornngren, 2002; Malinen i Nhan, 2006).
- 3- **Participació en la retenció de ions metàl·lics:** certs ions metàl·lics presents a la pasta catalitzen la descomposició d'alguns agents de blanqueig, com per exemple el peròxid d'hidrogen. Degut a la seva estructura química, els àcids HexA tenen un fort efecte quelant, inclús major que el seu propi precursor, l'àcid metilglucurònic. A més, s'ha demostrat que són els dominants de la capacitat quelant de les pastes kraft. Per tant, els HexA poden contribuir a que existeixi un elevat contingut de ions metàl·lics a la pasta, amb el conseqüent efecte negatiu en els resultats del blanqueig (Vuorinen *et al.*, 1996; Devenyns *et al.*, 1998).
- **Contribució a la reversió del grau de blanc:** l'estabilitat a la blancor és un factor especialment important en el mercat de la pasta d'eucaliptus amb elevada blancor. Diversos treballs suggereixen que l'envelliment està relacionat amb la quantitat d'HexA presents a la pasta blanquejada (Vuorinen *et al.*, 1999; Granström *et al.*, 2002; Sevastyanova *et al.*, 2006; Kawae i Uchida, 2005; Forsström *et al.*, 2007).

- 5- **Contribució a la formació d'àcid oxàlic:** l'àcid oxàlic pot formar fàcilment cristalls sòlids d'oxalat càlcic, que poden precipitar (la solubilitat d'oxalat càlcic és molt baixa) i donar lloc a seriosos problemes d'incrustacions en el circuit del procés. Alguns autors consideren que part de la formació d'àcid oxàlic és també deguda al contingut en àcids HexA (Vuorinen *et al.*, 1997; Bergnor-Gidnert *et al.*, 1998; Siltala *et al.*, 1998; Elsander *et al.*, 2000).

Per aquest motiu últimament han aparegut investigacions sobre mètodes d'eliminació d'aquests grups HexA. Els àcids hexenurònics poden ser eliminats mitjançant una hidròlisi àcida. L'enllaç entre l'àcid HexA i la cadena de xilà és més sensible a l'hidròlisi àcida que altres enllaços dels sucres, degut a la localització específica del doble enllaç. Amb l'hidròlisi àcida els HexA es converteixen als àcids 2-furanoic i fòrmic, i al 5-carboxi-2-furanoaldehyd (Figura 1-7). Com ja s'ha comentat, a causa de la presència del doble enllaç, els HexA també poden destruir-se mitjançant oxidants electrofílics tals com el clor, el diòxid de clor, l'ozó i els peràcids, donant lloc a diferents productes de reacció depenent del reactiu utilitzat (Figura 1-7).

1.5 APLICACIÓ DE XILANASES EN EL BLANQUEIG

Les xilanases són enzims hidrolítics que catalitzen la hidròlisi dels xilans. Els xilans són heteropolisacàrids complexos que comprenen β -1, -unions d'unitat de D-xilopiranososa que són altament substituïts. La biodegradació del xilà, el qual és un abundant polisacàrid a la naturalesa és un procés complex que requereix la coordinada acció de varis enzims (Figura 1-8), entre els quals les β -1, -endoxilanases, trencant enllaços interns en l'enllaç β -1, -xilosa tenen el paper principal (Beg *et al.*, 2001).

Durant la cocció alcalina de la fusta, cadenes curtes de xilans precipiten en una forma més o menys cristal·lina a la superfície de les fibres de cel·lulosa, provocant una disminució de l'accessibilitat de la paret de la fibra. Hi ha varies teories sobre la forma d'actuació de la xilanasa sobre les pastes (Pham *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1997(b); Shah *et al.*, 2000), però el seu efecte positiu en general s'atribueix a l'eliminació dels xilans que formen part de les hemicel·luloses presents a les fibres cel·lulòsiques i que es troben, en certa manera, en una situació intermèdia entre les cadenes ordenades de cel·lulosa i la fracció amorfa de la lignina. A l'eliminar aquests xilans desapareix la unió existent entre la cel·lulosa i la lignina, pel què al trobar-se aquesta última més lliure, es facilita la seva eliminació en les posteriors etapes de blanqueig (Paice *et al.*, 1992; Turner *et al.*, 1992; Kantelinen *et al.*, 1993; Pham *et al.*, 1995; Roncero *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2000; Roncero *et al.*, 2003; Shatalov i Pereira, 2007). Un pretractament amb xilanasa pot permetre estalvis en diòxid de clor (Bajpai *et al.*,

199 ; Vicuña *et al.*, 1997 i Torres *et al.*, 2000; Madlala *et al.*, 2001), el que resulta molt important actualment degut a les creixent restriccions mediambientals ja que una disminució del diòxid de clor comportaria una disminució del nivell d'AOX dels efluent (Senior i Hamilton, 1992 (b); Jean *et al.*, 199 i Aumont *et al.*, 1996).

