

Capítol 3

Efecte d'una nova xilanasa i de dues comercials en potenciar el blanqueig en seqüències XD i XP. Selectivitat de les etapes D i P

RESUM

Una xilanasa nova i dues comercials s'apliquen a la pasta kraft d'*Eucalyptus globulus* deslignificada amb oxigen en seqüències XD i XP. S'avalua l'efectivitat d'aquestes xilanasas en les propietats de les pastes i per cromatografia en capa fina dels efluent en comparació amb la seqüència del blanc. La xilanasa comercial X_c és la més efectiva en potenciar la deslignificació i blanqueig per part del diòxid de clor i el peròxid d'hidrogen i aquesta efectivitat es relaciona amb la major acció d'aquesta sobre el polímer de xilà. Es compara l'efectivitat dels dos agents de blanqueig (D i P) tant pel què fa a les propietats de les pastes com pel què fa als OXE utilitzats per a cada reactiu i els resultats porten a escollir la seqüència XD com la més selectiva per a estudiar els pretractaments enzimàtics amb xilanasas.

3.1 INTRODUCCIÓ

Degut a l'aparició en els últims anys de noves legislacions reguladores dels processos contaminants, la planta de blanqueig de les indústries papereres ha hagut de dur a terme diferents modificacions ja que els productes químics clorats provoquen una gran contaminació degut a la formació d'AOX que van a parar als efluent (Colom *et al.*, 2001; Freire *et al.*, 2003 i 2004).

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 xilanasas determina una molt important millora tecnològica degut a que la seva aplicació potencia l'efecte blanquejant dels agents químics tant en seqüències ECF (Siles *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 1997) com TCF (Roncero *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 1998), permetent un important estalvi dels mateixos (Torres *et al.*, 2000) i, més important, disminuint notablement la generació de contaminants en el procés de

blanqueig (Amin, 2006). A més, la incorporació de xilanases en una fàbrica de pastes és simple i econòmicament factible (Maddern *et al.*, 1993; Tolan i Spence, 1997) ja que es pot introduir a la seqüència de blanqueig sense haver de fer grans inversions en fàbrica i algunes fàbriques ja l'han incorporat amb resultats satisfactoris (Popovici *et al.*, 2004).

La xilanasa és un enzim que catalitza la degradació dels xilans. 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 (Turner *et al.*, 1992; Pham *et al.*, 1995).

La capacitat de blanqueig no és general entre les xilanases havent-se descrit notables diferències entre diferents enzims xilanolítics (Patel *et al.*, 1993; Biely *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 1997) i a més, la eficiència d'una determinada xilanasa depèn del tipus de pasta utilitzada. Cal destacar que l'espècie fustera utilitzada majoritàriament per a la indústria paperera espanyola és d'eucaliptus, el que fa interessant estudiar-ne l'aplicació de xilanases. Per tal d'aconseguir una correcta implantació d'enzims en el procés de blanqueig de la pasta d'eucaliptus es fa necessari un estudi sistemàtic de l'aplicabilitat de diferents tipus de xilanases.

L'objectiu d'aquest capítol és realitzar un anàlisi d'actuació d'una nova xilanasa de laboratori i de dues xilanases comercials, realitzant posteriorment a l'etapa de pretractament enzimàtic una etapa de blanqueig àcida amb diòxid de clor o bé una etapa de blanqueig alcalina amb peròxid d'hidrogen. Paral·lelament es duen a terme controls de pasta blanquejada sense enzim. S'estudia la influència del tractament enzimàtic en les propietats de les pastes d'índex kappa, blancor i viscositat així com de la cromatografia en capa fina dels efluents i finalment s'avalua l'efectivitat dels dos agents de blanqueig tant pel què fa a les propietats de les pastes com als equivalents d'oxidació (OXE) utilitzats per a cada reactiu.

3.2 MATERIALS I MÈTODES

3.2.1 Matèria prima

La matèria prima utilitzada en aquest capítol és pasta kraft d'*Eucalyptus globulus*, deslignificada amb oxigen. És de procedència industrial i produïda per l'empresa Torraspapel, S.A. Les característiques inicials d'aquesta pasta són les que s'indiquen a la Taula 3-1.

Taula 3-1. Propietats de la pasta inicial

	Pasta inicial
Índex kappa	9,2
Blancor (%ISO)	50,2
Viscositat (mL/g)	958±24

3.2.2 Enzims

La xilanasa nova utilitzada és la xilanasa X_A que correspon a la Xyn B de *Paenibacillus barcinonensis* la qual ha estat clonada i caracteritzada pel Departament de Microbiologia de la Universitat de Barcelona a partir d'una soca bacteriana amb elevat poder xilanolític (Blanco *et al.*, 1996; Gallardo *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2005; Gallardo *et al.*, 2007). Aquest enzim defineix un nou tipus de xilanasa que té com a tret distintiu la seva localització intracel·lular, fet que la diferencia clarament de la resta de xilanases descrites fins el moment, les quals són secretades a l'exterior del microorganisme productora.

Les dues xilanases comercials utilitzades han estat subministrades per Buckmann Laboratories Ibérica S.A. i són les xilanases X_B (BZM 2511) i X_C (BZM 2514). Al laboratori de la UB s'han desenvolupat les seves condicions d'aplicació les quals resulten ser de gran interès pel blanqueig de les pastes d'eucaliptus.

Al laboratori de la UB s'ha mesurat l'activitat d'aquests enzims mitjançant el mètode Somogy-Nelson que consisteix en incubar el substrat a les seves condicions d'aplicació en la pasta i mesurar el sucre reductor alliberat; també es mesura l'activitat residual al cap de dues hores d'emmagatzemat a condicions d'assaig.

3.2.3 Blanqueig

Les seqüències de blanqueig realitzades són **XD** (ECF) i **XP** (TCF), on:

- **X**: Pretractament enzimàtic amb xilanasa

- **D:** Blanqueig amb diòxid de clor
- **P:** Blanqueig amb peròxid d'hidrogen

Les condicions d'aplicació d'aquestes etapes es detallen a continuació. L'equip i mètodes utilitzats s'especifiquen al Capítol 2 (Materials i Mètodes).

3.2.3.1 Seqüències de blanqueig

Per tal d'assegurar-se que els efectes en les propietats de les pastes són deguts únicament a l'enzim i no a les condicions del propi tractament, és necessari fer paral·lelament als tractaments enzimàtics un blanc (X_0) que consisteix en realitzar una etapa X a les mateixes condicions del tractament enzimàtic (consistència, temps, tampó, temperatura, pH) però sense afegir-hi l'enzim; la resta d'etapes es fan igual per blanc i enzim. Tal com es mostra a la Taula 3-2, les condicions d'aplicació a l'etapa X són diferents per a cada xilanasa, la qual cosa fa necessari realitzar una seqüència del blanc per a cada enzim. Per tant, tenint en compte que es disposa de tres xilanases, que per a cadascuna s'ha de realitzar un blanc, que es realitza també un blanc amb *Escherichia coli* (*E.coli*) i que són dues les seqüències a estudiar en cada cas (XD i XP), són 14 les seqüències que s'han realitzat.

