

Capítol 6

Avaluació de noves xilanases de les famílies 11 i 5 en una seqüència complerta ECF de blanqueig

RESUM

Dues xilanases noves bacterianes pertanyents a les famílies 11 i 5 s'apliquen individualment i conjuntament en una seqüència complerta ECF de blanqueig XDEopD₁. S'avaluen els efectes de les xilanases al llarg de la seqüència de blanqueig en les propietats de les pastes i dels efluent donant especial importància a l'evolució del contingut en àcids hexenurònics de les pastes. Els efectes de les xilanases es comparen amb la seqüència del blanc X₀DEopD₁ i amb la seqüència DEopD₁. Els resultats en les propietats de les pastes demostren que les dues xilanases potencien la deslignificació i blanqueig de la pasta kraft d'eucaliptus i augmenten l'eliminació d'àcids hexenurònics sense veure's afectada la viscositat de la pasta. D'altra banda, també augmenten els xilans dissolts en els efluent així com l'absorbància, la DQO i el color. Al ser aplicades les dues xilanases conjuntament s'observa un efecte sinèrgic després de la primera etapa amb diòxid de clor. Per últim, s'observa que les dues xilanases produeixen canvis en la morfologia de les fibres i no deterioren les propietats finals dels papers.

6.1 INTRODUCCIÓ

Al capítol anterior s'han avaluat quatre xilanases bacterianes noves en la seqüència de blanqueig XDP i s'ha observat que la xilanasa X_G que pertany a la família 11 de les glicosil hidrolases és la més efectiva tant en millorar les propietats de les pastes d'índex kappa i blancor com en reduir el contingut en àcids hexenurònics i augmentar la quantitat de productes alliberats als efluent com xilans, lignina i HexA. D'altra banda, també s'ha demostrat que la xilanasa X_J que pertany a la família 5 també produeix lleugers efectes en les propietats mesurades el que la fa especialment interessant ja que no hi ha estudis anteriors sobre l'aplicació biotecnològica amb xilanases d'aquesta família en el blanqueig de pastes. A més, també es veu la

necessitat d'augmentar la dosi d'enzim aplicada per tal de veure millor els efectes de les xilanases.

Els microorgansimes que degraden xilà normalment produeixen gran quantitat de xilanases pertanyents a les diferents famílies de glicosil hidrolases 10 i 11, que es creu que es combinen sinèrgicament per a trencar el polímer de xilà en les parets cel·lulars de les plantes i en alguns treballs anteriors s'avalua la possibilitat que diferents xilanases actuïn sinèrgicament sobre les pastes (Elegir, *et al.*, 1995; Clarke *et al.*, 1997), en general les xilanases més efectives en potenciar el blanqueig pertanyen a la família 11 tot i que en algun cas s'observa un efecte sinèrgic combinant dues xilanases de la família 10. Les xilanases X_G i X_J han estat aïllades a partir de la mateixa soca bacteriana *Bacillus sp.* BP-7 (López *et al.*, 1998; Gallardo *et al.*, 2004; Gallardo, 2007) i es creu que si les dues s'apliquen conjuntament sobre la pasta podrien tenir un efecte sinèrgic ja que al pertànyer al mateix microorganisme podrien tenir un efecte sinèrgic en degradar el xilà en el seu hàbitat natural.

Al capítol 4 s'ha observat que si s'afegeix una etapa X abans de la seqüència de blanqueig DEopD₁ utilitzant la xilanasa comercial X_C s'aconsegueix augmentar la deslignificació i la blancor de la pasta final blanquejada sense quedar afectada la viscositat de la pasta, al mateix temps que s'han avaluat els efectes en les propietats dels efluents i en el refí i propietats físiques dels papers.

En aquest capítol s'avalua l'efecte de les dues xilanases noves X_G i X_J en la mateixa seqüència complerta de blanqueig XDEopD₁ tant aplicades individualment com conjuntament per tal de veure si existeix un efecte sinèrgic entre les dues. S'avaluen els efectes en les propietats de les pastes i efluents al llarg de la seqüència de blanqueig i es dóna especial importància en l'evolució dels àcids hexenurònics al llarg de la seqüència i a l'efecte que el tractament amb xilanasa els provoca. De les pastes blanquejades s'analitzen els efectes en la morfologia de les fibres, en les característiques del refí així com en les propietats físiques dels papers.

6.2 MATERIALS I MÈTODES

6.2.1 Matèria prima

La matèria prima utilitzada en aquest capítol és pasta kraft d'eucaliptus (*Eucalyptus globulus*), deslignificada amb oxigen. És de procedència industrial, produïda per l'empresa Torraspapel, S.A. i ha estat rentada al laboratori amb tampó Tris-HCl pH7 durant 30 minuts (correspon a la pasta 2 utilitzada al capítol anterior). Les característiques inicials d'aquesta pasta són les que s'indiquen a la Taula 6-1.

Taula 6-1. Propietats inicials de la pasta

Índex kappa	8,0
Blancor (%ISO)	51,1
Viscositat (mL/g)	972±20
HexA* (µmol/gps)	38,8±0,7

*HexA: contingut en àcids hexenurònics de la pasta

6.2.2 Enzims

Els enzims utilitzats són dues xilanases noves clonades i caracteritzades al Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona a partir de la soca bacteriana *Bacillus sp. BP-7* i han estat referenciades com X_G i X_J . L' X_G pertany a la família 11 de les glicosil hidrolases i la X_J a la família 5. Al capítol 2 de Materials i Mètodes s'especifiquen les característiques de cadascuna.

6.2.3 Seqüència de blanqueig

Les seqüències de blanqueig **ECF** estudiades són del tipus **XDEopD₁** i **DEopD₁** on:

- **X**: Pretractament enzimàtic amb xilanasa
- **D**: Etapa de blanqueig amb diòxid de clor
- **Eop**: Etapa d'extracció alcalina amb oxigen i peròxid
- **D₁**: Segona etapa de blanqueig amb diòxid de clor

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 i pH) però sense afegir-hi l'enzim. La resta d'etapes es fan igual per blanc i enzim.

Són cinc les seqüències de blanqueig que s'han realitzat:

- **X₀DEopD₁**: seqüència del blanc on a l'etapa X no se li afegeix l'enzim
- **X_{3G}DEopD₁**: seqüència amb la xilanasa X_G a dosi de 3 unitats per gps
- **X_{3J}DEopD₁**: seqüència amb la xilanasa X_J a dosi de 3 unitats per gps
- **X₃₊₃DEopD₁**: seqüència amb les xilanases X_G i X_J a dosi de 3 unitats per gps cadascuna
- **DEopD₁**: seqüència utilitzada actualment a la indústria sense el blanc X_0 . Es referencia com a B

on està referenciat en cada cas el tipus de tractament aplicat a l'etapa X (dosi d'enzim i tipus d'enzim) sent el primer subíndex la dosi d'enzim utilitzada (0 en cas del blanc i 3 o 3+3 al afegir-hi enzims) i el segon subíndex l'enzim utilitzat (X_G , X_J). Una unitat d'enzim és definida com la quantitat d'enzim requerida per a produir 1 μmol de grups aldehid per minut.

Les condicions d'aplicació de l'etapa X es mostren especificades a la Taula 6-2.

Taula 6-2. 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	50	7	Tris-HCl	2	10
X_{3G}	3					
X_{3J}						
X_{3+3}	3+3					

Les condicions d'aplicació de les etapes de blanqueig D, Eop i D_1 s'indiquen a la Taula 6-3. L'equip i metòdica utilitzats s'especificuen detalladament al Capítol 2 (Materials i Mètodes).

Taula 6-3. Condicions d'aplicació de les diferents etapes de blanqueig

	D	Eop	D_1
Consistència (% sps*)	10	10	10
Temperatura (°C)	56	70	65
Temps (min)	60	65	215
H₂O₂ (% sps*)	-	0,3	-
NaOH (% sps*)	-	1,1	-
ClO₂ (% sps* com Cl₂ actiu)	3	-	1,5
O₂ (Kg/Tad)	-	5	-
pH	1,2	11,7	2,2

*sps: sobre pasta seca

**tad : tones secades a l'aire

6.2.4 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 indicada al capítol 2 i el contingut en àcids hexenurònics (HexA) segons el mètode proposat per Gellerstedt i Li el 1996 i modificat posteriorment, el qual es basa en l'anàlisi per espectroscopia UV (Chai *et al.*, 2001). Aquestes propietats són mesurades al llarg 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 la deslignificació o percentatge de disminució d'índex kappa respecte la pasta inicial segons l' Eq. 6-1 i a partir del contingut en HexA s'ha calculat l'eliminació d'HexA respecte la pasta inicial segons l'Eq. 6-2.

$$\text{Deslignificació (\%)} = \frac{Ik_i - Ik_f}{Ik_i} * 100 \quad \text{Eq. 6-1}$$

$$\text{Eliminació d'HexA (\%)} = \frac{\text{HexA}_i - \text{HexA}_f}{\text{HexA}_i} * 100 \quad \text{Eq. 6-2}$$

on,

Ik_i i HexA_i = índex kappa o contingut en HexA de la pasta inicial

Ik_f i HexA_f = índex kappa o contingut en HexA de la pasta després de cada etapa (X; D; Eop o D_1)

6.2.5 Caracterització dels efluent

Per a la caracterització dels efluent s'ha realitzat la cromatografia en capa fina de les etapes X i D, un espectre d'absorbància de l'etapa X i s'ha determinat la DQO i Color de totes les seqüències al llarg de les etapes de blanqueig. Les metodologies seguides en cada cas es troben descrites al capítol 2 (Materials i Mètodes).

6.2.6 Anàlisi de les fibres per microscopia electrònica d'escombrat (SEM)

S'ha realitzat un estudi de microscopia electrònica d'escombrat mitjançant un microscopi Stereoscan S-260 Leica Cambridge, 25 kV. S'utilitza un Detector BSE (scintillador backscattered detector), el qual permet identificar la composició elemental de la mostra analitzada a través d'un sistema de microanàlisi de raigs X (EDX), 260-ixl LINK, Leica Cambridge. L'estudi microscopi es realitza de les 3 pastes finals blanquejades $X_0\text{DEopD}_1$, $X_{3G}\text{DEopD}_1$ i $X_{3J}\text{EopD}_1$. Les fotografies són fetes a 1200 augments per a X_0 i X_{3G} i a 1220 augments per a X_{3J} . Aquest estudi s'ha realitzat per Torraspapel S.A.

6.2.7 Refí de les pastes i propietats dels papers

Les pastes blanquejades segons les seqüències X_0 DEopD₁, X_{3G} DEopD₁ i X_{3J} DEopD₁, s’han refinat a diferents revolucions mitjançant un molí PFI. De la pasta refinada es mesura la resistència al drenatge pel mètode Schopper-Riegler així com l’índex de retenció d’aigua (IRA) i el consum específic. Amb les pastes sense refinar i refinades a diferents revolucions es realitzen 10 fulles per tal de determinar el gramatge, l’espessor i volum específic, així com les següents propietats físiques dels papers: permeabilitat Bendtsen, índex de rebentament, índex d’estripada i longitud de ruptura, segons les normatives corresponents indicades al Capítol 2 (Materials i Mètodes).

6.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

Primerament s’avaluen els efectes de les xilanases tant aplicades individualment com conjuntament en les propietats de les pastes d’índex kappa, blancor, viscositat i àcids hexenurònics tant a l’etapa enzimàtica com al llarg de la seqüència de blanqueig. Els resultats es comparen amb la seqüència del blanc X_0 DEopD₁ i amb la seqüència DEopD₁. Seguidament s’avaluen els efectes en les propietats dels efluents de cromatografia en capa fina, absorbància, DQO i Color. Finalment, s’avalua la possibilitat del possible efecte sinèrgic entre les dues xilanases així com els efectes que les xilanases produeixen en la morfologia de les fibres per SEM al final de la seqüència de blanqueig.