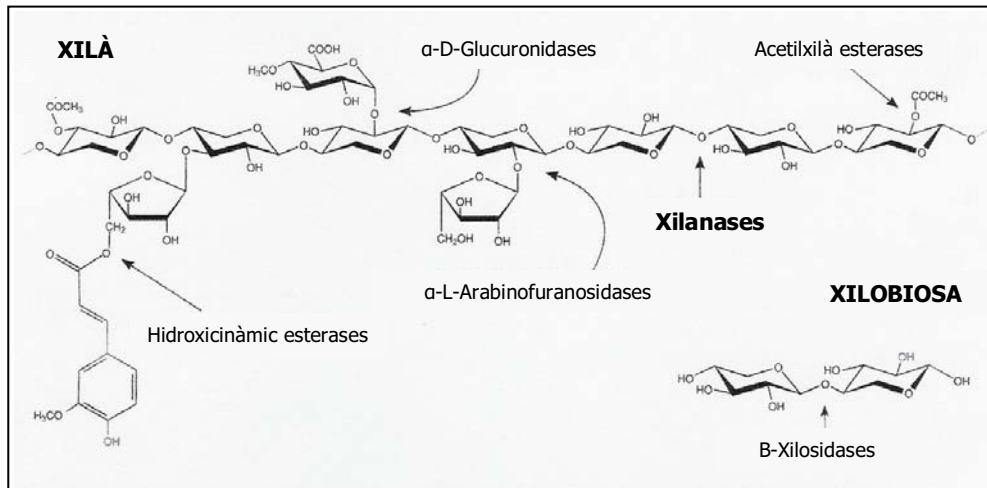


Figura 1-8. Enzims necessaris per a la degradació del xilà i llocs sobre els que actuen

Un tema important relacionat en l'ús de xilanases per l'indústria paperera, és saber si tots els tipus d'enzims tenen la capacitat de funcionar com a potenciadors del blanqueig, o bé si aquesta propietat és restringida només a un petit nombre de xilanases. Les xilanases primerament van ser classificades en dos grups segons la família de glicosil hidrolases: les de la **família 10** i les de la **família 11** (Gilkes *et al.*, 1991; Henrissat i Bairoch, 1996). Les xilanases de la família 10 són més llargues, més complexes i més diverses mentre que les de la família 11 són més petites, més consistents en estructura i més específiques de xilà. Tanmateix, també s'han trobat xilanases que pertanyen a la **família 5** (Keen *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 2005). No està clar quina de les famílies és més eficient per a ser aplicada en el blanqueig de pastes. S'han fet varis estudis amb xilanases de la família 10 i 11 com a potenciadores del blanqueig, on es diu que diferents famílies de xilanases tenen diferents habilitats en el blanqueig i diferent manera d'actuar sobre el polímer de xilà (Elegir *et al.*, 1995; Biely *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 1997; Kolenová *et al.*, 2006) però no hi ha estudis publicats en el blanqueig de pastes utilitzant xilanases de la família 5.

Nombrosos estudis sobre xilanases i l'aplicació d'aquestes en el blanqueig de pastes han fet que la **seva implantació industrial sigui simple i econòmicament factible** ja que per a l'etapa de pretractament enzimàtic amb xilanasa es pot aprofitar la torre d'alta densitat. Actualment, gran nombre de fàbriques d'Europa, Nord Amèrica,

Sud Amèrica i Japó utilitzen la tecnologia a base de xilanases per a blanquejar de forma contínua (Jean *et al.*, 199 ; Tolan *et al.*, 1996; Yee i Tolan, 1997; Tolan i Spence, 1997; Tolan i Thibault, 1997; Vicuña *et al.*, 1997 i Popovici *et al.*, 200) i a Espanya s'ha realitzat algun assaig a planta (Turner *et al.*, 1992). Varis productes de paper que inclouen paper de revista i paper tissue i que han estat tractats enzimàticament s'han introduït satisfactòriament al mercat (Viikari *et al.*, 199).

Un aspecte molt innovador relacionat en l'ús de xilanases és que aquestes **podrien reduir el contingut en àcids hexenurònics (HexA)** de les pastes. Les xilanases actuarien sobre la pasta hidrolitzant els xilans més accessibles de la superfície de la fibra els quals s'haurien format durant la cocció kraft. Aquests xilans contenen àcids HexA, per tant, eliminant aquests xilans juntament amb ells també s'eliminarien HexA.