Degut a que els tractaments del blanc provoquen canvis en les propietats de les pastes que depenen de les condicions de tractament, cada tractament amb xilanasa s'ha de comparar amb el seu blanc corresponent la qual cosa dificulta la comparació de resultats entre xilanases. Per tal de facilitar la interpretació de resultats s'igualen tots els blancs en un de sol, és a dir, s'escull un blanc comú per a tots els tractaments, es calcula per a totes les propietats de les pastes la diferència amb el seu blanc corresponent i aquesta diferència es resta del blanc comú. Així doncs, les seqüències estudiades queden en les següents:

- **X_0D i X_0P :** seqüències del blanc a on a l'etapa X no se li afegeix l'enzim.
- **$X_{0EC}D$ i $X_{0EC}P$:** seqüències del blanc amb *E.coli* a on a l'etapa X se li afegeix l'extracte enzimàtic X_{1A} sense activitat xilanasa.
- **$X_{1A}D$ i $X_{1A}P$:** tractaments amb la xilanasa nova X_A a dosi d'una unitat per gram de pasta seca
- **$X_{1B}D$ i $X_{1B}P$:** tractaments amb la xilanasa comercial X_B a dosi d'una unitat per gram de pasta seca
- **$X_{1C}D$ i $X_{1C}P$:** tractaments amb la xilanasa comercial X_C a dosi d'una unitat per gram de pasta seca

on està referenciat en cada cas el tipus de tractament aplicat a l'etapa X, sent el primer subíndex la dosi d'enzim utilitzada (0 en cas del blanc i 1 al afegir-hi enzim) i el

segon subíndex l'enzim utilitzat (X_A , X_B o X_C). Una unitat d'enzim és definida com la quantitat d'enzim requerida per a produir 1 μmol de grups aldehid per minut.

3.2.3.2 Pretractament enzimàtic amb xilanasa (X)

Les condicions d'aplicació de l'etapa X depenen de l'enzim utilitzat en cada cas i es mostren especificades a la Taula 3-2.

Taula 3-2. Característiques i condicions d'aplicació de les xilanases utilitzades

Tract.	Dosi (U/gps)	Temp (°C)	pH	Tampó (50 mM)	Temps (h)	Cons (%)
X_0	0	40-70	6-8	Tris-HCl/fosfat		
X_{1B}	1	60	8	Tris-HCl	2	10
X_{1C}	1	70	6			
X_{1A}	1	40	8	Fosfat		

3.2.3.3 Etapa de blanqueig amb diòxid de clor (D)

L'etapa D es realitza al 10% de consistència, a una temperatura de 56°C durant 60 minuts al 3% de diòxid de clor sps com a clor actiu.

3.2.3.4 Etapa de blanqueig amb peròxid d'hidrogen (P)

L'etapa P es realitza al 5% de consistència, a 90°C de temperatura, durant 120 minuts, al 3% sps de peròxid d'hidrogen, a l'1,5% sps de NaOH, a l'1% sps de DTPA i al 0,2% sps de MgSO_4 .

3.2.4 Caracterització de les pastes

Per a la caracterització de les pastes s'ha determinat l'índex kappa, la blancor i la viscositat segons la normativa ISO corresponent, especificada al capítol 2 (Materials i Mètodes). Aquestes propietats són mesurades de cada seqüència després de cada etapa de blanqueig per tal d'estudiar l'evolució del procés i poder comparar les pastes tractades enzimàticament amb les pastes del blanc.

A partir de l'índex kappa s'ha calculat el percentatge de decrement d'Ik o deslignificació segons l' Eq. 3-1.

$$\text{Deslignificació (\%)} = \frac{Ik_i - Ik_f}{Ik_i} * 100 \quad \text{Eq. 3-1}$$

on,

I_{k_i} = índex kappa de la pasta inicial

I_{k_f} = índex kappa després de cada etapa (X, D o P)

3.2.5 Caracterització dels efluent

Per a la caracterització dels efluent, s'ha mesurat el pH final, el diòxid de clor residual a l'etapa D, el peròxid d'hidrogen residual a l'etapa P i la cromatografia en capa fina dels efluent de cada etapa segons la normativa corresponent especificada al capítol 2.

Per a la cromatografia en capa fina, a cada extrem de la placa s'hi aplica una mescla de patrons que inclou un patró de xiloses (X1, X2, X3 i X4), de glucoses (G1, G2, G3, G4 i G5) i d'àcids urònics (Ur), i a la banda central i a la segona fila de l'extrem dret s'hi aplica un patró d'àcids urònics sol. Al centre s'hi apliquen les diferents mostres, cadascuna per duplicat.

3.2.6 Determinació de l'activitat enzimàtica

La majoria de fàbriques de pasta actuen a condicions de pH alcalí, altes temperatures i temps curts de retenció el que ha portat al desenvolupament d'enzims que actuïn en aquestes condicions (Loutfi, 1993). Les condicions òptimes d'aplicació de les tres xilanases utilitzades s'han determinat prèviament al laboratori i resulten ser de gran interès per a ser aplicades industrialment ja que actuen a pH alcalí i a altes temperatures. Per tal de veure l'activitat xilanasa al cap de les 2 hores de tractament, s'ha determinat l'activitat d'aquestes xilanases en les condicions d'aplicació sobre la pasta a temps inicial i al cap de 2 hores d'incubació de l'enzim en les condicions d'assaig determinades per a cadascuna tal com es mostra a la Taula 3-3; en aquesta taula s'observa que l'activitat de les dues xilanases comercials és bastant més alta que la de la xilanasa nova X_A . D'altra banda, les dues xilanases comercials X_B i X_C perden activitat al cap de dues hores de tractament, sobretot la X_C la qual es queda sense activitat al final del tractament, mentre que la xilanasa nova X_A es manté estable al cap de dues hores de tractament, i aquesta característica la podria fer interessant per a la reutilització de l'enzim.

Taula 3-3. Activitat enzimàtica determinada a la UB dels enzims a les condicions de tractament

		Activitat (U/mL) Assaigs de 15 min		µmol/mL (alliberades del substrat després de 2 h d'incubació en les condicions d'assaig)	
		EXU/mL	Residual després de 2 h d'incubació a condicions d'assaig	Teòrics (segons activitat en assaigs de 15 min)	Reals (alliberats en 2 h d'incubació)
X _A	pH 8/ 40°C	33	33,5 (100%)	3975	3706 (93%)
X _B	pH 8/ 60°C	4085	3183 (78%)	490202	285554 (58%)
X _C	pH 6/ 70°C	4477	0 (0%)	537261	198391 (37%)

3.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

Primerament s'analitza l'efecte de cada pretractament amb xilanasa en les propietats de les pastes i efluents sempre en comparació amb els efectes que es produeixen a la seqüència del blanc. Seguidament s'avalua la selectivitat de les etapes D i P tant pel què fa a les propietats de les pastes com pel què fa als OXE consumits en cada etapa.

3.3.1 Efecte de les xilanases en les propietats de les pastes

Els resultats en les propietats d'índex kappa i blancor de les pastes després de les etapes X, D i P es mostren a la Taula 3-4.

