

Capítol 15

Discussió general

RESUM

En aquest capítol es realitza una discussió general dels resultats obtinguts al llarg de la tesi. Primerament es posa de manifest l'interès que representa l'estudi de tractaments enzimàtics per a millorar el blanqueig de pastes kraft d'eucaliptus. Seguidament es resumeixen tant els efectes que els pretractaments enzimàtics amb les diferents xilanases han produït a les seqüències de blanqueig com les diferents accions que s'han dut a terme per tal de convertir el sistema lacasa-mediador més factible industrialment. Paral·lelament s'estudia com els àcids hexenurònics són afectats pels diferents tractaments.

15.1 INTRODUCCIÓ

L'objectiu principal de la tesi és **millorar el blanqueig de la pasta kraft d'eucaliptus mitjançant el desenvolupament de noves seqüències ECF i TCF amb diferents enzims com xilanases i lacases que augmentin la rendibilitat i efectivitat del procés.**

A trets generals, la present tesi es basa principalment en tres aspectes:

- 1) Estudi de noves xilanases per a ser aplicades en el blanqueig ECF de la pasta d'eucaliptus
- 2) Millorar les condicions d'aplicació del sistema lacasa-mediador
- 3) Evolució dels àcids hexenurònics (HexA) al llarg dels diferents tractaments enzimàtics i al llarg de les seqüències de blanqueig

En aquest capítol primerament es planteja l'interès d'estudiar noves seqüències de blanqueig per tal de blanquejar la pasta kraft d'eucaliptus. Seguidament es recopilen tots els resultats obtinguts al llarg dels diferents capítols de la tesi al mateix temps que es fa una discussió general dels mateixos: *i)* es resumeixen els diferents efectes que les xilanases han produït sobre les pastes i efluents; *ii)* s'exposa la problemàtica que

representa l'aplicació industrial del sistema lacasa-mediador, indicant les diferents accions que s'han dut a terme al llarg de la tesi per a fer-lo més factible industrialment; *iii*) paral·lelament s'analitza com els diferents tractaments afecten als àcids hexenurònics de les pastes. Simultàniament es plantegen diferents qüestions d'especial interès i es mostren alguns resultats nous sobre les pastes que han resultat interessants de realitzar al finalitzar la redacció dels capítols anteriors.

15.1.1 Pasta d'eucaliptus

La pasta d'eucaliptus és de **gran interès estratègic per Espanya** a la Unió Europea, ja que és de ràpid creixement i elevada productivitat, i la seva fusta és d'alta qualitat el què li confereix unes propietats especials al producte final. D'altra banda, se sap que extenses masses forestals com les d'eucaliptus de Galícia contribueixen significativament a la fixació de CO₂, reduint per tant les emissions globals de CO₂ a l'atmosfera i contribuint així a la disminució de l'efecte hivernacle.

La **pasta kraft d'eucaliptus blanquejada té una molt bona posició al mercat mundial** de pastes ja que pot donar paper d'escriptura i impressió d'alta qualitat degut a les seves propietats particulars. En aquesta tesi **es vol potenciar la utilització d'eucaliptus com a matèria prima fustera**, millorant les seqüències de blanqueig industrial actual (que solen ser amb diòxid de clor) **mitjançant tractaments enzimàtics**, amb la finalitat d'obtenir papers de característiques similars als convencionals disminuint els efluent residuals i el nivell contaminant en el blanqueig.

També cal destacar, que la pasta d'eucaliptus igual que totes les frondoses, es caracteritza per **tenir gran quantitat de xilans els quals formen part de les hemicel·luloses presents a les fibres cel·lulòsiques** (Roncero *et al.*, 2005). Els xilans són heteropolisacàrids complexos que comprenen β -1,4-unions d'unitat de D-xilopiranososa que són altament substituïts. Durant la cocció alcalina de la fusta, cadenes curtes de xilans precipiten en una forma més o menys cristal·lina a la superfície de les fibres de cel·lulosa, provocant una disminució de l'accessibilitat de la paret de la fibra; i també durant la cocció kraft, l'àcid **metilglucurònic present en els xilans es converteix en el seu corresponent insaturat àcid hexenurònic o HexA** (àcid 4-deoxy- β -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic) (Shatalov i Pereira, 2004) per la pèrdua del metanol.