A la Taula 6-4 es mostren els resultats d’índex kappa i blancor de totes les seqüències al llarg de les etapes de blanqueig.

Taula 6-4. Propietats de les pastes d’índex kappa i blancor al llarg de la seqüència de blanqueig

	X		D		Eop		D₁	
	Ik	BI (%ISO)	Ik	BI (%ISO)	Ik	BI (%ISO)	Ik	BI (%ISO)
X₀	7,9	51,8	3,5	75,3	2,9	85,9	0,8	89,3
X_{3G}	7,9	54,4	3,2	77,8	2,2	86,9	0,5	90,4
X_{3J}	7,8	52,3	3,3	75,8	2,7	86,6	0,7	89,4
X₃₊₃	7,5	54,9	2,7	77,2	2,1	88,2	0,6	90,3
B	-	-	3,5	75,5	2,8	85,2	0,9	88,6

Abans d’avaluar els efectes que les xilanases produeixen a la seqüència de blanqueig s’han representat gràficament els resultats d’índex kappa vs. blancor de totes les

experiències tal com es mostra a la Figura 6-1. En aquesta figura s'observa d'una banda que les dues propietats estan relacionades on una disminució en l'índex kappa implica un augment en la blancor i d'altra banda que les diferents etapes de blanqueig queden ben delimitades. La primera etapa de diòxid de clor és la que més efecte produeix tant en disminuir l'índex kappa (60%) com en augmentar la blancor (23%ISO) el que indica que el diòxid de clor és un agent de blanqueig tant deslignificant com blanquejant tal com s'ha comentat al capítol 3. L'etapa d'extracció alcalina amb oxigen i peròxid (Eop) és una etapa que blanqueja més que deslignifica ja que l'Ík disminueix un 9 % i la blancor augmenta un 11%ISO. La segona etapa de diòxid de clor no produeix tant efecte com la primera però tot i així la deslignificació que produeix és del 23% i l'augment de blancor del 3%ISO.

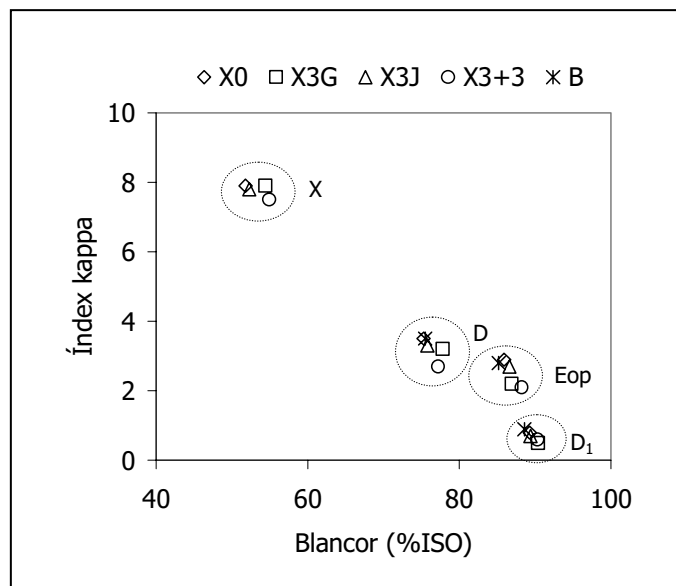


Figura 6-1. Índex kappa vs. blancor de tots els tractaments després de cada etapa

A la Figura 6-1 també s'observa que dins d'una mateixa etapa hi ha diferències entre tractaments que són degudes a l'efecte del pretractament enzimàtic amb les diferents xilanases. Cal destacar que la seqüència DEopD₁ (B) presenta unes propietats d'índex kappa i blancor molt semblants a la seqüència X₀DEopD₁ i per aquest motiu no es té en compte a l'hora de comentar els resultats. Al capítol 4, on també s'ha realitzat aquest mateix estudi utilitzant una xilanas comercial s'ha vist que sí que hi havia diferències entre aquestes dues seqüències, el motiu és que la pasta utilitzada al capítol 4 no havia estat rentada mentre que en aquest capítol la pasta que s'utilitza sí que ha estat rentada al laboratori.

6.3.1 Efecte de les xilanases en l'índex kappa de les pastes al llarg de la seqüència de blanqueig

L'objectiu d'aplicar un pretractament amb xilanasa sobre les pastes és que s'alliberin els xilans que han quedat dipositats sobre les fibres durant la cocció kraft i que taponen l'accés dels reactius de blanqueig al seu interior (Roncero *et al.*, 2000). Els resultats d'índex kappa de les pastes (Taula 6-4) mostren que després de l'etapa X les xilanases aplicades individualment no produeixen efecte però sí que provoquen una disminució en l'Ik aplicades conjuntament. Els resultats aplicant les xilanases individualment no corresponen amb el capítol anterior on aquestes xilanases s'han aplicat a dosi inferior i l'Ik disminuïa lleugerament després d'aquesta etapa. Al llarg de les etapes D, Eop i D₁ els tres tractaments amb xilanasa fan disminuir l'Ik de la pasta, l'X_{3G} produeix sempre més efecte que l'X_{3J} i en el tractament X₃₊₃ és quan s'obtenen els menors valors en Ik.

S'ha calculat el tant per cent de designificació respecte la pasta inicial de cada seqüència de blanqueig i després de cada etapa i del resultat obtingut de les seqüències amb tractament enzimàtic se li resta l'efecte que es produeix en la seqüència del blanc amb X₀, d'aquesta manera s'obté l'augment en designificació produït per l'efecte de cada xilanasa (Figura 6-2 (a)).

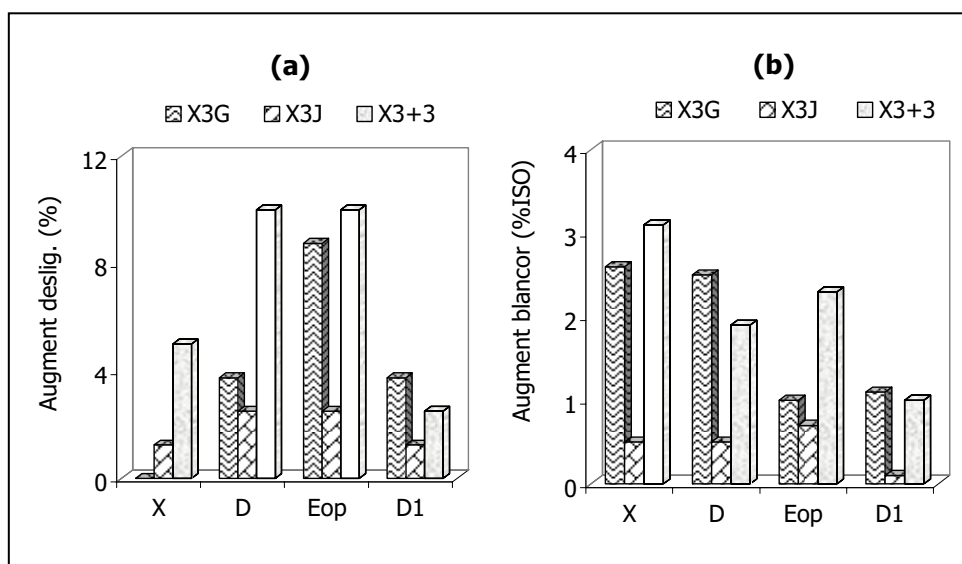


Figura 6-2. Efecte dels pretractaments amb xilanasa en augmentar la designificació (a) i la blancor (b) al llarg de la seqüència de blanqueig

Durant l'etapa X, només en el tractament X_{3+3} es produeix un augment en la deslignificació de la pasta significatiu (del 5%) que pot ser produït per l'eliminació de xilans que continguin bé àcids hexenurònics o bé porcions de lignina atrapada i que s'alliberen juntament amb aquests. Després de les etapes D i Eop els tres tractaments amb xilanasa produeixen efectes significatius en augmentar la deslignificació, amb l' X_{3G} el màxim efecte es produeix després de l'etapa Eop (8,8%), mentre que amb l' X_{3J} en les dues etapes l'efecte és el mateix i del 2,5%; el tractament amb les dues xilanases combinades (X_{3+3}) és el que produeix més efectes i augmenta la deslignificació un 10% en les dues etapes. En aquestes dues etapes (D i Eop) es pot dir que el major efecte en deslignificar la pasta en les pastes pretractades és degut a que la fibra ha quedat més accessible a la penetració dels reactius degut a l'eliminació de xilans a l'etapa X els quals en taponaven l'accés. Per últim, després de l'etapa D_1 els efectes de les xilanases disminueixen i gairebé s'igualen amb la seqüència del blanc; cal destacar que la deslignificació que es produeix al final de la seqüència X_0DEopD_1 és del 90%, i l'Ik al que s'arriba és molt baix per ser disminuït i igual que s'ha obtingut en el capítol 4, aquest pot ser el motiu pel qual l'efecte de les xilanases es veu atenuat. De tota manera, els tractaments X_{3G} i X_{3+3} produeixen un augment en deslignificació del 3,8% i del 2,5% respectivament.

Al capítol 4 on s'ha aplicat una xilanasa comercial, s'ha obtingut un màxim augment en deslignificació del 8% després de l'etapa X i que disminuïa al llarg de la seqüència de blanqueig. Al aplicar les xilanases noves el màxim efecte s'observa en les etapes D i Eop on en l' X_{3G} s'arriba al 8,8% i a l' X_{3+3} al 10%. Per tant, es pot dir que el tractament amb xilanases noves que s'ha realitzat és comparable a un tractament amb xilanasa comercial. En treballs anteriors també s'obté un efecte positiu en disminuir l'Ik al aplicar una xilanasa nova (Torres *et al.*, 2000) i una comercial (Siles *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 1997) al llarg d'una seqüència ECF de blanqueig en pastes d'eucaliptus.

6.3.2 Efecte de les xilanases en la blancor de les pastes al llarg de la seqüència de blanqueig

Igual que en l'índex kappa, s'ha mesurat l'augment en blancor de les seqüències on s'hi ha afegit xilanasa en comparació amb la seqüència del blanc després de cada etapa (Figura 6-2 (b)) a partir dels resultats de la Taula 6-4. S'observa que els tres tractaments amb xilanasa fan augmentar la blancor de les pastes, tant durant la mateixa etapa enzimàtica com al llarg de les següents etapes de blanqueig. Durant l'etapa X, on les xilanases aplicades individualment no produeixen deslignificació però sí aplicades conjuntament, la blancor és augmentada en tots els tractaments i el màxim efecte (3,1%ISO) es produeix en el tractament X_{3+3} . Cal destacar que el tractament X_{3G} no produeix efectes en l'Ik i en canvi l'augment en blancor és elevat

(2,6%ISO) el que pot ser degut a l'eliminació de xilans amb grups comòfors que no contribueixen a l'índex kappa (Wong *et al.*, 1997 (a i b)), en canvi, en el tractament X_{3+3} els productes que s'eliminen també contribueixen a l'índex kappa.