1.6 APLICACIÓ DE LACASES EN EL BLANQUEIG

Les lacases són oxidoreductasses ligninolítiques que necessiten la presència d'oxigen per actuar i oxidar els grups fenòlics de la lignina. El seu potencial redox no és gaire elevat el què limita la seva capacitat oxidativa i a més, el seu gran pes molecular li fa difícil l'accés a la lignina de la paret cel·lular (Bourbonnais i Paice, 1995). Per aquest motiu és necessària la presència d'un mediador que és un compost de baix pes molecular que actua com intermediari redox i la seva forma oxidada és capaç de difondre's a la fibra i reaccionar amb les fraccions fenòliques i no fenòliques de la lignina i així deslignificar la pasta (Freudenreich, *et al.*, 1998) formant el conegut sistema lacasa-mediador (L) (Figura 1-9).

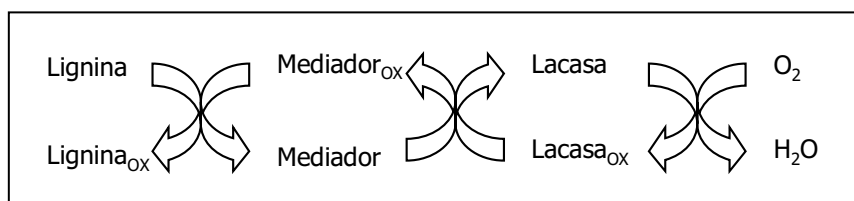


Figura 1-9. Sistema lacasa-mediador

L'efectivitat d'un sistema lacasa-mediador per a degradar lignina depèn de les propietats de la lacasa, del mediador i de la seva combinació (Li, *et al.*, 1999). Els mediadors amb grups funcionals N-OH s'oxiden al seu radical corresponent (NO·) en el tractament amb lacasa el qual és el responsable de l'alta oxidació de la lignina (Rocheffort, *et al.*, 200). Tanmateix, la seva naturalesa de radical causa alguns problemes d'estabilitat el què limita el seu ús en la deslignificació ja que pot atacar la lacasa provocant una disminució en la seva activitat (Amann, 1997). Aquesta

inactivació de la lacasa per part de la forma oxidada dels mediadors depèn del mediador utilitzat (Li, *et al.*, 1999) i representa un inconvenient pel sistema lacasa-mediador.

Un altre dels problemes que presenta el sistema lacasa-mediador és l'elevat cost i la potencial toxicitat dels mediadors i per aquest motiu s'està impulsant la recerca de nous mediadors més barats i més respectuosos pel medi ambient. L'ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonat)) va ser el primer mediador utilitzat capaç de deslignificar la pasta (Bourbonnais i Paice, 1992) però actualment han estat estudiats altres tipus de mediadors, sent els que contenen un grup funcional N-OH els mediadors de la lacasa més efectius descrits (Xu, *et al.*, 2000). Entre ells, l'**HBT** (1-hidroxibenzotriazol) sembla ser el més eficaç descrit fins el moment (García *et al.*, 2003; Camarero *et al.*, 200 ; Sigoillot *et al.*, 2005), (Figura 1-10).

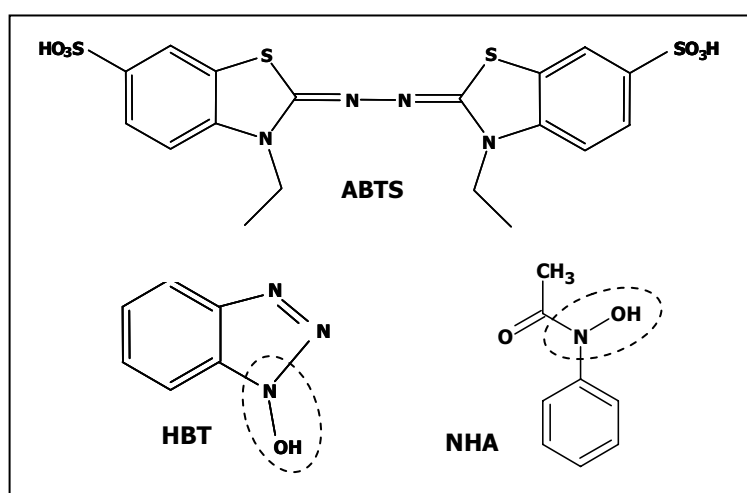


Figura 1-10. Estructura química de diferents mediadors de la lacasa

Recentment s'ha descobert l'*N*-hidroxiacetanilida (**NHA**) que és un mediador sintètic, potencialment més barat i menys tòxic que l'HBT, i, igual que aquest últim, pertany al grup de mediadors amb un grup funcional N-OH (Figura 1-10). La seva efectivitat en deslignificar la pasta ha estat demostrada (Chakar i Ragauskas, 2000; Xu *et al.*, 2001).