Per últim, s'ha d'indicar que la pasta utilitzada al llarg de la tesi és pasta kraft d'***Eucalyptus globulus* deslignificada amb oxigen** subministrada per Torraspapel S.A. (Saragossa, Espanya) tot i que als capítols de l'11 al 13 també s'utilitza pasta crua

produïda per l'empresa "Grupo Empresario ENCE" (Pontevedra, Espanya). Els primers assajos (capítols 3, 4 i part del 5) on s'analitzen diferents xilanases es realitzen directament sobre la pasta d'eucaliptus deslignificada amb oxigen que prové directament de fàbrica. Per analitzar l'efecte de les xilanases en aquests capítols, es realitza la cromatografia en capa fina dels efluent després de la mateixa etapa enzimàtica ja que la presència de xilans dissolts és indicativa de l'actuació d'una xilanasa. En aquests capítols, s'observa que també apareixen xilans dissolts a les pastes on s'ha realitzat un tractament en blanc (el tractament del blanc consisteix en realitzar l'etapa X a les mateixes condicions que un tractament amb xilanasa però sense afegir-hi l'enzim). Aquests xilans havien quedat a la pasta després de la deslignificació amb oxigen que s'ha realitzat a fàbrica i s'han dissolt a les condicions del tractament. Degut a que això dificulta la interpretació dels efectes que es produeixen per les xilanases es decideix realitzar un rentat de la pasta amb tampó Tris-HCl a pH 7 i a temperatura ambient durant 30 minuts. Després d'aquest rentat, quan es realitza el tractament del blanc en aquesta pasta rentada, ja no apareixen xilans dissolts visibles per cromatografia en capa fina i es veuen més clarament els efectes de les xilanases. Després del rentat varien les propietats inicials de la pasta ja que disminueix l'Ik, augmenta la blancor i disminueixen els HexA. Al capítol 5 s'ha vist que el tipus de pasta (rentada o no rentada) també afecta lleugerament als efectes produïts per una xilanasa.

15.1.2 Blanqueig de pastes

L'aparició en els últims anys de **noves legislacions reguladores dels processos contaminants** és conseqüència de la nova conscienciació ecològica i mediambiental de la societat. Aquesta preocupació mediambiental recolzada per les noves lleis està pressionant a les indústries que es veuen forçades a realitzar canvis, adaptacions i/o millores dels seus processos, amb la finalitat d'aconseguir processos més respectuosos amb el medi ambient, amb un menor impacte en el medi; és a dir, processos de producció sostenible. En concret la indústria paperera ha estat moltes vegades motiu de controvèrsies i ha aparegut com l'objectiu de moltes accions ecologistes. Aquesta pressió exercida tant per a la societat com per les noves legislacions mediambientals també ha suposat canvis importants en tal sector. Respecte a les innovacions realitzades per a la indústria paperera, **la planta de blanqueig de pasta ha estat la que més modificacions ha dut a terme**, ja que de fet és la secció del procés d'obtenció de pasta i paper **que major contaminació provoca**. La necessitat de disminuir o eliminar la formació de compostos organoclorats, d'elevada toxicitat, durant els processos de blanqueig ha conduït a l'aparició de nous productes en el mercat tals com les pastes **ECF** (Elemental Chlorine Free) i les pastes **TCF** (Totally Chlorine Free).

La utilització de la **biotecnologia en el blanqueig de pasta de paper ha suscitat una gran atenció, aconseguint-se en els últims anys resultats de gran interès**. L'ús d'enzims com les **xilanases** determina una molt important millora tecnològica degut a que el seu ús potencia l'efecte blanquejant dels agents químics, permetent un important estalvi dels mateixos i, més important, disminuint notablement la generació de contaminants en el procés de blanqueig (Roncero *et al.*, 2005; Amin, 2006). D'altra banda, la utilització de lacases a través del **sistema lacasa-mediador** constitueix una nova generació d'enzims diferent a les xilanases ja que aquest actua directament sobre la lignina de la pasta. El sistema lacasa-mediador permet desenvolupar seqüències de blanqueig TCF, substituir l'etapa de deslignificació amb oxigen o la d'ozó, estalviar reactius, blanquejar la pasta i reduir l'índex kappa (Bajpai *et al.*, 1999).