Després de les etapes D i Eop també la blancor es veu augmentada en tots els casos tot i que l'efecte no és superior al que es produeix a l'etapa X com passa en la deslignificació. L'augment en blancor que produeix l' X_{3G} després de l'etapa D és semblant al de l'etapa X i després de les etapes Eop i D_1 l'efecte disminueix. L' X_{3J} produeix també el mateix efecte després de l'etapa D que de l'etapa X i després de l'etapa Eop l'efecte augmenta lleugerament i és on es veu el màxim efecte d'aquesta xilanasa en augmentar la blancor (0,7%ISO) ja que després de l'etapa D_1 gairebé s'igualava amb el blanc. L'augment de blancor que produeix el tractament X_{3+3} després de les etapes D i Eop és inferior al que es produeix després de l'etapa X i després de l'etapa D_1 l'efecte disminueix encara més.

Al capítol 4 s'ha vist que la xilanasa comercial X_C no augmenta la blancor a l'etapa X però sí al llarg de les etapes de blanqueig i s'arriba al màxim a l'etapa Eop amb un augment de blancor del 3,2%ISO. Al aplicar les xilanasas noves s'assoleixen augments semblants de blancor, tot i que el màxim es produeix a la mateixa etapa X, el que suggereix que el tipus de xilans o compostos cromòfors que s'eliminen a l'etapa enzimàtica són diferents entre xilanasas. En Torres *et al.*, 2000 també s'observa un augment de la blancor en les pastes pretractades amb xilanasa al llarg de la seqüència de blanqueig.

Igual que passa en la deslignificació, al final de la seqüència els efectes de les xilanasas queden atenuats, el que es justifica amb els alts valors de blancor assolits en la mateixa seqüència del blanc (89,3%ISO) que són difícils de ser superats.

La xilanasa X_G aplicada a dosi de 3U/gps en aquest capítol produeix més efecte que al capítol anterior on la dosi aplicada ha estat de 2U/gps mentre que la X_J produeix efectes semblants. Quan les dues xilanasas són aplicades conjuntament en el tractament X_{3+3} és quan es produeixen més efectes en deslignificar i blanquejar la pasta el que indica que les dues produeixen efectes sobre la pasta, a l'apartat 6.3.8 s'avalua la possibilitat d'un efecte sinèrgic entre les dues.

6.3.3 Efecte de les xilanasas en la viscositat de les pastes al llarg de la seqüència de blanqueig

A la Taula 6-5 es mostren els resultats de viscositat de les pastes de cada seqüència al llarg de les etapes de blanqueig. La viscositat no es veu afectada a l'etapa X degut a

l'efecte de les xilanases, el que indica que les xilanases utilitzades són específiques de xilans i no presenten activitat cel·lulasa el qual representa una característica interessant per una xilanasa ja que no es veuran afectades les propietats finals dels papers.

Al llarg de la seqüència de blanqueig la viscositat de les pastes no és afectada per les etapes de diòxid de clor però sí que disminueix en tots els tractaments a l'etapa Eop, aquests resultats corresponen amb la literatura on es parla de la forma d'actuar d'aquests dos agents sobre les pastes (García Hortal *et al.*, 1984; Dence, 1996; Lachenal i Chirat, 1999) i es diu que el diòxid de clor és un agent bastant selectiu per la lignina i no ataca als carbohidrats de la pasta mentre que en una extracció alcalina amb oxigen i peròxid, el peròxid es pot descompondre i formar oxigen que reacciona amb la lignina i ell es descompon formant el radical hidroxil que reacciona igual amb la lignina que amb els hidrats de carboni, atacant la cel·lulosa i afectant així la viscositat de la pasta. Resultats semblants en la viscositat de les pastes s'observen en Torres *et al.*, 2000.

Taula 6-5. Viscositat dels diferents tractaments al llarg de la seqüència de blanqueig

	X	D	Eop	D₁
X₀	997±59	994±30	909±16	924±10
X_{3G}	986±31	994±21	909±10	928±12
X_{3J}	961±42	936±44	871±26	868±56
X₃₊₃	991±10	972±35	883±0	850±25
B	-	960±5	894±50	780±10

6.3.4 Efecte de les xilanases en el contingut en àcids hexenurònics (HexA) de les pastes al llarg de la seqüència de blanqueig

Els àcids hexenurònics es formen durant la cocció alcalina de la fusta on part dels àcids 4-*O*-metilglucurònics presents en els xilans es converteixen amb el seu corresponent àcid insaturat hexenurònic per la pèrdua del metanol, formant-se un doble enllaç entre els carbonis C4 i C5 (Teleman *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2000; Shatalov i Pereira, 2004; Simao *et al.*, 2005; Danielsson *et al.*, 2006; Johanson i Germgard, 2006). Els HexA són importants degut als seus efectes negatius en les pastes, ja que contribueixen a l'índex kappa, consumeixen reactius de blanqueig, participen en la retenció de ions metàl·lics, contribueixen a la reversió del grau de blanc, i contribueixen a la formació d'àcid oxàlic. Segons la bibliografia aquests HexA només es poden eliminar químicament mitjançant oxidants electrofíl·lics que actuen sobre el doble enllaç, com el clor, el diòxid de clor, l'ozó i els peràcids (Bergnor-Gidnert *et al.*, 1998; Allison *et al.*, 1999;

Vuorinen *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2000) o bé també mitjançant una hidròlisi àcida, actuant en l'enllaç que hi ha entre l'HexA i el xilà (Chai *et al.*, 2001).

Però com que aquests HexA pengen dels xilans, teòricament si s'eliminessin aquests xilans juntament amb ells també s'eliminarien HexA, i com que la xilanasa hidrolitza xilans de la superfície de la fibra els quals contenen HexA, també és d'esperar que un tractament enzimàtic amb xilanasa redueixi el contingut en HexA. Al capítol anterior s'ha demostrat aquesta teoria ja que les quatre xilanases noves aplicades disminueixen el contingut en HexA de les pastes i també s'ha obtingut que amb un tractament X_{2G} el contingut en HexA és menor tant després de l'etapa X com després de l'etapa D mentre que amb el tractament X_{2J} només s'ha vist un lleuger efecte després de l'etapa D. En aquest apartat s'avalua l'efecte d'aquestes dues xilanases aplicades soles o conjuntament al llarg de la seqüència completa de blanqueig augmentant la dosi d'enzim aplicada a l'etapa X a 3U/gps. Els resultats del contingut en HexA de les pastes de cada tractament i al llarg de la seqüència de blanqueig es mostren a la Taula 6-6.

Taula 6-6. Contingut en HexA de les pastes al llarg de la seqüència de blanqueig

	X	D	Eop	D₁
X₀	37,0 ± 0,6	16,5 ± 0,4	16,1 ± 0,6	2,0 ± 0,2
X_{3G}	34,6 ± 0,8	11,9 ± 0,3	12,8 ± 0,6	1,2 ± 0,1
X_{3J}	35,7 ± 1,2	14,4 ± 0,9	14,2 ± 1,1	1,9 ± 0,1
X₃₊₃	33,7 ± 0,7	12,4 ± 0,6	12,6 ± 0,9	0,9 ± 0,1
B	-	16,3 ± 0,2	16,8 ± 0,4	3,1 ± 0,04

Abans d'avaluar l'efecte dels tractaments amb xilanases es té en compte l'efecte que produeixen els reactius de blanqueig en les etapes D i Eop en aquests HexA. S'observa que els HexA disminueixen en les etapes de diòxid de clor però en canvi l'etapa Eop no els afecta. Aquest comportament dels reactius front els HexA és totalment coherent amb la literatura, on es diu que el diòxid de clor és un oxidant electrofílic que pot actuar sobre el doble enllaç de l'àcid hexenurònic i destruir-lo mentre els HexA no reaccionen en estadis de blanqueig en medi alcalí com l'oxigen i el peròxid d'hidrogen (Buchert *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2000; Chai *et al.*, 2001a; de la Rosa, 2003). La majoria d'HexA (aproximadament el 52%) s'eliminen a la primera etapa de diòxid de clor mentre que a la segona (D₁) ja no se n'eliminen tants (30%), aquests resultats corresponen amb els obtinguts en Malinen i Nhan, (2006) i el fet que l'etapa D₁ sigui menys efectiva pot ser degut possiblement a que n'hi ha menys per eliminar o bé a que les condicions de l'etapa com el pH siguin menys adients. El pH àcid (1,2) de l'etapa D contribueix a la major eliminació d'HexA (Allison *et al.*, 1999) ja que afavoreix la formació de clor el qual és un eficient oxidant dels HexA (Torngren i Gellerstedt,

1997), mentre que a la segona etapa D₁ és el diòxid de clor mateix el major responsable de la degradació dels HexA (Torngren, 2002).

Atenent als efectes de les xilanases en aquests àcids al llarg de la seqüència de blanqueig, els resultats demostren que les dues xilanases fan disminuir el contingut en HexA de les pastes des de l'etapa X i al llarg de tota la seqüència de blanqueig, sempre veient-se més efecte al tractament X_{3G} que a l'X_{3J}. Quan les dues xilanases són aplicades conjuntament, s'observa un contingut en HexA inferior a la seqüència X_{3G} després de les etapes X i D₁.

S'ha calculat el percentatge d'eliminació d'HexA de cada seqüència de blanqueig després de cada etapa i del resultat obtingut dels tractaments amb xilanasa es resta l'efecte produït a la seqüència del blanc, de tal manera que el resultat que s'obté correspon a l'augment en eliminació d'HexA produït per l'efecte de les xilanases. Aquests resultats estan representats gràficament a la Figura 6-3.

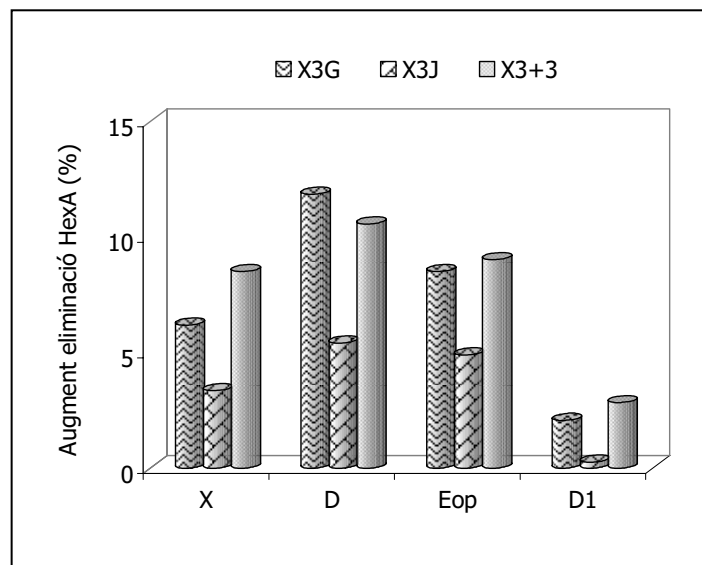


Figura 6-3. Efecte dels pretractaments amb xilanasa en augmentar l'eliminació d'HexA al llarg de la seqüència de blanqueig

Durant l'etapa X els tres tractaments amb xilanasa augmenten l'eliminació d'HexA que és deguda a l'eliminació de xilans de la superfície de la fibra els quals contenen HexA, tal com s'ha demostrat al capítol anterior, i també per Roncero *et al.*, (2005) i per Shatalov i Pereira, (2007). El major efecte en eliminar HexA en aquesta etapa es produeix en el tractament X₃₊₃ (8,5%), seguit de l'X_{3G} (6,2%) i de l'X_{3J} (3,4%) el que correspon amb l'augment de blancor, però no correspon amb l'augment en

deslignificació, ja que el tractament X_{3G} no l'augmenta i en canvi sí que augmenta l'eliminació d'HexA, si es té en compte que els HexA contribueixen en l'índex kappa i els HexA disminueixen, és d'esperar que l'Ik disminueixi, si no ha disminuït es pot justificar ja que potser aquesta disminució no es detecta en l'Ik.