La utilització de lacases en el blanqueig de pastes està en fases de desenvolupament, tot i que s'han fet alguns assajos a escala pilot. El problema que tenen és la seva limitada capacitat oxidativa i que necessiten un mediador.

Recentment, la **tirosinasa** de *P.sanguineus* ha estat purificada i caracteritzada (Halaoui *et al.*, 2005) i s'ha aconseguit produir en *Aspergillus Niger* aconseguint que

l'enzim sigui secretat en quantitat important al medi extracel·lular dels cultius d' *A.niger*, la qual cosa facilita els estudis moleculars i el seu aïllament per a les aplicacions biotecnològiques (Halaouli *et al.*, 2006). Degut a les similituds que presenta la tirosinasa amb la lacasa (les dues es troben entre les oxidases que contenen coure) es vol estudiar la potencial aplicació d'aquest enzim per a blanquejar la pasta per tal de descobrir nous sistemes enzimàtics.

1.7 OBJECTIUS DE LA TESI I PLANTEJAMENT DE TREBALL

La present tesi s'emmarca dins d'una de les línees d'investigació del Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera, de la Universitat Politècnica de Catalunya, encaminada a **l'Aplicació de la Biotecnologia per al Blanqueig de Pastes.**

Es parteix de l'interès de blanquejar pasta kraft d'eucaliptus, de gran interès estratègic per Espanya i del desenvolupament de nous processos de blanqueig utilitzant nous mètodes biotecnològics amb la finalitat d'obtenir papers de característiques similars als convencionals disminuint el nivell contaminant en el blanqueig.

Basant-se en les consideracions anteriorment exposades, **l'objectiu principal** d'aquesta tesi és:

Millorar el blanqueig de la pasta kraft d'eucaliptus mitjançant el desenvolupament de noves seqüències ECF i TCF amb xilanases i lacases que augmentin la rendibilitat i efectivitat del procés

Altres objectius particulars de la tesi són:

- Millorar una seqüència industrial de blanqueig ECF (DEopD₁) amb una etapa de pretractament amb xilanasa (X)
- Descobrir noves xilanases bacterianes amb activitat potenciadora del blanqueig
- Estudi de l'efectivitat d'una xilanasa de la família 5 de les glicosil hidrolases en el blanqueig de pastes
- Efecte de les xilanases en els àcids hexenurònics de les pastes
- Efecte de les xilanases en les propietats dels efluents
- Estudi de l'efecte de les xilanases en la morfologia de les fibres, en el refí i en les propietats físiques dels papers

- Optimitzar les condicions d'aplicació del sistema lacasa-mediador (L),
- Efecte del pretractament X en potenciar l'efecte del tractament L
- Efecte del tractament L sobre els àcids hexenurònics, la lignina i la viscositat de les pastes així com sobre els esterols
- Aplicació de mediadors alternatius a l'HBT com l'NHA i recerca de nous mediadors naturals de la lacasa
- Avaluació de la tirosinasa per a blanquejar i deslignificar la pasta
- Evolució dels àcids hexenurònics al llarg dels diferents processos i efecte d'aquests en l'índex kappa de les pastes

Novetat i rellevància:

- ❖ L'elevat volum de producció de pasta d'eucaliptus per la indústria espanyola i la notable millora mediambiental que l'aplicació de noves tecnologies enzimàtiques pot causar
- ❖ Aplicació d'una xilanasa de la família 5 de les glicosil hidrolases, ja que només recentment han estat descrites xilansases d'aquesta família. No existeix fins el moment cap assaig paperer amb xilansases d'aquesta família enzimàtica.
- ❖ L'aplicació de plans experimentals per a optimitzar el sistema mediador en pastes d'eucaliptus
- ❖ Efecte del pretractament enzimàtic amb xilanasa en potenciar el tractament amb el sistema lacasa-mediador
- ❖ Aplicació de mediadors alternatius i recerca de nous sistemes enzimàtics per a blanquejar i deslignificar la pasta
- ❖ Efecte dels diferents tractaments enzimàtics amb xilansases i lacases en l'eliminació d'HexA de les pastes

Primerament es realitza un escrutini de diferents xilansases (X) noves i comercials en seqüències ECF i TCF de blanqueig. Un cop identificades les millors xilansases aquestes s'apliquen en una seqüència completa ECF XDEopD₁ on s'analitzen les diferents propietats de les pastes i efluents. Seguidament la millor xilanasa nova s'aplica en una seqüència TCF incloent una etapa amb el sistema lacasa-mediador (L). S'optimitzen les

condicions del tractament L utilitzant l'HBT com a mediador al mateix temps que s'avalua l'efecte beneficiós de l'etapa de pretractament X. Per últim s'avalua l'NHA en el tractament L així com l'aplicació de la tirosinasa. Especial importància es dona a l'evolució dels àcids hexenurònics al llarg dels diferents tractaments.