Taula 3-4. Índex kappa i blancor de les experiències realitzades després de cada etapa

	X		XD		XP	
	Ik	BI (%ISO)	Ik	BI (%ISO)	Ik	BI (%ISO)
X ₀	8,5	47,1	3,6	74,2	6,8	69,9
X _{0EC}	8,5	47,1	3,6	74,5	6,9	69,9
X _{1A}	8,2	47,6	3,8	74,4	6,9	68,7
X _{1B}	7,9	47,9	3,6	75,6	7,1	71,5
X _{1C}	8,1	48,6	2,9	75,2	6,0	73,2

Cal destacar que quan es comenten els efectes de les xilanases en aquestes propietats sempre es fa en relació a la seqüència del blanc; en treballs anteriors (Siles *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 2000) també s'avaluen els efectes de xilanases noves i comercials en el blanqueig ECF de pastes d'eucaliptus però els resultats es comparen amb una seqüència control on no es realitza l'etapa X₀. Segons els resultats obtinguts, s'observa

que el tractament X_0 també produeix efectes en les propietats de les pastes i efluents el que fa necessari realitzar aquest tractament per tal d'assegurar-se que els efectes són deguts a la xilanasa i no a les condicions del propi tractament. També s'han realitzat blancs amb l'extracte d'*E.coli* per a comprovar que l'extracte en el qual es subministra la xilanasa X_A no produeix efectes en les pastes i efluents.

3.3.1.1 Efecte de les xilanases en l'índex kappa de les pastes

A la Figura 3-1 (a) estan representats els resultats d'índex kappa després de cada etapa de la seqüència del blanc i de les seqüències amb les tres xilanases.

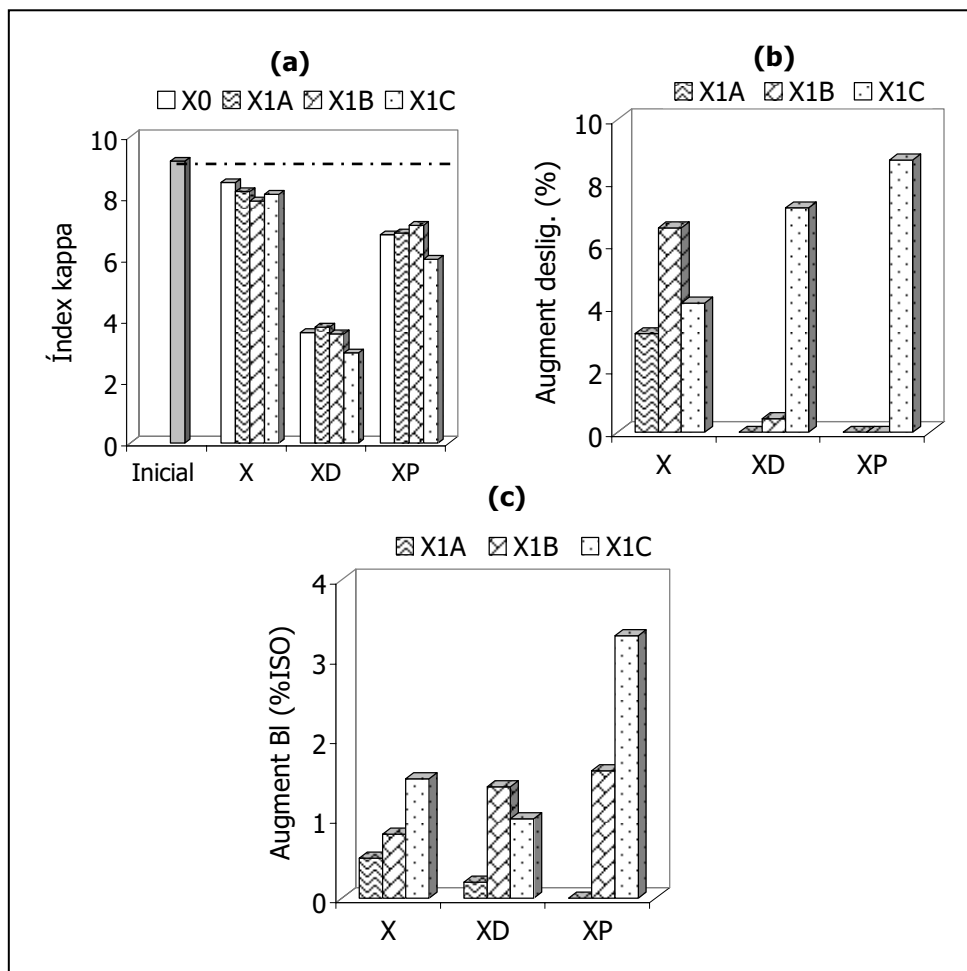


Figura 3-1. Índex kappa de la pasta inicial i de cada seqüència de blanqueig després de cada etapa (a). Augment en deslignificació (b) i en blancor (c) dels tractaments amb xilanasa respecte la seqüència del blanc

Després de l'etapa X, els tres tractaments on s'hi ha afegit xilanasa presenten un índex kappa inferior al blanc, sent el valor més baix el corresponent al tractament amb la xilanasa comercial X_B . Tanmateix, després de les etapes D i P, només amb la xilanasa X_C l'índex kappa al què s'arriba és inferior al que s'assoleix amb la seqüència del blanc.

Aquests mateixos resultats s'expressen en augment en deslignificació que produeix cada xilanasa en comparació amb la seqüència del blanc (és a dir, es calcula la deslignificació respecte la pasta inicial després de cada etapa i tractament i dels tractaments amb xilanasa se li resta la deslignificació que es produeix en el blanc) tal com es mostra a la Figura 3-1 (b). En una etapa X, els tres tractaments amb xilanasa augmenten la deslignificació veient-se el major efecte a l'aplicar la xilanasa X_B on la deslignificació augmenta un 6%; el segueix la xilanasa X_C amb un augment del 4% i per últim la xilanasa nova X_A que l'augmenta un 3%. La finalitat d'aplicar un pretractament amb xilanasa no és que a la mateixa etapa X es produeixi deslignificació sinó que es potenciï l'efecte dels reactius en posteriors etapes de blanqueig, el fet que augmenti la deslignificació en aquesta etapa pot ser degut a que les xilanases hagin hidrolitzat xilans que continguin àcids hexenurònics els quals és conegut que contribueixen a l'índex kappa (Li i Gellerstedt, 1997), o bé xilans que formin part de complexes lignina-xilà (Wong *et al.*, 1997(b)). D'altra banda, després de les etapes D i P (seqüències XD i XP), la deslignificació de les seqüències amb xilanasa només es veu incrementada respecte el blanc a l'aplicar el pretractament amb la xilanasa comercial X_C (3% a l'etapa D, i 5% a l'etapa P), i es pot dir que és degut a que a l'haver quedat la fibra més accessible després del tractament X_{1C} , els reactius de blanqueig hi han penetrat millor.