Després de l'etapa D l'augment en eliminació d'HexA produït per l'efecte de les xilanases augmenta respecte l'etapa X i és en aquesta etapa on es veu el màxim efecte de les xilanases en augmentar l'eliminació d'aquests àcids, el màxim efecte es produeix amb el tractament X_{3G} on l'augment en eliminació d'HexA és del 12% seguit de l'X₃₊₃ (10,6%) i de l'X_{3J} (5,4%). El fet que després de l'etapa D l'efecte sigui major que en l'etapa X, indica que el diòxid de clor ha penetrat millor a l'interior de les fibres en els tractaments amb xilanasa eliminant major quantitat d'HexA.

Si es comparen aquests resultats amb els del capítol anterior on aquestes xilanases s'han aplicat a menor dosi, tant a l'etapa enzimàtica X com a l'etapa D s'ha produït major eliminació d'HexA al augmentar la dosi.

Després de l'etapa Eop l'efecte en els HexA és igual o bé inferior a l'etapa D, el que és d'esperar ja que aquesta etapa no produeix efecte en aquests àcids. D'altra banda, després de l'etapa D₁, igual que passa en les propietats d'índex kappa i blancor, l'efecte dels pretractaments amb xilanasa queden molt atenuats i en el cas de l'X_{3J} no s'observen efectes, el que deu ser degut al baix contingut en HexA que s'arriba a la seqüència del blanc i que és difícil de disminuir.

6.3.4.1 Efecte dels HexA en l'índex kappa de les pastes al llarg de la seqüència de blanqueig

L'índex kappa mesura la quantitat total de material a la pasta que és oxidat pel permanganat potàssic. Tanmateix, el mètode no diferencia entre material oxidable en la lignina residual o en altres estructures, com els àcids hexenurònics, els extractius i els grups carbonil de les pastes (Li *et al.*, 2002 (a i b)). Aquestes estructures mostren diferent taxes de reacció pels agents de blanqueig ECF com el diòxid de clor i el peròxid d'hidrogen. En Costa i Colodette, (2007) s'avalua la composició de les fraccions que contribueixen en l'índex kappa i es suggereix la possibilitat que no tots els HexA de la pasta estiguin units al polímer de xilà sinó que n'hi hauria una petita porció que estaria unida a la lignina, aquests HexA no es detecten en el mètode de quantificar els HexA el qual es basa en una hidròlisi àcida selectiva entre l'HexA i el polímer de xilà.

A la Figura 6-4 s'ha representat l'índex kappa front el contingut en HexA de les pastes i s'observa que les dues propietats estan relacionades al llarg de les etapes D i D₁ on

una disminució en l'Ik implica una disminució en el contingut en HexA. D'altra banda, durant l'etapa Eop, no disminueixen els HexA però en canvi sí que disminueix l'índex kappa obtenint-se pastes amb el mateix contingut en HexA però amb menor Ik, el que indicarà segurament que en aquesta etapa ha disminuït el contingut en lignina.

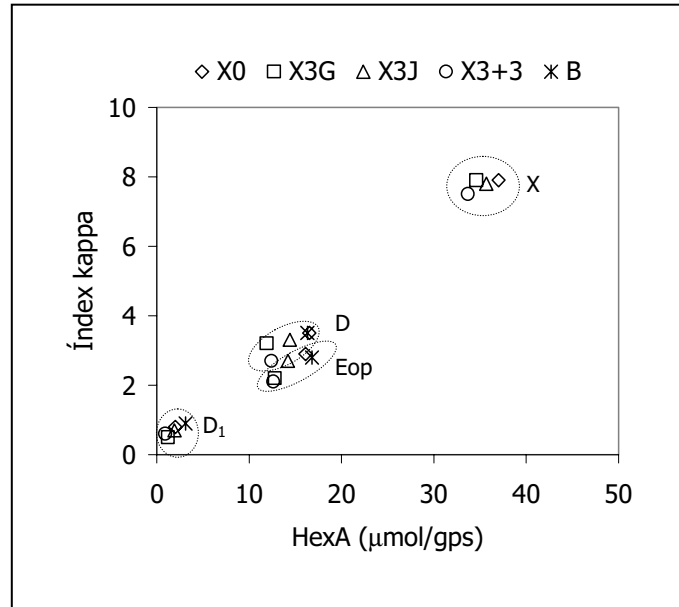


Figura 6-4. Índex kappa vs. HexA de tots els tractaments després de cada etapa

Igual que al capítol anterior, s'ha calculat la contribució dels HexA en l'Ik i la contribució de la lignina (Taula 6-7) a partir de les Eq. 6-3 i Eq. 6-4 i suposant que l'Ik que no és degut als HexA és degut a la lignina ja que els HexA i la lignina residual constitueixen les dues fraccions principals de l'índex kappa en les pastes kraft (Li i Gellerstedt, 1997 i 1998).

$$Ik_{HexA} = HexA * 0,086 \quad \text{Eq. 6-3}$$

$$Ik_{lig} = Ik - Ik_{HexA} \quad \text{Eq. 6-4}$$

Taula 6-7. Contribució dels HexA i de la lignina en l'índex kappa al llarg de les seqüències de blanqueig

	X		D		Eop		D₁	
	Ik_{HexA}	Ik_{lig}	Ik_{HexA}	Ik_{lig}	Ik_{HexA}	Ik_{lig}	Ik_{HexA}	Ik_{lig}
X₀	3,2	4,7	1,4	2,1	1,4	1,5	0,2	0,6
X_{3G}	3,0	4,9	1,0	2,2	1,1	1,1	0,1	0,4
X_{3J}	3,1	4,7	1,2	2,1	1,2	1,5	0,2	0,5
X₃₊₃	2,9	4,6	1,1	1,6	1,1	1,0	0,1	0,5
B	-	-	1,4	2,1	1,4	1,4	0,3	0,6

Quan s'ha comentat l'efecte de les xilanases en l'índex kappa de les pastes, s'ha dit que només el tractament X₃₊₃ augmenta la deslignificació a l'etapa X, d'altra banda els resultats de la Taula 6-7 indiquen que l'Ik_{lig} no es veu afectat per les xilanases i el que disminueix és l'Ik_{HexA}, en l'X_{3G} no ha disminuït l'Ik total i en canvi ara es diu que sí que baixa l'Ik_{HexA}, el que pot ser justificat ja que la disminució en HexA que es produeix està dins l'error del mètode de l'índex kappa.

Després de l'etapa D, l'Ik_{HexA} disminueix en tots els tractaments respecte el blanc i l'Ik_{lig} només disminueix en el tractament X₃₊₃, mentre que després de l'etapa Eop, l'Ik_{HexA} és també inferior en tots els tractaments amb xilanasa però igual a D i l'Ik_{lig} és inferior en l'X_{3G} i en l'X₃₊₃. Després de l'etapa D₁, igual que passa en la resta de les propietats de les pastes, els tractaments amb xilanasa s'igualen amb el blanc.

A la Figura 6-5 es mostra l'efecte de cada etapa en la disminució de l'Ik_{HexA} i l'Ik_{lig}, s'observa que a l'etapa X sobretot disminueix lleugerament l'Ik_{HexA} per l'efecte de les xilanases, mentre que a l'etapa D disminueixen tots dos en la mateixa proporció el que indica que el diòxid de clor ataca per igual als HexA i a la lignina. De tota manera, en Costa i Colodette, (2007) es diu que el diòxid de clor reacciona més ràpidament amb la lignina que amb els HexA. Com ja s'ha comentat, l'etapa Eop no afecta als HexA i per tant en aquesta etapa la disminució en l'índex kappa és deguda a l'eliminació de lignina. Per últim, l'etapa D₁, tot i que també elimina tant HexA com lignina, no fa tant efecte com la primera etapa i s'eliminen HexA en major proporció que lignina. En Torngren, (2002) es diu que en els estadis finals de blanqueig, quan queda poc clor residual a la pasta, els HexA són eficientment degradats pel diòxid de clor.

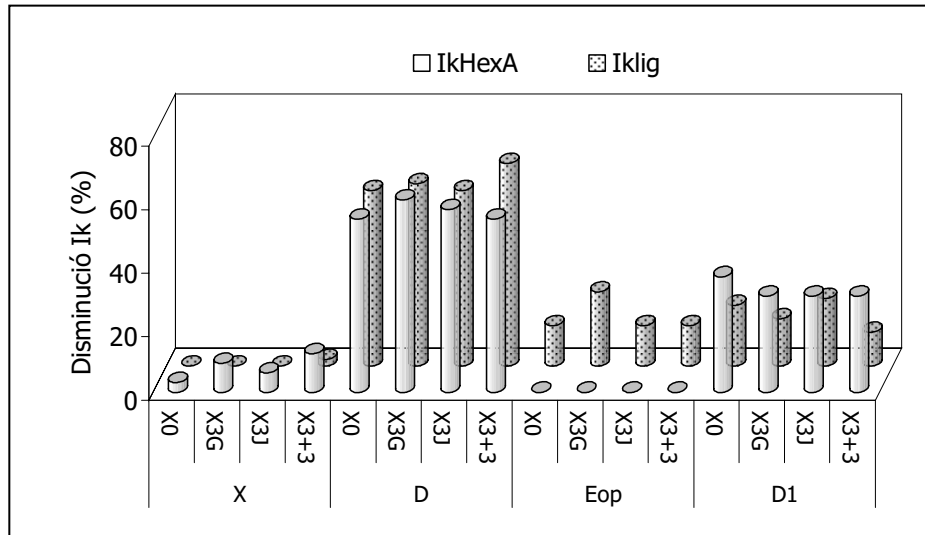


Figura 6-5. Efecte de cada etapa en disminuir l' I_{kHexA} i l' I_{klig}

Per tant, queda demostrat que els HexA presenten gran influència en l'índex kappa de les pastes la qual varia en funció de l'estadi de blanqueig. En les etapes X i D els HexA contribueixen al voltant del 40% en l' I_k , però aquesta proporció augmenta després de l'etapa Eop fins a gairebé el 50% ja que en aquesta etapa s'elimina lignina i no HexA, i torna a disminuir fins al 20% després de l'etapa D₁ en la qual s'elimina més HexA que lignina.

6.3.5 Efecte de les xilanases en la cromatografia en capa fina dels efluents de les etapes X i D

S'ha realitzat la cromatografia en capa fina dels efluents al llarg de les etapes de blanqueig però només es mostren els resultats de les etapes X i D ja que en les etapes Eop i D₁ no s'han observat efectes en les quantitats d'efluent aplicades sobre les plaques. A l'etapa X l'objectiu és avaluar si les xilanases han actuat hidrolitzant el polímer de xilà ja que els productes de la hidròlisi hauran passat als efluents, al capítol anterior s'ha demostrat que la presència de xilans dissolts als efluents està molt relacionat amb les habilitats al blanqueig d'una xilanasa. D'altra banda, l'objectiu de realitzar la cromatografia en capa fina dels efluents de l'etapa D és per tal de veure si el diòxid de clor ha produït més eliminació de xilà en les pastes pretractades amb xilanasa (en capítols anteriors s'ha demostrat que el diòxid de clor dissol xilà).