1.8 REFERÈNCIES

- Allison, R.W., Timonen, O., McGrouther, K.G. i Suckling, I.D. (1999) Hexenuronic acid in kraft pulps from radiata pine. *Appita Journal* 52(6): 8- 53.
- Amann, M. (1997) Lignozym process - coming closer to the mill. 9th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry 1: -1.
- Amin, H.M. (2006) Extended usage of xylanase enzyme to enhance the bleaching of softwood kraft pulp. *Tappi Journal* 5(1):23-26.
- Annergren, G.E. (1996) Pulp Bleaching. Principles and Practice. Capítol VII-3: Strength Properties and Characteristics of Bleached Chemical and (Chemi)mechanical Pulps. Ed. Dence i Reeve. TAPPI press:717-7 8.
- Aumont, M., Vegega, A., Elm, D.D. i Choma, P.P. (1996) Low kappa factor bleaching of oxygen delignified hardwood kraft pulp - xylanase and peroxide applications. *Pulp & Paper Canada* 97(1):72-76.
- Bajpai, P., Bhardwaj, N.K., Bajpai, P.K. i Jauhari, M.B. (199) Impact of xylanases on bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Journal of Biotechnology* 38(1):1-6.
- Bajpai, P. (200) Biological bleaching of chemical pulps. *Critical Reviews in Biotechnology* 2 (1):1-58.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. i Hoondal, G.S. (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology Biotechnology* 56:326-338.
- Bergnor-Gidnert, E., Tomani, P.E. i Dahlman, O. (1998) Influence on pulp quality of conditions during the removal of hexenuronic acids. *Nordic Pulp & Paper Research Journal* 13():310-316.
- Bidlack, J., Malonge, M. i Benson, R. (1992) Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science* 72:51-56.
- Biely, P., Vrsanská, M., Tenkanen, M. i Kluepfel, D. (1997) Endo- β -1, -xylanase families: differences in catalytic properties. *Journal of Biotechnology* 57(1-3):151-166.

- Bourbonnais, R. i Paice, M.G. (1992) Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Applied Microbiology and Biotechnology* 36:823-827.
- Bourbonnais, R. i Paice, M. (1995) Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi Journal* 79(5):199-20 .
- Buchert, J., Teleman, A., Harjunpaa, V., Tenkanen, M., Viikari, L. i Vuorinen, T. (1995) Effect of Cooking and Bleaching on the Structure of Xylan Conventional Pine Kraft Pulp. *Tappi Journal* 78(11):125-130.
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., del Rio, J.C., Gutierrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martinez, M.J. i Martinez, A.T. (200) Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology* 35(2-3):113-120.
- Chakar, F.S. i Ragauskas, A.J. (2000) Effects of oxidative alkaline extraction stages after laccase_{HBT} and laccase_{NHAA} treatments-an NMR study of residual lignins. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 20(2):169-18 .
- Clarke, J.H., Rixon, J.E., Ciruela, A., Gilbert, H.J. i Hazlewood, G.P. (1997) Family-10 and family-11 xylanases differ in their capacity to enhance the bleachability of hardwood and softwood paper pulps. *Applied Microbiology and Biotechnology* 8:177-183.
- Collins, T., Gerday, C. i Feller, G. (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews* 29(1):3-23.
- Confederation of European Paper Industries (2001) CEPI Annual Statistics 2000. CEPI (www.cepi.org), Brussels.
- Costa, M.M. i Colodette, J.L. (2007) The impact of kappa number composition on eucalyptus kraft pulp bleachability. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2 (1):61-71.
- Daniel, A.I.D., Neto, C.P., Evtuguin, D.V. i Silvestre, A.J.D. (2003) Hexenuronic acid contents of Eucalyptus globulus kraft pulps: Variation with pulping conditions and effect on ECF bleachability. *Tappi Journal* 2(5):3-8.
- Danielsson, S., Kisara, K. i Lindstrom, M.E. (2006) Kinetic study of hexenuronic and methylglucuronic acid reactions in pulp and in dissolved xylan during kraft pulping of hardwood. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 5(7):217 -2178.
- del Río, J.C., Gutiérrez, A., Camarero, S. i Martínez, A.T. (2001) Lignin and hemicellulose analysis during manufacturing of high-quality flax and kenaf alkaline