3.3.1.2 Efecte de les xilanases en la blancor de les pastes

Els resultats de blancor de les pastes (Taula 3-4) demostren que un pretractament enzimàtic amb xilanasa fa augmentar la blancor de les pastes, efecte que depèn de la xilanasa utilitzada. A la Figura 3-1 (c) es mostra l'augment de blancor (%ISO) de les seqüències tractades amb xilanasa respecte la seqüència del blanc, i s'observa que una etapa de pretractament enzimàtic (X) provoca un augment en la blancor de la pasta tant a l'aplicar la xilanasa nova X_A com les dues xilanases comercials X_B i X_C , tot i que el major augment es dona a l'aplicar la xilanasa comercial X_C (1,5%ISO). Aquest augment de blancor produït degut a l'efecte de les xilanases ja havia estat observat per altres autors (Wong *et al.*, 1997(a)) i pot ser degut tant per a l'eliminació de lignina que es produiria degut a la hidròlisi de xilà que formaria part de complexes lignina-xilà (ja que en el polímer de xilà partícules residuals de lignina es troben rodejades i atrapades (Bajpai, 2004)), com també podria ser degut a l'alliberació de compostos colorejats dels hidrats de carboni que és conegut que es formen durant la

cocció kraft (Mateo, 2004). Aquests resultats van lligats amb els resultats obtinguts en índex kappa, per tant es pot dir que aquests productes que s'eliminen a l'etapa X són productes que contribueixen a l'índex kappa i que donen color a les pastes.

Després de l'etapa D (seqüència XD) les tres seqüències amb xilanasa segueixen tenint una blancor superior al blanc tot i que en el cas de l' $X_A D$ i l' $X_C D$ aquesta diferència de blancor és superior després de l'etapa X. La seqüència $X_B D$ és la que presenta la major blancor i al contrari que en les altres dues la diferència de blancor respecte el blanc després de l'etapa D és major que la diferència de blancor després de l'etapa X.

Després de l'etapa P (seqüència XP) el tractament amb la xilanasa nova ($X_A P$) ja no presenta una blancor superior al blanc sinó que aquesta és inferior. D'altra banda, les dues seqüències on s'han aplicat les xilanasas comercials ($X_B P$ i $X_C P$) presenten la major diferència de blancor respecte el blanc en comparació amb les seqüències X i XD, veient-se el major efecte en l' $X_C P$ on la blancor és 3,3%ISO superior al blanc.

Una etapa de pretractament amb xilanasa es relaciona com una etapa potenciadora del blanqueig on els seus efectes es veuen més en posteriors etapes de blanqueig més que a la mateixa etapa. Segons els resultats obtinguts, la xilanasa nova X_A provoca disminució de l'índex kappa i augment de blancor a l'etapa X però aquest efecte queda atenuat després de les etapes D i P, per tant, en les condicions aplicades d'aquesta xilanasa i en les propietats mesurades, tot i que sembla que produeix algun efecte sobre la pasta a l'etapa X, no es pot dir que tingui un efecte potenciador del blanqueig.

Pel què fa a la xilanasa comercial X_B passa el mateix que l' X_A en la propietat d'índex kappa ja que al tractar la pasta amb aquesta xilanasa, només després de l'etapa X s'observa un I_k inferior al blanc. En canvi, segons la blancor sí que es pot dir que hi ha un efecte potenciador del blanqueig ja que després de les etapes D i P la diferència de blancor respecte el blanc és superior que després de l'etapa X.

Per últim, la xilanasa X_C que resulta ser la més eficient de les tres en millorar les propietats d'índex kappa i blancor conjuntament, provoca millora d'aquestes propietats després de l'etapa X igual que les altres dues, i a més, també augmenta la diferència d' I_k respecte el blanc després de les etapes D i P i de blancor després de l'etapa P. Per tant, a l'aplicar a la pasta la xilanasa X_C , els agents de blanqueig diòxid de clor i peròxid d'hidrogen penetren millor a l'interior de la fibra produint una eliminació de lignina (o d'altres productes que contribueixen a índex kappa) i conseqüentment un augment de blancor, veient-se aquest efecte més pronunciat després de l'etapa P que després de l'etapa D.

3.3.1.3 Efecte de les xilanases en la viscositat de les pastes

A la Taula 3-5 es mostren els resultats de viscositat de les pastes de cada seqüència i després de cada etapa. Després de l'etapa X, no varia la viscositat de les pastes ni en el tractament del blanc (X_0) ni en els tractaments amb xilanases (el pretractament enzimàtic X_{1B} presenta una viscositat lleugerament superior al blanc però que estaria dins de l'interval de confiança de la mesura). Aquests resultats indiquen que les xilanases utilitzades són específiques de xil·là i no presenten activitat cel·lulasa, el que representa una característica important per a una xilanasa ja que no interessa que degradi cel·lulosa per no produir una caiguda dràstica de les propietats finals del paper. Després de l'etapa D no hi ha diferències en la viscositat entre tractaments i després de l'etapa P, només en el tractament $X_{1A}P$ s'observa una viscositat lleugerament superior a la resta de tractaments. En general, es pot dir que els pretractaments enzimàtics amb xilanasa no disminueixen la viscositat de les pastes ni després de l'etapa X ni després de les etapes D i P la qual cosa també havia estat observada en treballs anteriors (Roncero *et al.*, 1996; Siles *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2000).

Taula 3-5. Viscositat de les pastes

	Viscositat (mL/g)		
	X	XD	XP
X_0	981±30	980±22	848±15
X_{0EC}	1004±22	985±20	878±33
X_{1A}	989±20	994±17	899±12
X_{1B}	1001±10	1001±3	846±15
X_{1C}	977±7	998±21	843±30

3.3.2 Efecte de l'extracte d' *E.coli*

Com es pot observar a la Taula 3-4 i a la Taula 3-5, també es mostren els resultats d'índex kappa, blancor i viscositat de la seqüència tractada amb l'extracte d'*E.coli* (X_{0EC}). El motiu de realitzar aquest blanc és per tal d'assegurar-se que l'extracte en el qual es subministra la xilanasa no produeix efectes en les pastes i efluent ja que quan es produeixen xilanases, es fa créixer el microorganisme que la produeix (*E.coli* en el nostre cas) varis dies en fermentadors i durant aquest temps el microorganisme secreta enzims en el medi de cultiu; posteriorment, la massa cel·lular la qual conté un líquid ric en xilanasa, s'extreu, es concentra i se'n determina l'activitat xilanasa. Aquest líquid és el que s'utilitza per a realitzar el pretractament enzimàtic amb xilanasa, però a part de contenir xilanasa, també conté l'extracte cel·lular el qual podria influir en els resultats. El tractament X_{0EC} consisteix en un blanc que es realitza afegint l'extracte

d'*E.coli* en el que es troba la xilanasa nova X_A però sense activitat xilanasa, per tal d'assegurar-se que els altres components de l'extracte no influeixen en els resultats.

Aquest blanc no s'ha tingut en compte al comentar els resultats en apartats anteriors ja que no presenta diferències amb els resultats de la seqüència del blanc (X_0). Es confirma que la presència de l'extracte d'*E.coli* no afecta a les propietats de la pasta, per tant, en posteriors estudis no caldrà realitzar el blanc amb *E.coli*.