6.3.5.1 Etapa X

A la Figura 6-6 es mostra la cromatografia en capa fina dels efluent de l'etapa X, les línies 1 i 2, corresponen al tractament X_0 on no apareixen marques de cap tipus de xilà dissoltes als efluent, el que correspon amb els resultats obtinguts en les propietats de les pastes on gairebé no afecta aquest tractament sobre la pasta utilitzada. Les línies 3 i 4 corresponen als efluent del tractament X_{3j} i s'observa que aquesta xilanasa ha hidrolitzat el polímer de xilà de les fibres donant lloc sobretot a oligòmers de més de quatre xiloses. Aquesta dissolució de xilans estaria relacionada amb el lleuger augment de la blancor i amb la disminució del contingut en HexA en aquesta etapa. Segons Shatalov i Pereira, (2007) els oligòmers de 5 a 8 xiloses alliberats pel tractament amb xilanasa són els que contenen unitats àcids HexA el que justificaria el resultat obtingut.

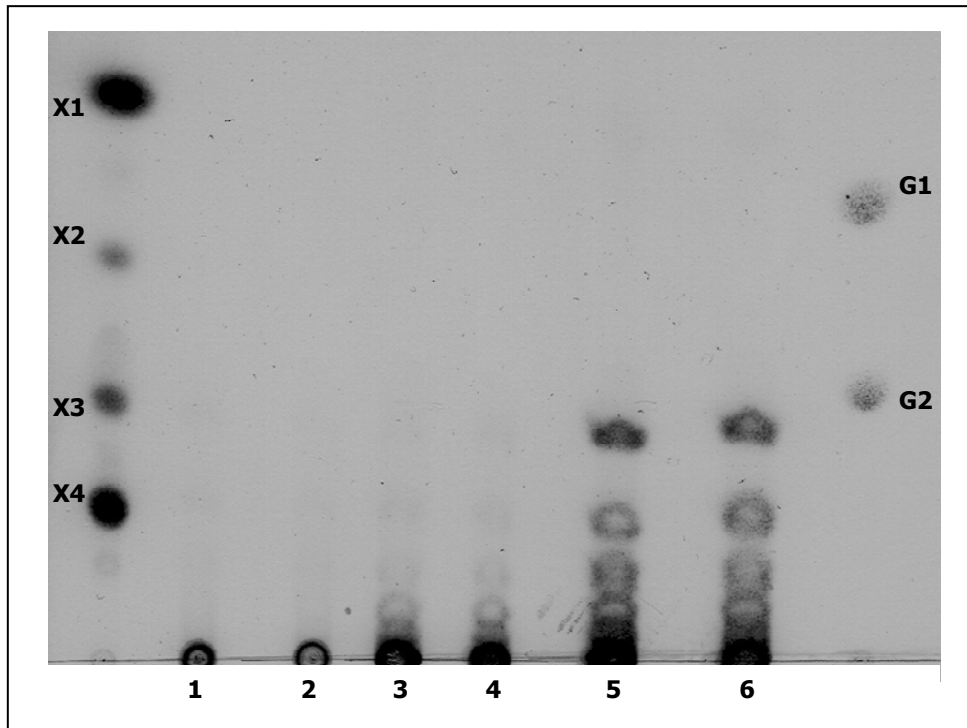


Figura 6-6. Cromatografia en capa fina dels efluent de l'etapa X (1 i 2: X_0 ; 3 i 4: X_{3j} ; 5: X_{3G} ; 6: X_{3+3})

La línia 5 correspon als efluent del tractament X_{3G} , aquesta xilanasa produeix més efecte que l' X_{3j} en hidrolitzar el polímer de xilà i igual que s'ha vist al capítol anterior allibera oligòmers corresponents a la xilotriosa, xilotetraosa i altres sucres de més de quatre xiloses. La major hidròlisi del polímer de xilà està relacionat amb els efectes en

les propietats de les pastes ja que el tractament X_{3G} produeix més augment en blancor i més eliminació d'HexA que el tractament X_{3J} .

Per últim, la línia 6 correspon als efluent del tractament X_{3+3} i el patró de xilans que s'observa és el mateix que el de l' X_{3G} . Per tant, es pot dir que la xilanasa X_{3G} ha actuat igual que quan és aplicada individualment, mentre que no es pot dir que l' X_{3J} hagi actuat ja que el seu patró d'eliminació de xilans hauria quedat emmascarat pel de l' X_{3G} , d'altra banda, els resultats en les propietats de les pastes han demostrat que segurament l' X_{3J} també ha actuat ja que el tractament X_{3+3} produeix més efecte que l' X_{3G} tant en augmentar la deslignificació i la blancor com en produir més eliminació d'HexA.

6.3.5.2 Etapa D

A la Figura 6-7 es mostra la cromatografia en capa fina dels efluent de l'etapa D. Les línies 1 i 2 corresponen als efluent del tractament X_0 i s'observa que el diòxid de clor ha provocat una lleugera alliberació d'oligòmers corresponents a la xilotetraosa i xilotriosa. Les línies 3 i 4 corresponen als efluent del tractament X_{3J} i hi apareixen els mateixos sucres que en els efluent del blanc però lleugerament en més intensitat.

En els tractaments X_{3G} i X_{3+3} (línies 5 i 6) s'hi observen xilo-oligòmers clarament visibles i més intensos que al blanc i a més de la xilotriosa i xilotetraosa, també hi apareixen sucres de més de quatre xiloses. Es pot dir, per tant, que després de l'etapa X, els tractaments X_{3G} i X_{3+3} han deixat la fibra més accessible per a la penetració del diòxid de clor el qual ha produït més eliminació de xilans. En les propietats de les pastes també augmenta tant la deslignificació i la blancor com l'eliminació d'HexA en aquesta etapa en els dos tractaments. Cal destacar que en els efluent del tractament X_{3+3} els sucres que hi apareixen hi són en molta més quantitat que en l' X_{3G} ja que la xilotriosa i xilotetraosa són molt més intenses i a més també hi apareix la xilobiosa que no apareix en l' X_{3G} . Aquest comportament demostra que a l'etapa X totes dues xilanases han actuat i es pot dir que la fibra ha quedat més accessible a la penetració del diòxid de clor que quan l' X_{3G} ha estat aplicada individualment, a més, segons l'eliminació de xilans, l'efecte en el tractament X_{3+3} és superior que la suma dels dos tractaments per separat, el que indicaria la possibilitat d'un efecte sinèrgic entre les dues xilanases. A l'apartat 6.3.8 es comenta més detalladament la possibilitat d'un efecte sinèrgic entre les dues xilanases.

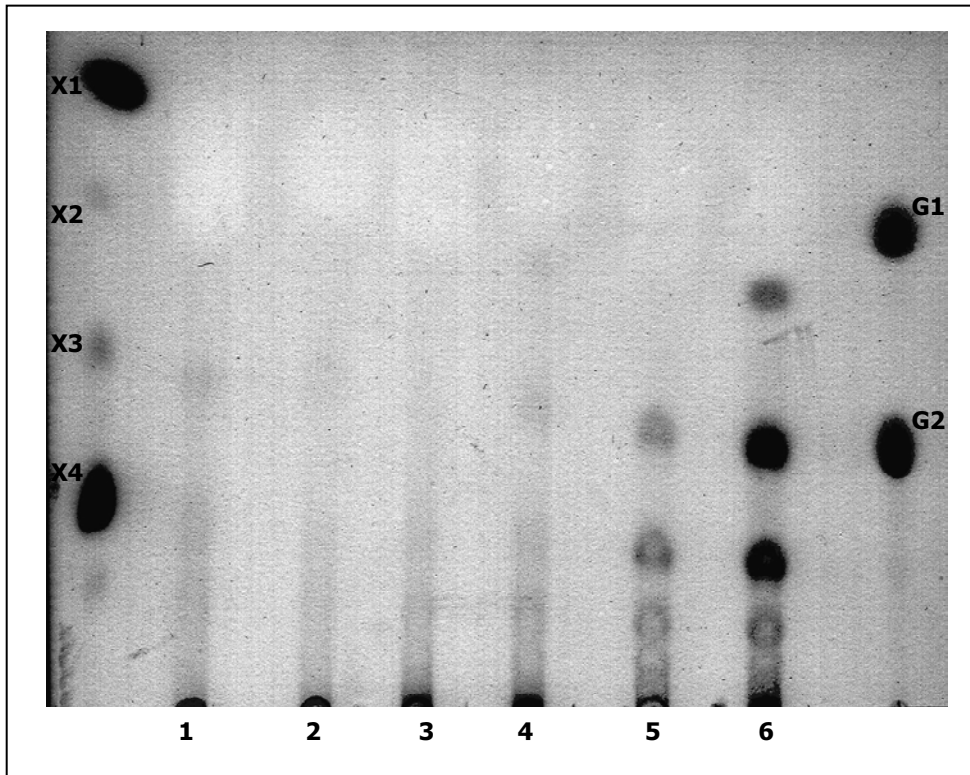


Figura 6-7. Cromatografia en capa fina dels efluentes de l'etapa D (1 i 2: X_0 ; 3 i 4: X_{33} ; 5: X_{3G} ; 6: X_{3+3})

La cromatografia en capa fina dels efluentes indica que els tractaments amb xilanasa provoquen l'alliberació de xilans de les pastes el que podria comportar d'una banda, una pèrdua en rendiment i d'altra banda un augment en la DQO dels efluentes. De tota manera, en Johanson i Germgard, (2006) es diu que és més important la concentració en HexA de les pastes que la quantitat de xilà que es perd.

6.3.6 Efecte de les xilanases en l'espectre d'absorbància dels efluentes de l'etapa X

Tal com s'ha demostrat al capítol anterior, un tractament amb xilanasa produeix l'alliberació de productes que passen als efluentes i que absorbeixen a una determinada longitud d'ona. També s'ha demostrat que la presència d'aquests productes als efluentes es correlaciona amb les habilitats posteriors al blanqueig per una determinada xilanasa, el que podria ser una manera ràpida d'avaluar-ne la seva efectivitat.

Els espectres d'absorbància que es mostren a la Figura 6-8 corresponen als espectres dels tractaments enzimàtics corresponents en els quals se'ls ha restat l'espectre d'absorbància del tractament X_0 i de l'enzim corresponent de tal manera que els pics d'absorbància que apareixen representen els productes que el tractament amb xilanasa ha alliberat. S'observa que apareixen dos pics en tots els tractaments, un al voltant dels 280 nm que correspon a la lignina (Bikova i Treimanis, 2004), i una al voltant de 237-240 que correspondria a xilans amb àcids hexenurònics ja que aquests absorbeixen en aquestes longituds d'ona (Teleman *et al.*, 1995; Vuorinen *et al.*, 1999; Bikova i Treimanis, 2004; Ragnar, 2005).

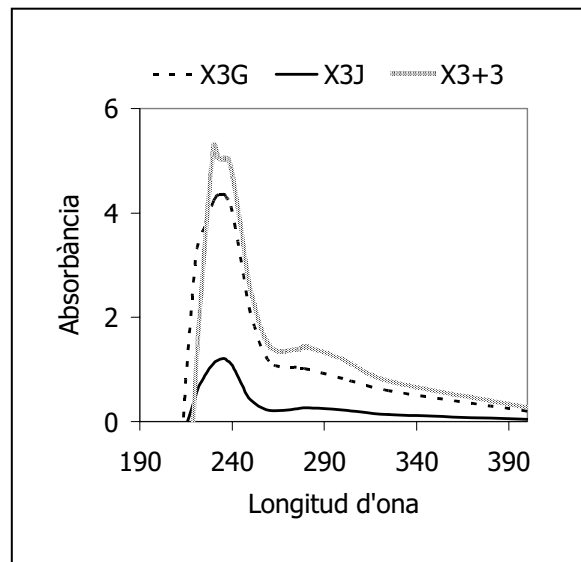


Figura 6-8. Espectres d'absorbància dels efluentes de l'etapa X restant l'espectre del blanc i l'enzim corresponent

Per tant, es pot dir que els tres tractaments amb xilanasa augmenten tant l'eliminació de lignina com d'HexA. També s'observa clarament que el tractament X_{3G} elimina més quantitat d'aquests productes que l'X_{3J} i l'X₃₊₃ produeix un efecte lleugerament superior a l'X_{3G}. Els espectres obtinguts en els efluentes de l'etapa X corresponen amb els efectes observats en les propietats de les pastes i en l'alliberació de xilans observada per cromatografia en capa fina. Al comentar els resultats en $I_{K_{lig}}$, s'ha dit que el tractament enzimàtic no elimina lignina, però pot ser degut que aquesta lignina eliminada no es detecti pel mètode de determinació de l'índex kappa.