- pulps. Proceedings of the 11th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Nissa, França 3:523-526.
- Dence, C.W. (1996) Pulp Bleaching. Principles and Practice. Capítol III-3: Chemistry of Chemical Pulp Bleaching. TAPPI Press:125-159.
- Devenyns, J., Chauveheid, E. i Mårtens, H. (1998) Uronic acids and metals control. International Pulp Bleaching Conference 1:151-157.
- Elegir, G., Sykes, M. i Jeffries, T.W. (1995) Differential and synergistic action of streptomyces endoxylanases in prebleaching of kraft pulps. Enzyme and Microbial Technology 17(10):95 -959.
- Elsander, A., Ek, M. i Gellerstedt, G. (2000) Oxalic acid formation during ECF and TCF bleaching of kraft pulp. Tappi Journal 83(2):73-77.
- Fengel, D. i Wegener, G. (198) Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. De Gruyter, Berlin.
- Forsstrom, A., Wackerberg, E., Greschik, T., Jour, P. i Holtinger, L. (2007) Alta estabilidade de alvura em sequencias ECF padrao (High brightness stability in standard ECF sequences). O Papel (Brazil) 68(10):101-112.
- Freudenreich, J., Amann, M., Fritz-Langhals, E. i Stohrer, J. (1998) Understanding the Lignozym- Process. International Pulp Bleaching Conference 1:71-76.
- García Hortal, J.A. i Colom, J.F. (1992) El proceso al sulfato. Vol. I 2ª Edición revisada y ampliada. 1 ed. : Publicaciones de la U.P.C.. 201 p. ISBN: 7653-1990.
- García Hortal, J.A. (2007) Fibras Papeleras. Ed. Barcelona: Edicions UPC. 2 3 p. ISBN: 978-8 -8301-916-0.
- Garcia, O., Camarero, S., Colom, J.F., Martinez, A.T., Martinez, M.J., Monje, R. i Vidal, T. (2003) Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. Holzforschung 57(5):513-519.
- Gellerstedt, G. i Li, J. (1996) An HPLC method for the quantitative determination of hexeneuronic acid groups in chemical pulps. Carbohydrate Research 29 : 1- 5.
- Gilkes, N.R., Henrissat, B., Kilburn, D.G., Miller, R.C., Jr i Warren, R.A. (1991) Domains in microbial beta-1, -glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. Microbiology and Molecular Biology Reviews 55(2):303-315.
- Granstrom, A., Gellerstedt, G. i Eriksson, T. (2002) On the chemical processes occurring during thermal yellowing of a TCF-bleached birch kraft pulp. Nordic Pulp and Paper Research Journal 17(): 27- 33.

- Grant, R. (1992) Enzymes reveal plenty more potential. *Pulp and Paper International* 3 (12):75-76.
- Halaouli, S., Asther, M., Kruus, K., Guo, L., Hamdi, M., Sigoillot, J.C., Asther, M. i Lomascolo, A. (2005) Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *Journal of Applied Microbiology* 98:332-3 3.
- Halaouli, S., Record, E., Casalot, L., Hamdi, M., Sigoillot, J., Asther, M. i Lomascolo, A. (2006) Cloning and characterization of a tyrosinase gene from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*, and overproduction of the recombinant protein in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70:580-589.
- Henrissat, B. i Bairoch, A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal* 316:695-696.
- Higuchi, T. (1985) *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. Academic Press, Orlando.
- Ibarra, D. (2006) *Tecnologías limpias para el blanqueo libre de cloro de pastas de papel: Modificación enzimática de la lignina residual*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Madrid, 2006.
- Jean, P., Hamilton, J. i Senior, D.J. (199) Mill trial experiences with xylanase: aox and chemical reductions. *Pulp & Paper Canada* 95(12):126-128.
- Jiang, Z., Van Lierop, B. i Berry, R. (2000) Hexenuronic acid groups in pulping and bleaching chemistry. *Tappi Journal* 83 (1):167-175.
- Johansson, D. i Germgard, U. (2006) The relationship between xylan and hexenuronic acid in eucalyptus kraft pulping. *O Papel* 67(10):8 -91.
- Kantelinen, A., Hortling, B., Sundquist, J., Linko, M. i Viikari, L. (1993) Proposed mechanism of the enzymatic bleaching of kraft pulp with xylanases. *Holzforschung* 7:318-32 .
- Kawae, A. i Uchida, Y. (2005) Heat and moisture-induced yellowing of ECF-light bleached hardwood kraft pulp. *Appita Journal* 58(5):378-381.
- Keen, N.T., Boyd, C. i Henrissat, B. (1996) Cloning and characterization of a xylanase gene from corn strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9:651-657.
- Kolenova, K., Vrsanska, M. i Biely, P. (2006) Mode of action of endo- β -1, -xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *Journal of Biotechnology* 121(3):338-3 5.