3.3.3 Efecte de les xilanasas en els efluentes

Per a la caracterització dels efluentes, s'ha mesurat el diòxid de clor residual a l'etapa D i el peròxid d'hidrogen residual a l'etapa P així com la cromatografia en capa fina després de cada etapa. Gairebé la totalitat del diòxid de clor i del peròxid d'hidrogen es consumeix durant el tractament ja que el residual de cada reactiu és al voltant del 0,02% en els dos casos, sense haver-hi diferències significatives entre tractaments.

3.3.3.1 Cromatografia en capa fina

S'ha realitzat la cromatografia en capa fina dels efluentes després de les etapes X, D i P, però en les quantitats aplicades en la cromatografia en capa fina, només s'hi observen marques després de l'etapa X, tal com es mostra a la Figura 3-2. En aquesta figura s'observa que als efluentes que corresponen als tractaments del blanc (X_0) hi apareixen marques corresponents a la xilobiosa (X_2), a la xilotriosa (X_3), a àcids urònics (Ur) de diferent pes molecular i altres oligosacàrids de més alt pes molecular. El motiu que en els blancs s'observin aquests compostos pot ser degut a que la pasta utilitzada prové d'una deslignificació amb oxigen realitzada a fàbrica i productes eliminats durant aquesta etapa haurien quedat a la pasta degut a un rentat deficient i en les condicions de tractament del blanc s'haurien dissolt i passat als efluentes.

Aquest fet dificulta la interpretació de resultats sobre l'actuació de les xilanasas, ja que en principi, si la xilanasa ha actuat hidrolitzant el polímer de xilà és d'esperar trobar els productes d'aquesta hidròlisi als efluentes, però si en el blanc també es troben aquests productes no es pot dir si són o no a causa de l'actuació de la xilanasa. Tot i així, en el cas del tractament X_{1A} i X_{1B} , s'observa el mateix patró de productes que al blanc, però les marques són lleugerament més intenses en presència de xilanasa el qual indica que aquestes xilanasas han actuat sobre el xilà de la pasta. En els resultats d'índex kappa i blancor d'aquestes xilanasas després de l'etapa X també es produïa algun efecte, el qual s'ha dit que era degut a l'eliminació de xilans amb grups cromòfors o bé de complexes lignina-xilà.

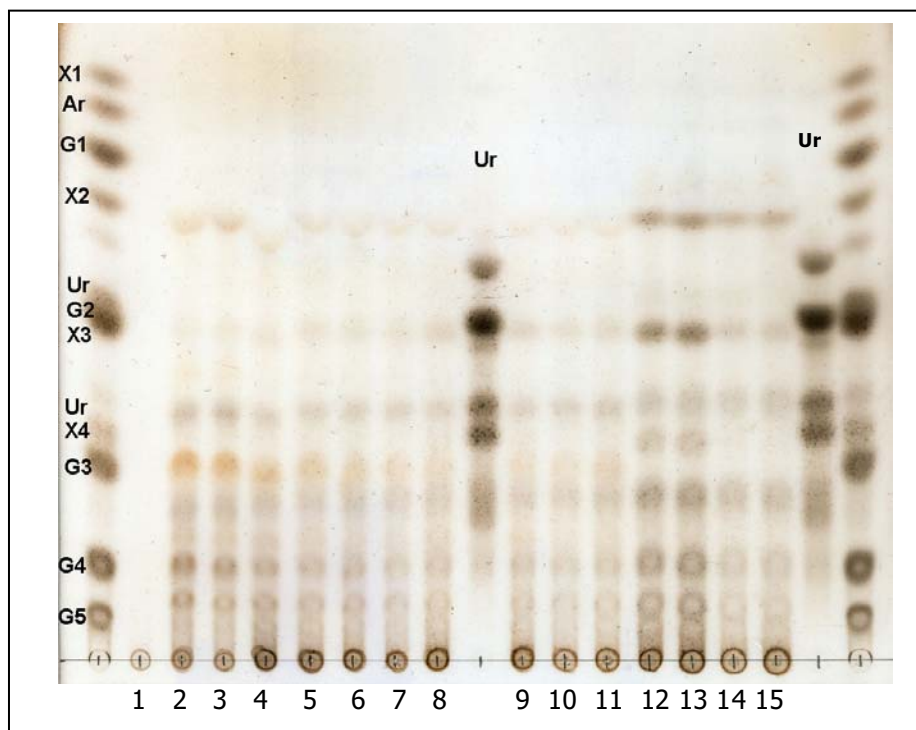


Figura 3-2. Cromatografia en capa fina dels efluent de l'etapa X (1: Inicial; 2-3: X_{1A}; 4-5: X₀; 6-7: X_{0EC}; 8-9: X_{1B}; 10-11: X₀; 12-13: X_{1C}; 14-15: X₀)

En els tractaments on s'ha aplicat la xilanasa X_C s'observen diferències més significatives respecte les marques que apareixen en el tractament del blanc ja que aquestes són clarament més intenses, entre elles la xilotriosa (X3) i la xilobiosa (X2); a més, apareixen marques corresponents a la xilotetraosa (X4) que no s'observen en cap més altre tractament. Aquests productes alliberats són conseqüència de la hidròlisi del polímer de xilà per part de la xilanasa X_C que han passat als efluent; d'altra banda, Paice *et al.*, (1992) diuen que l'acció de les xilanases provoca una despolimerització del xilà però que no necessàriament implica la solubilització de fragments del xilà. La manera d'acció i els productes alliberats per un tractament amb xilanasa no segueixen unes pautes generals sinó que depenen de cada xilanasa (Patel *et al.*, 1993; Clarke *et al.*, 1997). Els productes alliberats per la xilanasa X_C són xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa i altres productes de més alt pes molecular, a més, cal destacar que no apareix la xilosa i per tant es pot dir que exhibeix un patró típic d'una endo-xilanasa.

Segons els resultats de cromatografia en capa fina, la xilanasa comercial X_C és la que millor actua hidrolitzant el polímer de xilà, i també és la que potencia més el blanqueig atenent a les propietats de les pastes d'índex kappa i blancor. Es pot dir per tant, que

la presència de xilans dissolts en els efluentés és una manera d'avaluar la futura efectivitat d'una xilanasa sobre la pasta, el qual va d'acord amb la teoria que la xilanasa hidrolitza xilans de la superfície de la fibra i l'eliminació d'aquests xilans facilita l'acció d'agents de blanqueig com el diòxid de clor o el peròxid d'hidrogen.

3.3.4 Efectivitat de les etapes de blanqueig (D i P)

En els apartats anteriors s'ha comentat l'efecte de cada tractament amb xilanasa respecte la seqüència del blanc per tal d'identificar la xilanasa més efectiva en potenciar el blanqueig, però un altre dels objectius d'aquest capítol també és escollir l'etapa més selectiva entre una etapa àcida amb diòxid de clor i una etapa alcalina amb peròxid d'hidrogen per a realitzar posteriors estudis sobre el pretractament enzimàtic. En les etapes de blanqueig el què es vol aconseguir és disminuir al màxim l'índex kappa i incrementar la blancor sense que es degradi la cel·lulosa de la pasta, és a dir, sense que en disminueixi la viscositat. Per tal d'avaluar la selectivitat de les seqüències XD i XP, primerament es tenen en compte aquestes tres propietats de les pastes i seguidament es comparen els dos agents de blanqueig oxidatius (diòxid de clor i peròxid d'hidrogen) mitjançant els OXE consumits en aquestes etapes i relacionant-los amb les propietats d'índex kappa i blancor.