15.2 APLICACIÓ DE XILANASES EN EL BLANQUEIG DE PASTA D'EUCALIPTUS

Durant la cocció alcalina de la fusta, cadenes curtes de xilans precipiten en una forma més o menys cristal·lina a la superfície de les fibres de cel·lulosa, provocant una disminució de l'accessibilitat de la paret de la fibra. La xilanasa és un enzim hidrolític que catalitza la degradació dels xilans. El mecanisme exacte de l'acció de la xilanasa durant el blanqueig de la pasta kraft no està encara ben establert i varies teories sobre la seva acció han estat proposades, però l'efecte general és que l'eliminació d'aquests xilans facilita la penetració de reactius en posteriors etapes de blanqueig (Paice *et al.*, 1992; Kantelinen *et al.*, 1993; Suurnakki *et al.*, 1997; Roncero *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2000). Un tema important relacionat en l'ús de xilanases per a l'indústria paperera, és saber si tots els tipus d'enzims tenen la capacitat de funcionar com a potenciadors del blanqueig, o bé si aquesta propietat és restringida només a un petit nombre de xilanases.

Per tal de **desenvolupar nous enzims amb activitat potenciadora del blanqueig** de les pastes d'eucaliptus, en aquesta tesi s'assagen diferents xilanases noves bacterianes per tal d'aconseguir identificar les més efectives en millorar les propietats finals del paper, permetent un major estalvi en blanquejants químics. Paral·lelament s'avaluen dues xilanases industrials subministrades per Buckmann Laboratories Ibérica S.A.

15.2.1 Seqüència de blanqueig per al primer escrutini de xilanases

En un primer assaig d'anàlisi de xilanases, (capítol 3) s'avalua també quina etapa posterior al tractament amb xilanasa (X) és més selectiva entre realitzar una etapa posterior àcida amb diòxid de clor (D) o bé realitzar una etapa alcalina amb peròxid d'hidrogen (P). Al comparar les seqüències XD i XP, 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 designificació que l'etapa P. També es determina que a igualtat d'OXE (equivalents d'oxidació), en una etapa D s'elimina lignina i s'augmenta blancor, mentre que en una etapa P s'augmenta blancor però s'elimina poca lignina. Per tant, **es decideix en posteriors assaigs d'anàlisi d'actuació de xilanases utilitzar la seqüència XD.**

15.2.1.1 Efecte dels blancs

L'extracte cel·lular (d'*E.coli* en el nostre cas) en el qual es subministren les xilanases podria interferir en els resultats de les propietats de les pastes i efluents, per aquest motiu al capítol 3 es realitza un blanc amb aquest extracte i es demostra que aquest **no afecta a les propietats de la pasta**. Així, en els posteriors estudis realitzats no s'ha realitzat el blanc amb extracte d'*E.coli*.

Tant al capítol 4 com al capítol 6 s'ha determinat que els tractaments que corresponen a la seqüència dels blancs (X₀DEopD₁) produeixen efectes tant en les propietats de les pastes com dels efluents, la qual cosa fa que sigui necessari sempre comparar els efectes que produeixen les xilanases amb la seqüència del blanc. A més, es determina que el tampó utilitzat per a realitzar l'etapa de pretractament X (fosfat o Tris-HCl) aporta molta DQO als efluents.

15.2.2 Avaluació de xilanases comercials

Al Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona s'han desenvolupat les condicions d'aplicació de les xilanases X_B (Buzyme 2511) i X_C (Buzyme 2514), que resulten ser de gran efectivitat pel blanqueig de les pastes d'eucaliptus. Al capítol 3 s'avaluen aquestes dues xilanases en seqüències XD i XP a dosi d'1 U/gps on es determina que l'X_C és la més efectiva de les dues tant en la millora de les propietats de les pastes d'Ík i blancor com en l'eliminació de xilans visibles per cromatografia en capa fina dels efluents de l'etapa X. Per aquest motiu al capítol 4 es realitza una seqüència completa de blanqueig (XDEopD₁) amb aquesta xilanasa X_C.