- Li, J. i Gellerstedt, G. (2002) Oxymercuration-demercuration kappa number: An accurate estimation of the lignin content in chemical pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 17: 10- 1 .
- Li, K., Xu, F. i Eriksson, K.E.L. (1999) Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6):265 -2660.
- Madlala, A.M., Bissoon, S., Singh, S. i Christov, L. (2001) Xylanase-induced reduction of chlorine dioxide consumption during elemental chlorine-free bleaching of different pulp types. *Biotechnology Letters* 23:3 5-351.
- Malinen, R.O. i Nhan, D.T.T. (2006) Control of hexenuronic acid content in bleached pulp and its effects on optical properties of pulp. 60th Appita Annual Conference and Exhibition. Melbourne, Australia. 2006:289-296.
- Nimz, H. (197) Beech lignin-Proposal of a constitutional scheme. *Angewandte Chemie International Edition* 13:313-321.
- Paice, M.G., Gurnagul, N., Page, D.H. i Jurasek, L. (1992) Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology* 1 ():272-276.
- Parham, R.A. (1983) *Pulp and Paper Manufacture. Vol. 1. Properties of Fibrous Raw Materials and their Preparation for Pulping. VI Ultrastructure and Chemistry.* Ed. M.J. Kocurek i C.F.B. Stevens. Joint Textbook Committee of the Paper Industry:35- 5.
- Pham, P.L., Alric, I. i Delmas, M. (1995) Incorporation of xylanase in total chlorine free bleach sequences using ozone and hydrogen peroxide. *Appita Journal* 8(3):231-217.
- Popovici, C., Messier, M., Thibault, L. i Charron, D. (200) Multiples avantages du xylanase dans une usine nexfor papiers fraser de pâte kraft de feuillus. *Pulp & Paper Canada* 105(12):278-281.
- Reeve, D.W. (1996) *Pulp Bleaching. Principles and Practice. Capítol I-1. Introduction to the Principles and Practice of Pulp Bleaching.* Ed. Dence i Reeve. TAPPI Press. Atlanta. USA:1-2 .
- Rocheftort, D., Leech, D. i Bourbonnais, R. (200) Electron transfer mediator systems for bleaching of paper pulp. *Green Chemistry* 6:1 -2 .
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. i Vidal, T. (2000) Effects of a xylanase treatment on fibre morphology in totally chlorine free bleaching (TCF) of Eucalyptus pulp. *Process Biochemistry* 36: 5-50.

- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. i Vidal, T. (2003) Effect of xylanase on ozone bleaching kinetics and properties of Eucalyptus kraft pulp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 78(1):1023-1031.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. i Vidal, T. (2005) The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps. *Bioresource Technology* 96(1):21-30.
- Rydholm, S.A. (1967) *Pulping Processes. Parte 1. Wood. Fiber Morphology.* Ed. S.A. Rydholm. Interscience Publishers, John Wiley and Sons:69-89.
- Santos, A., Rodriguez, F., Gilarranz, M., Moreno, D. i Garcia-Ochoa, F. (1997) Kinetic modeling of kraft delignification of Eucalyptus globulus. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 36(10): 11 - 125.
- Senior, D.J. i Hamilton, J. (1992 (a)) Biobleaching with xylanases brings biotechnology to reality. *Pulp & Paper* 66 (9):111-111 .
- Senior, D.J. i Hamilton, J. (1992 (b)) Use of xylanases to decrease the formation of AOX in kraft pulp bleaching. *Journal of Pulp and Paper Science* 18(5):165-168.
- Sevastyanova, O., Li, J. i Gellerstedt, G. (2006) Influence of various oxidizable structures on the brightness stability of fully bleached chemical pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 21: 9-53.
- Shah, A.K., Cooper, D., Adolphson, R. i Eriksson, K.E.L. (2000) Xylanase treatment of oxygen-bleached hardwood kraft pulp at high temperature and alkaline pH levels gives substantial savings in bleaching chemicals. *Journal of Pulp and Paper Science* 26(1):8-11.
- Shatalov, A.A. i Pereira, H. (200) Uronic (hexenuronic) acid profile of ethanol-alkali delignification of giant reed *Arundo donax* L. *Cellulose* 11(1):109-117.
- Shatalov, A.A. i Pereira, H. (2007) Xylanase pre-treatment of giant reed organosolv pulps: Direct bleaching effect and bleach boosting. *Industrial Crops and Products* 25(3):2 8-256.
- Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Perez-Boada, M., Martinez, M.J., Sigoillot, J.C., Asther, M., Colom, J.F. i Martinez, A.T. (2005) Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal of Biotechnology* 115():333-3 3.
- Siltala, M., Winberg, K., Henricson, K. i Lönnberg, B. (1998) Mill scale application for selective hydrolysis of hexenuronic acid groups in TCF bleaching of kraft pulp. *International Pulp Bleaching Conference* 1:279-287.