6.3.7 Efecte de les xilanases en la DQO i el Color dels efluents al llarg de la seqüència de blanqueig

S'ha mesurat la DQO i Color de tots els tractaments al llarg de tota la seqüència de blanqueig i els resultats es mostren a la Taula 6-8.

Taula 6-8. DQO i Color dels efluents dels tractaments X_0 , X_{3G} , X_{3J} i X_{3+3} després de cada etapa de blanqueig

	X	D	Eop	D₁
	DQO (Kg O₂/T pasta)			
X₀	34,3±0,3	2,8±0,2	6,1±0,4	1,6±0,2
X_{3G}	60,0±0,6	8,9±0,1	8,9±0,3	1,3±0,0
X_{3J}	36,7±2,7	4,8±0,2	7,1±0,3	1,7±0,1
X₃₊₃	55,7±1,3	16,2±0,5	7,3±0,4	1,4±0,1
B	-	4,1±0,2	6,1±0,1	1,8±0,2
	Color (Kg Pt/T pasta)			
X₀	0,7±0,1	0,8±0,1	0,9±0,2	0,2±0,1
X_{3G}	2,1±0,2	0,7±0,1	1,2±0,1	0,2±0,0
X_{3J}	1,5±0,1	0,2±0,1	1,2±0,1	0,2±0,0
X₃₊₃	4,2±0,0	0,4±0,0	0,4±0,0	0,2±0,0
B	-	0,2±0,0	1,2±0,1	0,2±0,0

6.3.7.1 Demanda química d'oxigen (DQO)

A la Figura 6-9 es mostra la DQO acumulada per etapes de tots els tractaments al llarg de la seqüència de blanqueig. S'observa que al voltant del 70% de la DQO es produeix a l'etapa X, tant en els tractaments amb xilanasa com en el blanc (X_0). Si es compara la seqüència del blanc X_0 DEopD₁ amb la seqüència B (DEopD₁) s'observa que el tractament X_0 és el responsable d'eleva la DQO acumulada en la seqüència del blanc, la cromatografia en capa fina dels efluents de l'etapa X del tractament del blanc demostra que no hi ha xilans presents en els efluents, per tant l'alt valor en DQO és degut al tampó Tris-HCl utilitzat el qual és un producte orgànic que tal com s'observa dona molta DQO.

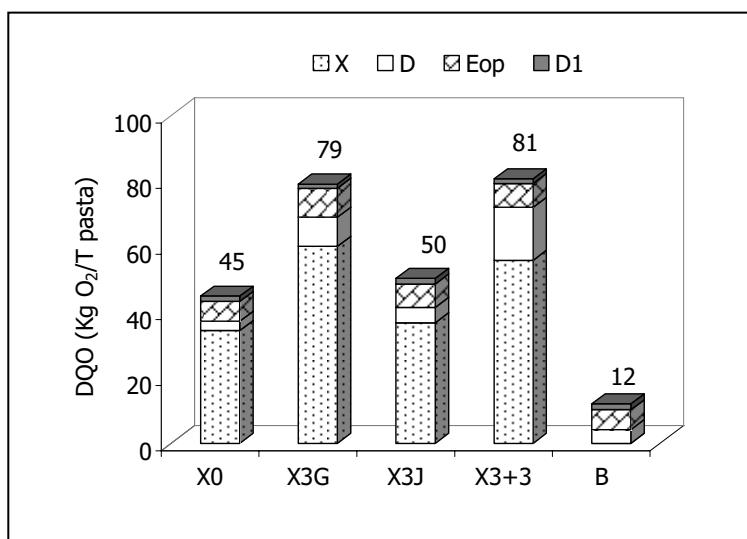


Figura 6-9. DQO acumulada dels diferents tractaments al llarg de la seqüència de blanqueig

Si es compara la DQO acumulada dels tractaments enzimàtics amb la seqüència X_0DEopD_1 s'observa que tots ells l'augmenten, sobretot els tractaments X_{3G} i X_{3+3} (35 Kg O₂/T pasta) i el tractament X_{3J} lleugerament (5 Kg O₂/T pasta).

En el tractament X_{3J} l'augment en la DQO acumulada és degut a que al llarg de les etapes X, D i Eop presenta una DQO sempre lleugerament per sobre del blanc. En canvi, en els tractaments X_{3G} i X_{3+3} el major augment de DQO produït per l'efecte de les xilanases es dona a l'etapa X i és aproximadament igual entre els dos, el que va lligat amb l'efecte que aquests tractaments han produït en hidrolitzar el xilà tal com s'ha observat en la cromatografia en capa fina d'aquesta etapa. Per tant, l'augment en la DQO a l'etapa X es relaciona amb la dissolució de xilans. L'enzim produeix DQO però queda dins l'error de la DQO del tampó. El tractament X_{3G} al llarg de les etapes D i Eop presenta una DQO per sobre del blanc, mentre que en el tractament X_{3+3} destaca un augment considerable en la DQO en els efluentes de l'etapa D. L'augment de DQO en els efluentes de l'etapa D va estretament relacionat amb el que s'ha observat en la cromatografia en capa fina d'aquesta etapa on el tractament X_{3+3} augmenta molt la quantitat de xilans dissolts.

6.3.7.2 Color

A la Figura 6-10 es mostra representat gràficament el color acumulat al llarg de les etapes de blanqueig dels diferents tractaments realitzats. El color acumulat de la seqüència X_0DEopD_1 és lleugerament superior a la seqüència sense el blanc $DEopD_1$

(B) degut a que la mateixa etapa X_0 augmenta lleugerament el color el qual no és degut al tampó sinó que pot ser degut a que a l'estar la pasta amb el tampó es dissolgui algun producte que faci augmentar el color.

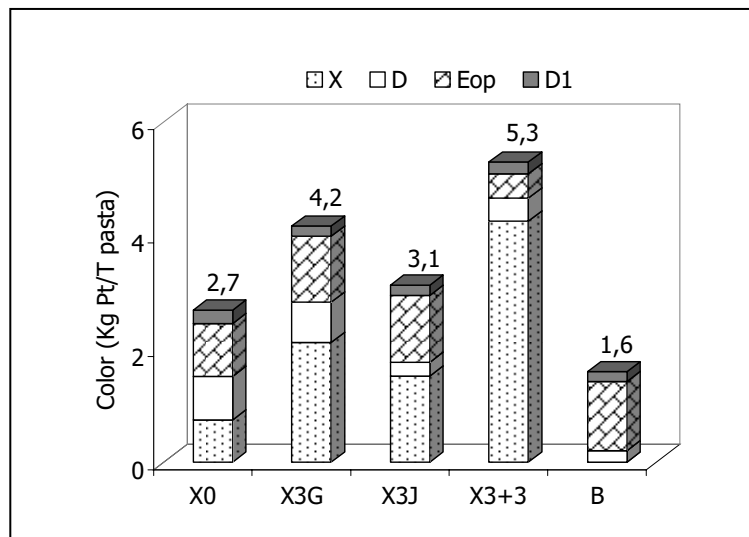


Figura 6-10. Color acumulat dels diferents tractaments al llarg de la seqüència de blanqueig

Si es comparen els tractaments amb xilanas amb la seqüència X_0DEopD_1 s'observa que tant l' X_{3G} com l' X_{3J} com l' X_{3+3} fan augmentar el color acumulat dels efluent (1,5, 0,4 i 2,6 Kg Pt/T pasta respectivament), però aquest augment de color es produeix sobretot a la mateixa etapa enzimàtica X. El tractament X_{3+3} augmenta el color més que l' X_{3G} el que està relacionat amb la major deslignificació, el major augment de blancor i la major eliminació d'HexA i lignina per aquest tractament.

Els resultats obtinguts en les propietats dels efluent estan relacionats amb els de les propietats de les pastes on s'ha obtingut que els tractaments amb xilanas augmenten la blancor i l'eliminació en HexA i també s'ha vist que incrementen l'eliminació de lignina. Igual que passa en les propietats de les pastes, després de l'etapa D_1 no s'observen efectes dels tractaments amb xilanas ni en la DQO ni en el color dels efluent.

L'augment de DQO i color que es produeix a l'etapa X és degut als productes que elimina el mateix tractament enzimàtic mentre que l'augment de DQO que es produeix a les etapes D i Eop és degut a que aquests reactius penetren millor a l'interior de les fibres augmentant l'alliberació de productes que donen DQO i demostra que les fibres queden més accessibles després d'un tractament amb xilanas.

Per últim, es pot dir que els alts valors de DQO i color de les seqüències amb etapa de pretractament enzimàtic amb xilanasa provenen de l'etapa X, coincideixen amb els resultats del capítol 4 al aplicar una xilanasa comercial i amb experiències anteriors (Siles *et al.*, 1996; Roncero, 2001) i constitueix el principal inconvenient d'aquest pretractament en els processos de blanqueig de pastes.

6.3.8 Estudi del possible efecte sinèrgic entre les dues xilanases

L'efecte sinèrgic al aplicar dues xilanases conjuntament ha estat estudiada en algun treball anterior: en Elegir, *et al.*, (1995) es diu que dues xilanases difereixen en la seva capacitat de millorar el blanqueig i d'alliberar xilans combinades sinèrgicament durant el preblanqueig de coníferes i en Clarke *et al.*, (1997) s'observa un efecte sinèrgic combinant dues xilanases de la família 10 en l'alliberació de sucres i en la reducció de l'índex kappa. Les xilanases X_{3G} i X_{3J} utilitzades provenen de la mateixa soca bacteriana *Bacillus* sp. BP-7 i pot ser que en el seu hàbitat natural actuïn sinèrgicament en degradar el polímer de xilà, per aquest motiu s'estudia si aplicades conjuntament sobre la pasta kraft d'eucaliptus presenten algun efecte sinèrgic.

Per tal d'avaluar el possible efecte sinèrgic entre les dues xilanases, es té en compte l'efecte que cada xilanasa produeix respecte la seqüència del blanc i se sumen les diferències que cada xilanasa aplicada individualment produeix respecte el blanc, aquest resultat es compara amb els efectes respecte el blanc que produeix el tractament X_{3+3} quan les dues són aplicades conjuntament, d'aquesta manera es comparen els resultats amb la mateixa dosi d'enzim aplicada (3 unitats de l' X_G i 3 de l' X_J). Es diu que hi ha un efecte sinèrgic quan les dues xilanases aplicades conjuntament produeixen més efecte que la suma de les dues aplicades individualment. S'han representat els efectes de les dues xilanases aplicades conjuntament (X_{3+3}) i l'efecte al sumar les dues per separat (X_{3G}/X_{3J}) tant en les propietats de les pastes (Figura 6-11) com dels efluents (Figura 6-12).