3.3.4.1 Selectivitat de les seqüències XD i XP segons les propietats de les pastes

A la Figura 3-3 (a-c) s'han representat gràficament els valors d'índex kappa *vs.* blancor, índex kappa *vs.* viscositat i blancor *vs.* viscositat respectivament. S'observa que es poden separar clarament les tres etapes (X, XD i XP) segons aquestes propietats, i a simple vista es pot dir que en les pastes XD s'obté un Ik clarament inferior a les pastes XP i una blancor lleugerament superior. A més, el diòxid de clor és un agent bastant selectiu per a la lignina ja que no ha degradat la cel·lulosa tal com mostra la viscositat d'aquestes pastes la qual és la mateixa que a l'etapa X; pel peròxid d'hidrogen no es pot dir el mateix ja que les pastes XP presenten totes una viscositat lleugerament inferior indicant que s'ha produït degradació de la cel·lulosa. D'aquestes figures també es pot dir que els diferents tractaments amb xilanasen tenen tots la mateixa tendència front els agents de blanqueig.

Si es comparen els dos agents de blanqueig en quant a la deslignificació que produeixen, es pot dir que després d'haver realitzat l'etapa X a les pastes, el diòxid de clor produeix una deslignificació al voltant del 50%, mentre que a l'etapa P és bastant inferior (del 16%). Pel què fa a la blancor els dos agents de blanqueig produeixen un efecte semblant tot i ser lleugerament superior a l'etapa D que augmenta la blancor un

27%ISO front el 23%ISO produït durant l'etapa P. Per últim, la viscositat de la pasta no es veu afectada per l'etapa D mentre que a l'etapa P disminueix 80 mL/g aproximadament.

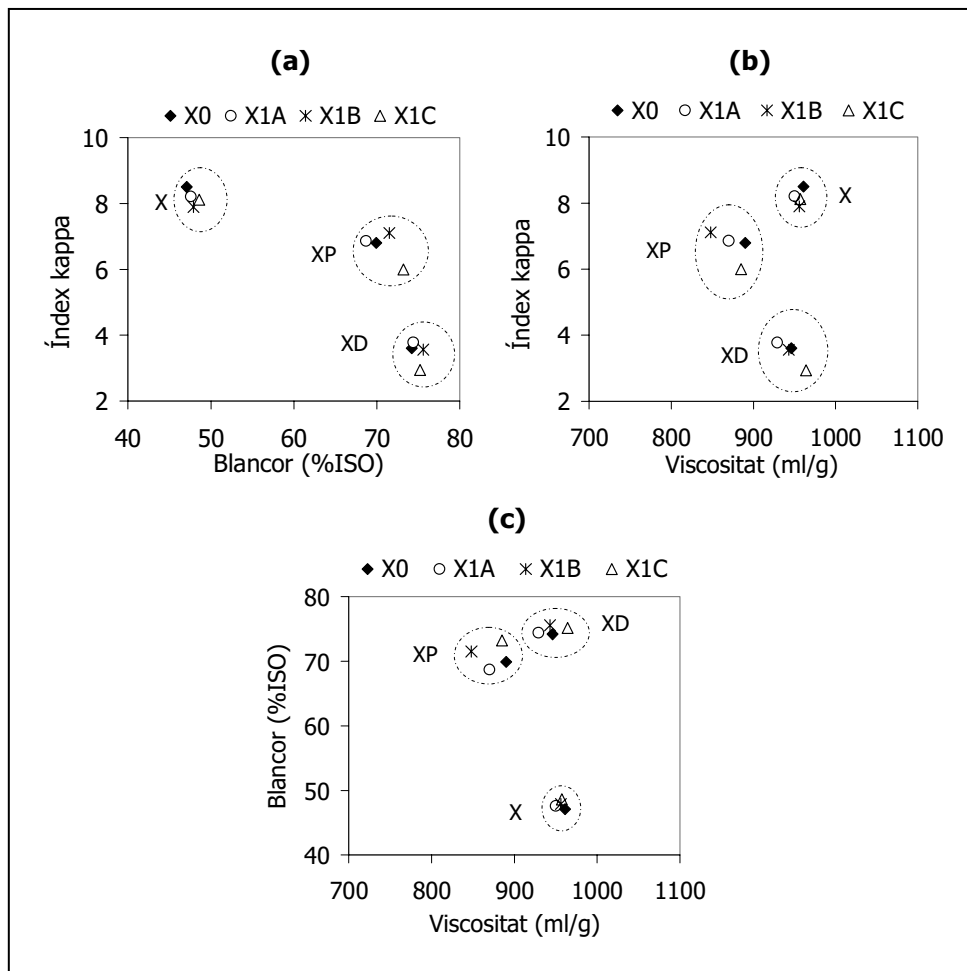


Figura 3-3. Índex kappa vs. blancor (a), índex kappa vs. viscositat (b) i blancor vs. viscositat (c) de totes les experiències realitzades

Aquesta forma d'actuació dels dos agents de blanqueig va d'acord amb el que està descrit a la bibliografia on es diu que el diòxid de clor és un agent de blanqueig molt selectiu i un potent oxidant que reacciona amb els grups fenòlics i no fenòlics de la lignina, assolint elevades deslignificacions sense degradar la cel·lulosa considerablement (García Hortal *et al.*, 1984; Dence, 1996) i que la seva manera d'actuar sobre la lignina és produint l'obertura dels seus anells aromàtics (Lachenal i Chirat, 1999). D'altra banda, és conegut que el peròxid d'hidrogen presenta afinitat

pels grups cromòfors de la pasta, el que es tradueix principalment en augment de blancor. Aquest es descomposa en radicals segons l'Eq. 3-2 on l'espècie activa és l' $\text{HOO}\cdot$ que blanqueja sense degradar, però si es descompon pot formar O_2 el qual pot induir la formació de radicals que actuarien sobre els hidrats de carboni; també provocaria l'obertura dels anells fenòlics de la lignina degut a l'atac del radical $\cdot\text{OH}$ sobre els grups fenolats (Lachenal i Chirat, 1999).



Així doncs, si es compara el fet d'aplicar una etapa D o una etapa P a les pastes després d'una etapa X, tot i que l'increment de blancor és semblant en les dues, amb una etapa D s'aconsegueix una designificació del 30% superior a l'etapa P i no provoca una degradació de la cel·lulosa de la pasta.