- Sjöström, E. (1993) Wood chemistry. Fundamentals and Applications. Second edition, Academic Press Inc., San Diego.
- Teleman, A., Harjunpaa, V., Tenkanen, M., Buchert, J., Hausalo, T., Drakenberg, T. i Vuorinen, T. (1995) Characterization of 4-O-Deoxy-Beta-L-Threo-Hex-2-Enopyranosyluronic Acid Attached to Xylan in Pine Kraft Pulp and Pulping Liquor by H-1 and C-13 NMR-Spectroscopy. Carbohydrate Research 272(1):55-71.
- Tolan, J.S., Olson, D. i Dines, R.E. (1996) Survey of mill usage of xylanase. Proceedings of the 211th National Meeting of the American Chemical Society. New Orleans, LA, USA.:25-35.
- Tolan, J.S. i Spence, M. (1997) On-line tracer system to improve enzyme performance. Pulp & Paper Canada 98(2):57-61.
- Tolan, J.S. i Thibault, L. (1997) Decreasing ECF bleaching costs with enzymes in a mill with oxygen delignification. Pulp & Paper Canada 98(12):17-150.
- Torngren, A. (2002) Hexenuronic acid reactions in chlorine dioxide bleaching - Aspects on in situ formation of molecular chlorine. Nordic Pulp and Paper Research Journal 17(2):179-182.
- Torres, A.L., Roncero, M.B., Colom, J.F., Pastor, F.I.J., Blanco, A. i Vidal, T. (2000) Effect of a novel enzyme on fibre morphology during ECF bleaching of oxygen delignified Eucalyptus kraft pulps. Bioresource Technology 74 :135-140.
- Turner, J.C., Skerker, P.S., Burns, B.J., Howard, J.C., Alonso, M.A. i Andres, J.L. (1992) Bleaching with enzymes instead of chlorine-mill trials. Tappi Journal 75(12):83-89.
- van Lierop, B., Skothos, A. i Liebergott, N. Pulp Bleaching. Principles and Practice. Capítol IV-5: Ozone delignification. Ed. Dence i Reeve. TAPPI press:321-335.
- Vicuña, R., Escobar, F., Osses, M. i Jara, A. (1997) Bleaching of eucalyptus Kraft pulp with commercial xylanases. Biotechnology Letters 19 (6):575-578.
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. i Linko, M. (1997) Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. FEMS Microbiology Reviews 13(2):335-350.
- Vuorinen, T., Teleman, A., Fagerström, P., Buchert, J. i Tenkanen, M. (1996) Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps. International Pulp Bleaching Conference: 3-51.
- Vuorinen, T., Fagerström, P., Räsänen, E., Vikkula, A., Henricson, K. i Teleman, A. (1997) Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups opens new possibilities for development of bleaching processes. 9th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry: Montreal - Canada.

- Vuorinen, T., Fagerström, P., Buchert, J., Tenkanen, M. i Teleman, A. (1999) Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps. *Journal of Pulp and Paper Science* 25 (5):155-162.
- Wong, K.K.Y., Jong, E.D., Saddler, J.N. i Allison, R.W. (1997) Mechanisms of xylanase aided bleaching of kraft pulp. Part 2: Target substrates. *Appita Journal* 50(6):509-518.
- Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H.J.W., Abbate, E., Galinyte, V. i Schneider, P. (2000) Redox chemistry in laccase-catalysed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5):2052-2056.
- Xu, F., Deussen, H.J.W., Lopez, B., Lam, L. i Li, K. (2001) Enzymatic and electrochemical oxidation of N-hydroxy compounds. *European Journal of Biochemistry* 268: 169- 176.
- Yee, E. i Tolan, J.S. (1997) Three years experience running enzymes continuously to enhance the bleaching at Weyerhaeuser Prince Albert. *Pulp & Paper Canada* 98(10): 2- 9.