Els resultats demostren que durant l'etapa X, hi ha un efecte sinèrgic en augmentar la deslignificació que és del 3,7% superior al esperat que va lligat amb un major augment en el color dels efluents, d'altra banda l'augment en blancor i en eliminació d'HexA correspon a la suma dels dos efectes per separat, el que va lligat amb els xilans observats en cromatografia en capa fina dels efluents així com en l'espectre d'absorbància d'aquesta etapa i la DQO que també corresponen a la suma dels dos efectes per separat.

A l'etapa D es continua observant l'efecte sinèrgic en augmentar la deslignificació que és del 3,7% superior al esperat i ja no s'observa en augmentar el color però sí en

l'augment en la dissolució de xilans visibles per cromatografia en capa fina el que es tradueix en un major augment en la DQO. Després de l'etapa Eop ja no s'observa efecte sinèrgic en augmentar la desdesignació i tampoc en les propietats dels efluentes, però sí que s'observa en augmentar la blancor que és del 0,6%ISO superior al esperat i després de l'etapa D₁ en cap de les propietats s'observa un efecte sinèrgic. En cap dels casos s'observa un efecte sinèrgic en l'eliminació d'HexA tot i que després de les etapes X i D₁ l'efecte és igual a la suma dels dos per separat.

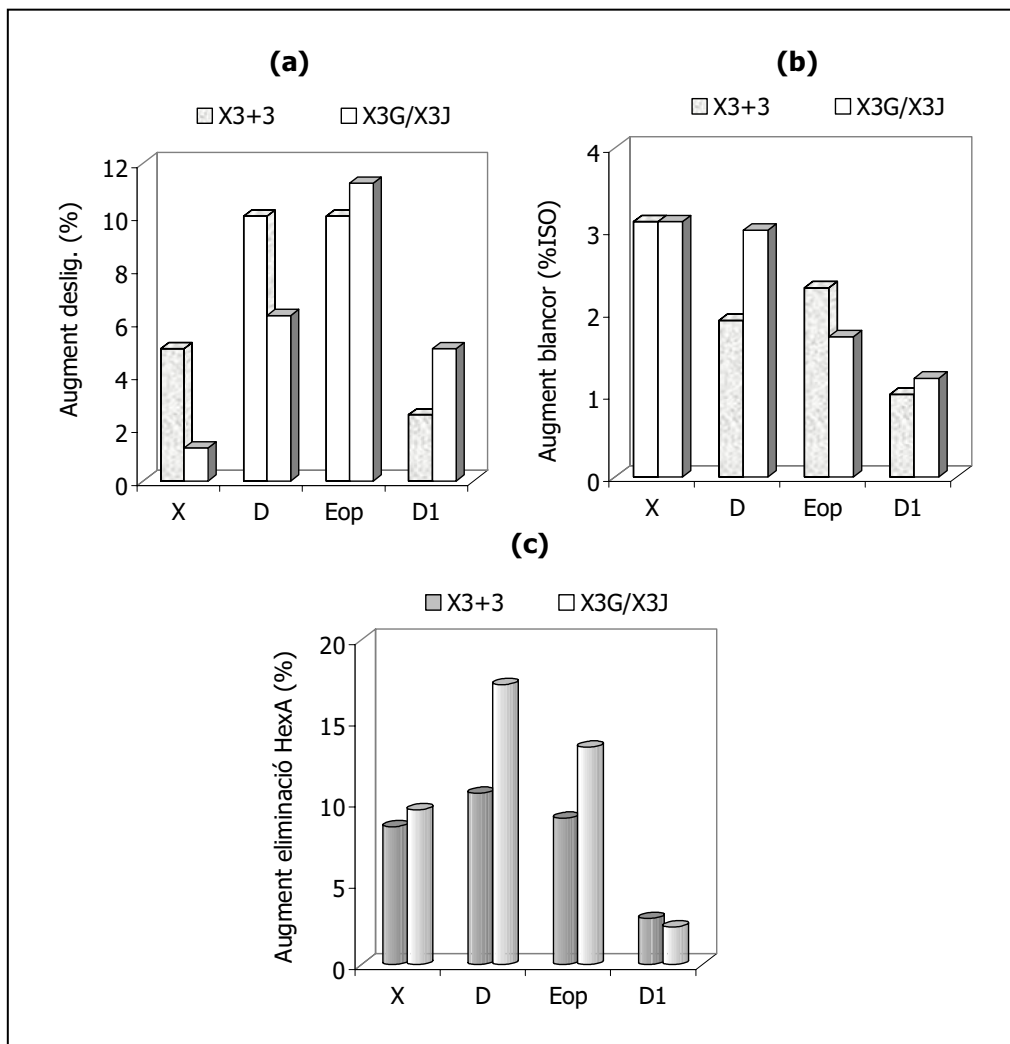


Figura 6-11. Estudi de l'efecte sinèrgic en augmentar la desdesignació (a) la blancor (b) i l'eliminació d'HexA (c)

De l'estudi de l'efecte sinèrgic es pot concloure d'una banda que les dues xilanases actuen a l'etapa X de la mateixa manera que aplicades individualment però deixen la fibra de tal manera que faciliten més la penetració del diòxid de clor en el primer estadi de blanqueig que actua alliberant més quantitat de productes.

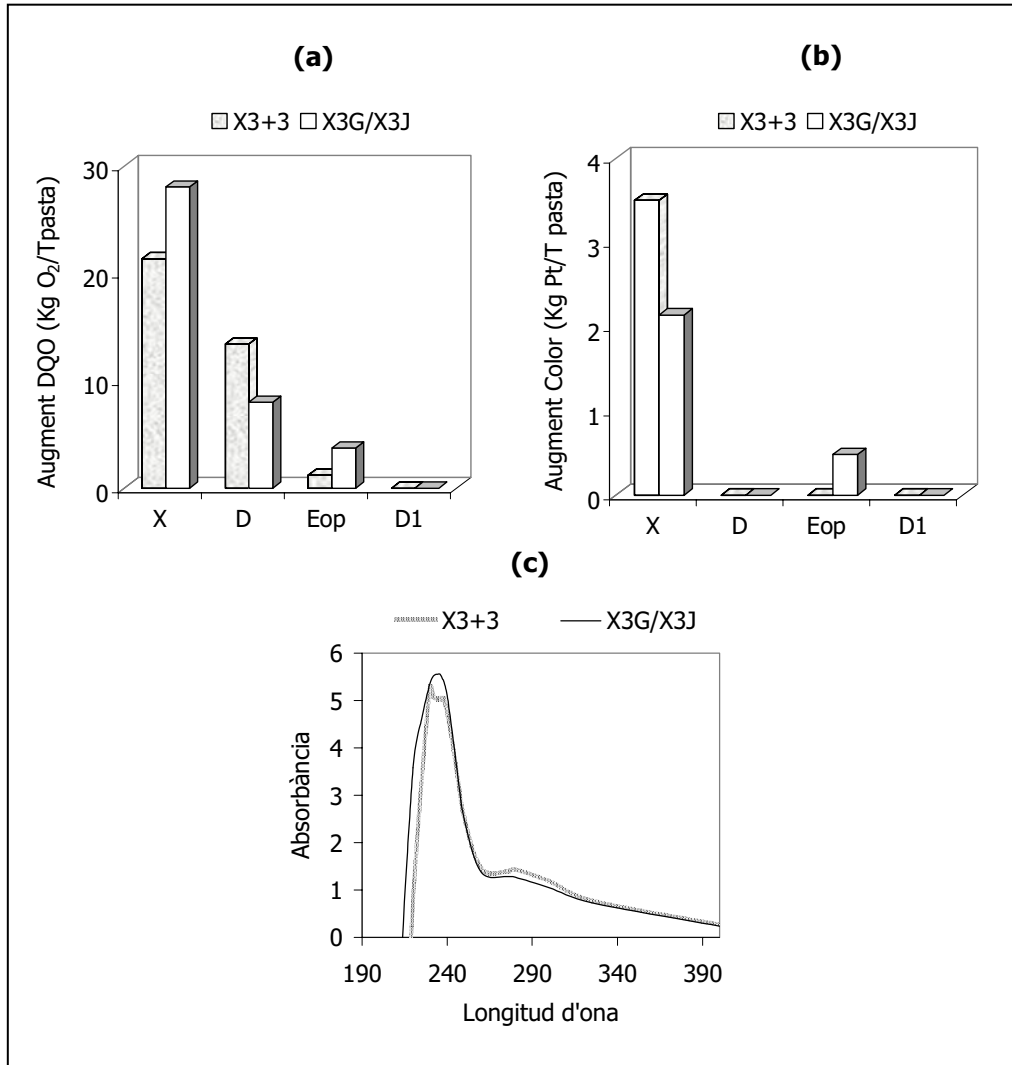


Figura 6-12. Estudi de l'efecte sinèrgic en augmentar les propietats dels efluents de DQO (a) color (b) i espectre d'absorbància de l'etapa X (c)

6.3.9 Efecte de les xilanases en la morfologia de les fibres

La microscopia electrònica d'escombrat (SEM) és un mètode que s'utilitza per tal d'observar els canvis a la superfície de la fibra que tenen lloc com a conseqüència de

l'aplicació de diferents tractaments de blanqueig, i sobretot per a poder interpretar l'efecte dels enzims en les fibres cel·lulòsiques.

El comportament de les pastes per a paper durant el procés de blanqueig, l'efecte de l'actuació de diferents agents de blanqueig i les propietats físiques desenvolupades per aquestes pastes, podrien estar relacionats amb l'estat de la superfície de la fibra, és a dir, amb la morfologia superficial de les fibres.

Amb la finalitat d'obtenir una major comprensió de l'efecte del tractament enzimàtic en la blanquejabilitat de les pastes, s'ha realitzat un estudi microscòpic mitjançant SEM de les 3 pastes finals blanquejades $X_0\text{DEopD}_1$, $X_{3G}\text{DEopD}_1$ i $X_{3J}\text{DEopD}_1$ tal com es mostra a la Figura 6-13. En aquesta figura s'observa que les fibres del tractament blanc ($X_0\text{DEopD}_1$) són bastant rectes i llises, mentre que en les seqüències amb pretractament enzimàtic amb xilanasa ($X_{3G}\text{DEopD}_1$ i $X_{3J}\text{DEopD}_1$) les fibres tenen una fibril·lació o fibril·les d'unió entre fibres fent que quedi en aquests tractaments una pasta final molt més fibril·lada, aquesta fibril·lació exterior serveix d'unió entre fibres; en el cas de l' X_{3G} s'hi pot observar a més, la presència de solcs o fenedures a les fibres els quals han estat produïts per l'efecte de la xilanasa eliminant els xilans que s'havien dipositat a la superfície de la fibra durant la cocció alcalina de la fusta. Per aquests solcs és per on els reactius de blanqueig han penetrat més eficaçment a l'interior de la fibra incrementant l'eliminació de lignina, àcids hexenurònics, xilans, etc... el què també justificaria els resultats obtinguts en les propietats de les pastes amb aquesta xilanasa. Efectes semblants en la morfologia de les fibres degut a l'efecte del pretractament amb xilanasa s'han observat per Roncero *et al.*, (2000 i 2005) i per Torres *et al.*, (2000).