3.3.4.2 Avaluació de l'efectivitat dels agents de blanqueig mitjançant la utilització d'OXE

El terme OXE o equivalent d'oxidació permet comparar etapes en les que intervenen agents de blanqueig oxidatius a igualtat de potencial d'oxidació. Un OXE es defineix com la quantitat de substància que rep un mol d'electrons quan la substància és reduïda (Grundelius, 1993; Sixta *et al.*, 1994; Reeve, 1996). Coneixent els OXE aplicats en diferents etapes de blanqueig i determinant la blancor i l'índex kappa assolits, es pot calcular l'efectivitat dels agents que intervenen. A la Taula 3-6 s'adjunten els OXE totals aplicats en les diferents etapes, els quals posteriorment s'utilitzen per a calcular l'efectivitat en funció dels OXE de cada etapa de blanqueig. No es tenen en compte ni el diòxid de clor ni el peròxid d'hidrogen residual al calcular aquests OXE ja que són tan baixos que no influeixen en el resultat.

Taula 3-6. Càlcul dels OXE de les etapes de blanqueig

Agent de blanqueig	Dosi (%sps)	Kg/tps	OXE/Kg reactiu	OXE/tps
Diòxid de clor	3	30	74,12	2223,6
Peròxid d'hidrogen	3	30	58,79	1763,7

Per tal de calcular l'efectivitat en funció dels OXE s'utilitzen les Eq. 3-3 i Eq. 3-4, en les quals es divideix la variació d'índex kappa o blancor entre els OXE aplicats a cada etapa, $E_{f_{C_{Ik}}}$ OXE i $E_{f_{C_{Bl}}}$ OXE respectivament. Aquestes expressions no consideren la variació de la viscositat, pel què s'ha de tenir en compte que l'efectivitat presentada és independent de la degradació que pateix la cel·lulosa.

$$Efc_{Ik} \text{ OXE} = \frac{Ik \text{ etapa anterior} - Ik \text{ etapa}}{OXE} * 100 \quad \text{Eq. 3-3}$$

$$Efc_{Bl} \text{ OXE} = \frac{Bl \text{ etapa} - Bl \text{ etapa anterior}}{OXE} * 100 \quad \text{Eq. 3-4}$$

A la Taula 3-7 es mostren els resultats obtinguts a partir d'aquestes equacions els quals estan representats gràficament a la Figura 3-4.

Taula 3-7. Efectivitat en disminuir l'índex kappa o en augmentar la blancor de cada etapa de blanqueig respecte els OXE

	Efc _{Ik} OXE		Efc _{Bl} OXE	
	D	P	D	P
X₀	0,22	0,10	1,22	1,29
X_{1A}	0,20	0,08	1,21	1,20
X_{1B}	0,20	0,04	1,25	1,34
X_{1C}	0,23	0,12	1,20	1,39

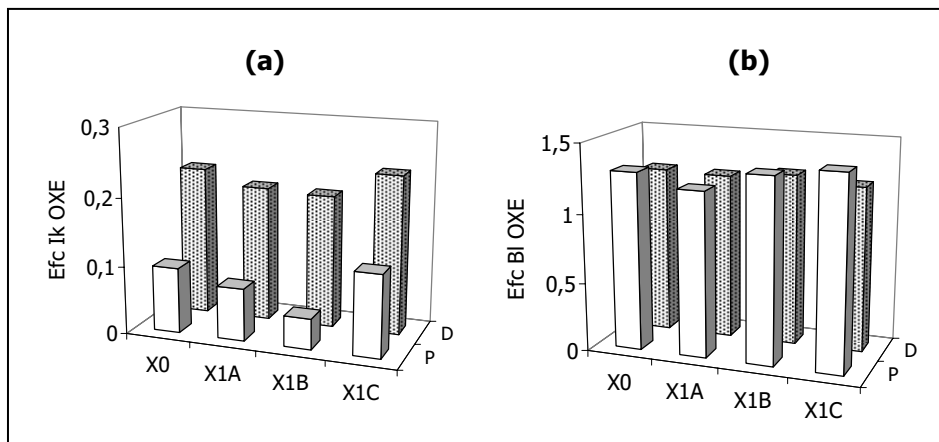


Figura 3-4. Efectivitat en disminuir l'índex kappa (a) o en augmentar la blancor (b) de cada etapa de blanqueig respecte els OXE

Els resultats mostren que una etapa D disminueix molt més l'índex kappa per equivalent d'oxidació aplicat en comparació amb el peròxid d'hidrogen, però pel que fa a la blancor els dos reactius actuen molt semblant, tenint un efecte lleugerament superior el peròxid d'hidrogen. Aquests resultats van d'acord en el que s'ha comentat anteriorment sobre el peròxid d'hidrogen on es diu que és un agent més blanquejant

que deslignificant, ja que ara es demostra que els OXE aplicats a una etapa P milloren considerablement la blancor però eliminen poca lignina tal com també ha estat observat per de la Rosa, (2003) en el blanqueig de pastes de kenaf.

3.4 CONCLUSIONS

En aquest capítol s'ha avaluat una xilanasa nova i dues xilanas comercials aplicades en una etapa de pretractament enzimàtic X sobre pasta kraft d'eucaliputs deslignificada amb oxigen avaluant els efectes que aquestes produeixen en les propietats de les pastes d'índex kappa, blancor i viscositat així com en els oligosacàrids dissolts en els efluent (analitzats per cromatografia en capa fina) en comparació amb una seqüència control. Les propietats de les pastes s'han avaluat tant després de l'etapa X com després de les etapes D i P obtenint pastes blanquejades a partir de seqüències XD i XP.

Els resultats demostren que la xilanasa nova (X_A) produeix efectes en les propietats de les pastes a l'etapa X els quals estan relacionats amb l'eliminació de xilans, però no potencia l'efecte blanquejant en les etapes D i P. La xilanasa comercial X_B produeix efectes a l'etapa X també relacionats amb l'eliminació de xilans i a més també potencia l'efecte de les etapes D i P en augmentar la blancor. Per últim, la xilanasa comercial X_C resulta ser la xilanasa més efectiva de les tres ja que produeix efectes en les propietats de les pastes després de l'etapa X i a més potencia l'efecte blanquejant de les següents etapes tant en deslignificar com en blanquejar la pasta. L'estudi per cromatografia en capa fina dels efluent relaciona la major efectivitat de la xilanasa X_C amb la major acció hidrolitzant el polímer de xilà. Una particularitat important de les tres xilanas és que són específiques de xilà ja que no afecten a la viscositat de les pastes. D'altra banda, el fet que els efectes no siguin molt pronunciats, suggereix que en posteriors estudis enzimàtics s'hagi d'augmentar la seva dosi d'aplicació sobre la pasta.

Al comparar l'efectivitat d'una etapa àcida amb diòxid de clor (D) i d'una etapa alcalina amb peròxid d'hidrogen (P), s'observa en quant a les propietats d'índex kappa, blancor i viscositat que l'etapa D és una etapa més selectiva ja que d'una banda no afecta a la viscositat de les pastes i d'altra banda produeix un 30% més de deslignificació que l'etapa P. A igualtat d'OXE, en una etapa D s'elimina lignina i s'augmenta blancor, mentre que en una etapa P s'augmenta blancor però elimina poca lignina. Els efectes dels pretractaments amb xilanasa, tot i que es veuen lleugerament més intensificats després de l'etapa P, després de l'etapa D també es veuen clarament el què porta a

decidir que en posteriors assaigs d'anàlisi d'actuació de xilanases s'utilitzi la seqüència XD.