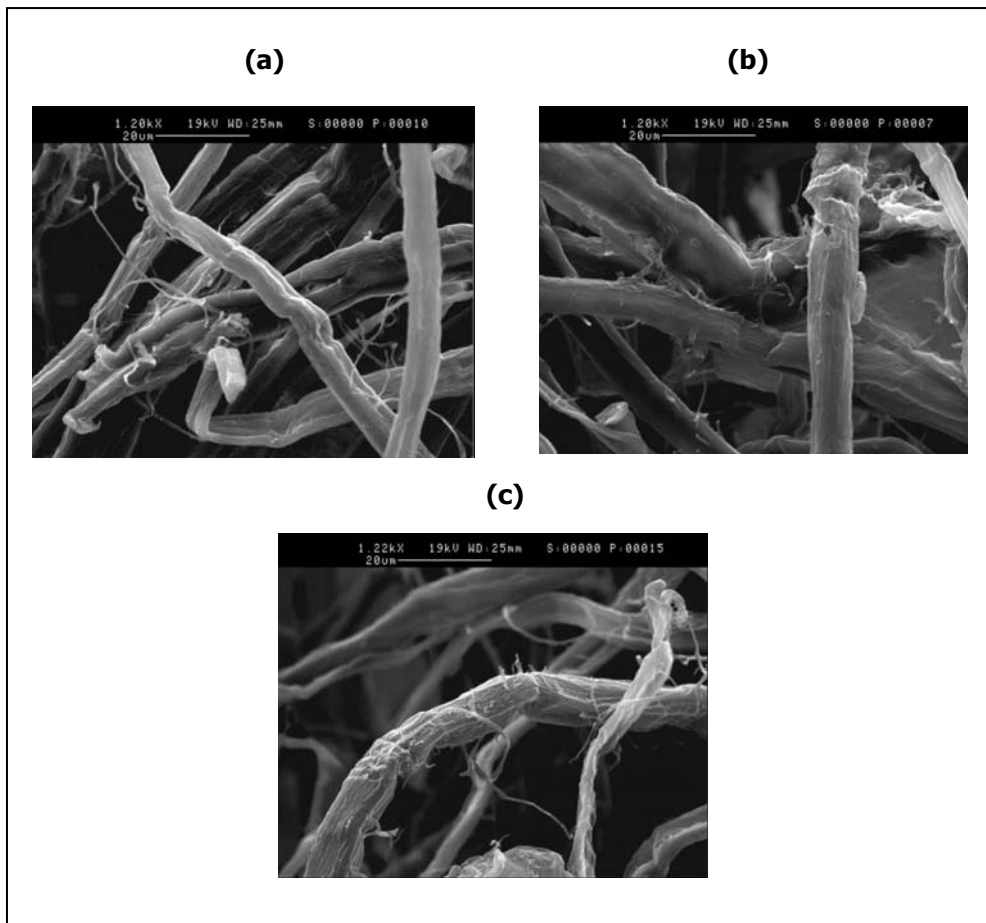


Figura 6-13. Fotografies de microscopia SEM de pasta kraft d'eucaliptus blanquejada segons les seqüències X_0DEopD_1 (a), $X_{36}DEopD_1$ (b) i $X_{33}DEopD_1$ (c)

6.3.10 Efecte de les xilanases en el refí i propietats físiques dels papers

La pasta tractada segons la seqüència del blanc (X_0DEopD_1) i les pastes tractades segons les seqüències $X_{36}DEopD_1$ i $X_{33}DEopD_1$ es refinen i se'n mesuren les propietats físiques dels papers. Els resultats de les diferents propietats físiques es mostren a la Taula 6-9. Segons els resultats de la taula, es pot dir que els pretractaments amb xilanasa realitzats no afecten al refí ni deterioren les propietats físiques finals dels papers.

Taula 6-9. Propietats físiques de les seqüències X₀DEopD₁, X_{3G}DEopD₁ i X_{3J}DEopD₁ refinades a diferents revolucions

	Rev.	°SR	IRA (%)	Consum específic (KWh)	Gramatge (g/m ²)	Espessor (µm)
X ₀	0	17	111	0	78,2	155
	5500	33	161	118	79,6	108
	6500	41	166	101	78,8	108
X _{3G}	0	16,5	102	0	79,8	159
	4500	27	149	156	77,4	116
	5500	30	163	148	79,1	113
	7500	39	275	113	78,3	105
X _{3J}	0	17	111	0	78,2	154
	5500	28	155	173	77,1	113
	7000	45	255	89	77,4	106
	Rev.	Volum específic (mL/g)	Permeabilitat Bendtsen (µm/Pa·s)	Índex de rebentament (KPa·m ² /g)	Índex d'estripada (mN·m ² /g)	Longitud de ruptura (Km)
X ₀	0	1,98	33,9	0,07	4,87	1,8
	5500	1,36	6,4	3,70	11,27	4,7
	6500	1,37	7,6	4,29	12,08	6,3
X _{3G}	0	1,99	33,9	0,11	4,54	1,1
	4500	1,49	15,6	2,85	10,02	5,4
	5500	1,42	10,7	3,71	10,65	6,1
	7500	1,33	3,8	4,45	10,42	6,6
X _{3J}	0	1,97	33,9	0,90	4,17	1,5
	5500	1,47	13,4	3,78	11,65	5,5
	7000	1,36	4,3	4,17	10,37	7,0

6.4 CONCLUSIONS

En aquest capítol s'avalua l'efecte de dues xilanases bacterianes noves, una de la família 11 i l'altra de la família 5 aplicades individualment i conjuntament en la seqüència completa de blanqueig XDEopD₁. Els efectes de les xilanases en les propietats de les pastes i dels efluents es comparen amb la seqüència del blanc X₀DEopD₁ i amb la seqüència DEopD₁. Els resultats demostren que les dues xilanases milloren les propietats de les pastes i afecten als efluents al llarg de la seqüència de

blanqueig tot i que l'efecte és sempre superior en la xilanasa de la família 11 i augmenta quan són aplicades conjuntament.

Les dues xilanases potencien tant la deslignificació com el blanqueig de la pasta kraft d'eucaliptus al llarg de la seqüència de blanqueig sense quedar afectada la viscositat de les pastes i a més contribueixen en l'eliminació d'àcids hexenurònics. També augmenten els xilans dissolts visibles en cromatografia en capa fina dels efluent de les etapes X i D així com l'absorbància de l'etapa X i la DQO i Color acumulats al llarg de la seqüència, tot i que l'augment en aquests últims es produeix majoritàriament a la mateixa etapa enzimàtica. Les dues xilanases produeixen canvis en la morfologia de les fibres visibles per SEM i no deterioren les propietats físiques finals dels papers. Quan les dues xilanases són aplicades conjuntament els efectes són superiors que els produïts quan són aplicades individualment, per aquest motiu s'estudia la possibilitat d'un efecte sinèrgic entre les dues. S'observa un efecte sinèrgic entre les dues xilanases després de la primera etapa de diòxid de clor ja que aquest penetra millor a l'interior de les fibres alliberant més quantitat de productes.

S'estudia la influència dels HexA en l'índex kappa de les pastes al llarg de la seqüència de blanqueig la qual varia en funció de cada etapa. En les pastes inicials els HexA influencien en un 40% en l'Ík però la influència augmenta a l'etapa Eop ja que en aquesta etapa no s'eliminen HexA. Després de l'etapa D₁ disminueix la influència en els HexA i al final de la seqüència els HexA influencien en un 20% en l'índex kappa.

Per últim, es demostra que la xilanasa de la família 5 potencia tant la deslignificació i el blanqueig, així com l'eliminació d'HexA al llarg de la seqüència de blanqueig i produeix canvis en la morfologia de les fibres. A més, és capaç d'actuar sinèrgicament aplicada amb una altra xilanasa.

6.5 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):448-453.
- 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(4):310-316.
- Bikova, T. i Treimanis, A. (2004) UV-absorbance of oxidized xylan and monocarboxyl cellulose in alkaline solutions. *Carbohydrate Polymers* 55(3):315-322.

- 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.
- Chai, X.S., Zhu, J.Y. i Li, J. (2001) A Simple and Rapid Method to Determine Hexenuronic Acid Groups in Chemical Pulps. *Journal of Pulp and Paper Science* 27(5):165-170.
- 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.
- Costa, M.M. i Colodette, J.L. (2007) The impact of kappa number composition on eucalyptus kraft pulp bleachability. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 24(1):61-71.
- 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* 45(7):2174-2178.
- de la Rosa, A. (2003) Utilización papelera de fibras no madereras (kenaf y *Miscanthus sinensis*). Estudio de secuencias de blanqueo ECF y TCF. Tesis 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.
- 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):954-959.
- Gallardo, O., Díaz, P. i Pastor, F.I.J. (2004) Cloning and characterisation of xylanase A from the strain *Bacillus* sp. BP-7: comparison with alkaline pI-low molecular weight xylanases of family 11. *Current Microbiology* 48:276-279.
- Gallardo, O. (2007) Caracterización de nuevas xilanasas bacterianas. Ingeniería de enzimas con la xilanasas B de *Paenibacillus barcinonensis*. Tesis Doctoral. Departament de Microbiologia. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Barcelona, Espanya.
- 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.

- Gellerstedt, G. i Li, J. (1996) An HPLC method for the quantitative determination of hexenuronic acid groups in chemical pulps. *Carbohydrate Research* 294:41-45.
- 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):84-91.
- 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 hexenuronic acid groups in pulp xylan. *Carbohydrate Research* 302:213-218.
- Li, J. i Gellerstedt, G. (1998) On the structural significance of the kappa number measurement. *Nordic Pulp & Paper Research Journal* 13:153-158.
- Li, J., Sevastyanova, O. i Gellerstedt, G. (2002 (a)) The relationship between kappa number and oxidizable structures in bleached kraft pulps. *Journal of Pulp and Paper Science* 28:262-266.
- Li, J., Sevastyanova, O. i Gellerstedt, G. (2002 (b)) The distribution of oxidizable structures in ECF-and TCF-bleached kraft pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 17:415-419.
- López, C., Blanco, A. i Pastor, F.I.J. (1998) Xylanase production by a new alkali-tolerant isolate of *Bacillus*. *Biotechnology Letters* 20:243-246.
- 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.
- Ragnar, M. (2005) Method for regulating the manufacturing of pulp by optically measuring the amount of hexenuronic acid. United States Patent. Patent No.: US 6,946,056 B2.
- 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* 36:45-50.
- Roncero, M.B. (2001) Obtención de una secuencia "TCF" con la aplicación de ozono y enzimas, para el blanqueo de pastas madereras y de origen agrícola. Optimización de la etapa Z. Análisis de los efectos en la fibra celulósica y sus componentes. Tesis doctoral. Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera. Escola Tècnica superior d'Enginyeria Industrial i Aeronàutica de Terrassa. Universitat Politècnica de Catalunya. Terrassa, Espanya. <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0325103-125233>.

- 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.
- Shatalov, A.A. i Pereira, H. (2004) 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):248-256.
- 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.
- Simao, J.P.F., Egas, A.P.V., Baptista, C.M.S.G., Carvalho, M.G. i Castro, J.A.A.M. (2005) Evolution of methylglucuronic and hexenuronic acid contents of eucalyptus globulus pulp during kraft delignification. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 44:2990-2996.
- Teleman, A., Harjunpaa, V., Tenkanen, M., Buchert, J., Hausalo, T., Drakenberg, T. i Vuorinen, T. (1995) Characterization of 4-Deoxy-Beta-L-Threo-Hex-4-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.
- Teleman, A., Hausalo, T., Tenkanen, M. i Vuorinen, T. (1996) Identification of the acidic degradation products of hexenuronic acid and characterisation of hexenuronic acid-substituted xylooligosaccharides by NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 280(2):197-208.
- Torngren, A. i Gellerstedt, G. (1997) Nature of organic bound chlorine from ECF-bleaching found in kraft pulp. *Proceedings of the 9th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry (Montreal, Canada)* 1:2.
- 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.
- 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.
- 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 (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.