3.5 REFERÈNCIES

- Amin, H.M. (2006) Extended usage of xylanase enzyme to enhance the bleaching of softwood kraft pulp. *Tappi Journal* 5(1):23-26.
- Bajpai, P. (2004) Biological bleaching of chemical pulps. *Critical Reviews in Biotechnology* 24(1):1-58.
- Biely, P., Vrsanská, M., Tenkanen, M. i Kluepfel, D. (1997) Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *Journal of Biotechnology* 57(1-3):151-166.
- Blanco, A., Diaz, P., Martinez, J., Lopez, O., Soler, C. i Pastor, F.I.J. (1996) Cloning of a *Bacillus* sp. BP-23 gene encoding a xylanase with high activity against aryl xylosides. *FEMS Microbiology Letters* 137(2):285-290.
- 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* 48:177-183.
- Colom, J.F., García-Hortal, J.A., Torres, A.L. i Vidal, T. (2001) Retos medioambientales de la industria papelera. *Industria Papelera y Medio Ambiente*:215-226.
- de la Rosa, A. (2003) Utilización papelera de fibras no madereras (kenaf y *Miscanthus sinensis*). Estudio de secuencias de blanqueo ECF y TCF. Tesi doctoral. Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera. Escola Tècnica superior d'Enginyeria Industrial i Aeronàutica de Terrassa. Universitat Politècnica de Catalunya. Terrassa, Espanya.
- Dence, C.W. (1996) Section III. The Chemistry of Bleaching and Brightness Reversion. Chapter 3. Chemistry of Chemical Pulp Bleaching. Ed. Dence i Reeve. Tappi Press. Atlanta. USA:125-159.
- Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D. i Neto, P.C. (2003) Carbohydrate-derived chlorinated compounds in ECF bleaching of hardwood pulps: Formation, degradation, and contribution to AOX in a bleached kraft pulp mill. *Environmental Science and Technology* 37(4):811-814.
- Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P. i Cavaleiro, J.A.S. (2004) Glucuronoxylan-derived chlorinated compounds in filtrates from chlorine dioxide bleaching: A comparative study between eucalypt (*E. globulus*) and birch (*Betula* spp.) kraft pulps. *Appita Journal* 57(1):40-42.

- Gallardo, O., Díaz, P. i Pastor, F.I.J. (2003) Characterization of a *Paenibacillus* cell-associated xylanase with high activity on aryl-xylosides: a new subclass of family 10 xylanases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61:226-233.
- Gallardo, O., Díaz, P. i Pastor, F.I.J. (2007) Cloning and production of Xylanase B from *Paenibacillus barcinonensis* in *Bacillus subtilis* hosts. *Biocatalysis and Biotransformation* 25 (2-4):157-162.
- García Hortal, J.A. i Vidal, T. (1984) Blanqueo de Pastas en la Industria Papelera. Escola Tècnica superior d'Enginyeria Industrial i Aeronàutica de Terrassa. Universitat Politècnica de Catalunya. Terrassa, Espanya.
- Grundelius, R. (1993) Oxidation equivalents, OXE - an alternative to active chlorine. *Tappi Journal* 76(1):133-135.
- Lachenal, D. i Chirat, C. (1999) Evaluation de l'efficacité des réactifs de blanchiment. Nouvelle approche. *Revue ATIP* 53 (4-5):125-130.
- Li, J. i Gellerstedt, G. (1997) The contribution to kappa number from hexeneuronic acid groups in pulp xylan. *Carbohydrate Research* 302:213-218.
- Loutfi, H. (1993) Researchers continue development of new bleaching agents for kraft pulp. *Pulp & Paper* 68 (29):122.
- Maddern, K.N., Neilson, M.J. i Jamieson, A.G. (1993) The production of eucalypt kraft market pulp without the use of molecular chlorine. *Appita Journal* 46 (6):419-423.
- Mateo, C. (2004) Influence de la structure chimique des pâtes cellulósiques sur leur aptitude au blanchiment. *Revue ATIP* 58 (3):29-39.
- Nelson, N. (1944) A photometric adaptation of the somogy method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153(2):375-380.
- Paice, M.G., Gurnagul, N., Page, D.H. i Jurasek, L. (1992) Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology* 14(4):272-276.
- Patel, R.N., Grabski, A.C. i Jeffries, T.W. (1993) Chromophore release from kraft pulp by purified *streptomyces roseiscleroticus* xylanases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39:405-412.
- 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* 48 (3):231-217.

- Popovici, C., Messier, M., Thibault, L. i Charron, D. (2004) 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) Section I. Introduction. Chapter 1. Introduction to the Principles and Practice of Pulp Bleaching. *Pulp Bleaching*. Ed. Dence i Reeve. Tappi Press. Atlanta. USA:261-290.
- Roncero, M.B., Vidal, T., Torres, A.L. i Colom, J.F. (1996) Use of xylanase in the totally chlorine-free bleaching of Eucalyptus kraft pulp. *ACS Symposium Series* 219-227.
- Sanchez, M.M., Fritze, D., Blanco, A., Sproer, C., Tindall, B.J., Schumann, P., Kroppenstedt, R.M., Diaz, P. i Pastor, F.I.J. (2005) *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(2):935-939.
- 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.
- Siles, F.J., Torres, A.L., Colom, J.F. i Vidal, T. (1996) Blanqueo biológico de pasta kraft de frondosas. *Afinidad*, 53 (462):93-102.
- Sixta, H., Schuster, J., Mayrhofer, C., Krotscheck, A.W. i Rückl, W. (1994) Towards effluent-free TCF-Bleaching of Eucalyptus prehydrolysis kraft pulp. *Das papier* 8:526-537.
- Somogyi, M. (1945) Determination of blood sugar. *Journal of Biological Chemistry* 160(1):69-73.
- Tolan, J.S. i Spence, M. (1997) On-line tracer system to improve enzyme performance. *Pulp & Paper Canada* 98 (2):57-61.
- 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.
- Vidal, T., Torres, A.L., Colom, J.F. i Siles, J. (1997) Xylanase bleaching of eucalyptus kraft pulp - an economical ECF process. *Appita Journal* 50 (2):144-148.

- Vidal, T., Munoz, M. i Colom, J.F. (1998) Xylanase bleaching of Eucalyptus kraft pulp - an economical TCF process. Proceedings of the 7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry 3: 11-14.
- Viikari, L., Suurnäkki, A. i Buchert, J. (1996) Enzyme-aided bleaching of kraft pulps: fundamental mechanisms and practical applications. Enzymes for Pulp and Paper Processing 655:15-24.
- Wong, K.K.Y., Jong, E.D., Saddler, J.N. i Allison, R.W. (1997 (a)) Mechanisms of xylanase aided bleaching of kraft pulp. Part 1: Process parameters. Appita Journal 50(5):415-422.
- Wong, K.K.Y., Jong, E.D., Saddler, J.N. i Allison, R.W. (1997 (b)) Mechanisms of xylanase aided bleaching of kraft pulp. Part 2: Target substrates. Appita Journal 50(6):509-518.