- **xilanasa comercial X_B**

Aquesta xilanasa produeix efectes en les propietats de les pastes a l'etapa X els quals estan relacionats amb l'eliminació de xilans observats per cromatografia en capa fina i a més potencia l'efecte de les etapes D i P en augmentar la blancor.

- **xilanasa comercial X_C**

Aquesta xilanasa resulta ser **la xilanasa més efectiva de les dues xilanases comercials** assajades tant en deslignificar com en blanquejar la pasta. Quan aquesta xilanasa és aplicada en una seqüència de blanqueig XDEopD₁ (a dosi d'1 i 2 U/gps) es determina que el pretractament X potencia la deslignificació i l'augment de blancor en les següents etapes D i Eop. També s'observa que durant el tractament X augmenta la DQO i el color dels efluent. Les propietats de les pastes i efluent demostren que els efectes d'aquesta xilanasa són més intensos a dosi de 2 U/gps.

15.2.3 Avaluació de noves xilanases

Al Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona es disposa de dues soques bacterianes amb alt poder xilanolític. A mesura que aquestes van sent identificades i caracteritzades es subministren als laboratoris de l'Especialitat Paperera de l'UPC per a ser analitzades. Són quatre les xilanases que han estat aplicades sobre les pastes d'eucaliptus per avaluar-ne la seva efectivitat al llarg de la tesi. Dues d'elles són de la família 10 de les glicosil hidrolases, una de la família 11 i una de la família 5. L'efectivitat de les xilanases de la família 10 i 11 ha estat ja demostrada (Elegir *et al.*, 1995; Biely *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 1997; Kolenová *et al.*, 2006) però no hi ha estudis publicats en el blanqueig de pastes utilitzant xilanases de la família 5. A continuació es fa un resum dels assajos que s'han realitzat sobre cadascuna i dels efectes que aquestes han produït en les diferents propietats de les pastes al llarg del blanqueig.

- **xilanasa X_A de *Paenibacillus* sp. BP-23**

Aquesta xilanasa és de la **família 10** de les glicosil hidrolases i defineix un nou tipus de xilanases que presenta com a tret distintiu la seva localització intracel·lular, fet que la diferencia clarament de la resta de xilanases descrites fins el moment, que són secretades a l'exterior del microorganisme productora. La seva elevada activitat sobre aril xilòsids i xilooligosacàrids la converteixen en un candidat ideal per a la modificació de les propietats de les pastes d'eucaliptus. S'ha obtingut un mutant termoresistent i la

seva augmentada estabilitat tèrmica facilita la seva aplicació industrial (Blanco *et al.*, 1996; Gallardo *et al.*, 2003 i 2007; Sánchez *et al.*, 2005).

Aquesta xilanasa s'ha avaluat al capítol 3 sobre la pasta no rentada i a dosi d'1 U/gps en seqüències **XD** i **XP** i al capítol 5 sobre la pasta rentada a dosi de 2 U/gps en la seqüència **XDP**. Els efectes en les propietats de les pastes amb aquesta xilanasa són gairebé insignificatius tot i que al capítol 3 s'observa un lleuger augment en la deslignificació després de l'etapa X i al capítol 5 un lleuger augment en la blancor després de l'etapa D.

La localització intracel·lular d'aquesta xilanasa en el bacteri porta a pensar que la seva funció natural sigui hidrolitzar porcions petites del polímer de xilà que han entrat dins el bacteri i no actuar sobre el polímer de xilà directament, per tant el resultat obtingut és coherent. De tota manera, no es pot dir que aquesta xilanasa no ha actuat ja que sí que **produeix efecte en la dissolució de xilans analitzats per cromatografia en capa fina i en eliminar els HexA**: al capítol 3 s'ha observat un lleuger augment en la dissolució de xilans per cromatografia en capa fina als efluent de l'etapa X (Figura 3-2) i al capítol 5 s'hi ha observat la presència de la xilotetraosa; també s'ha determinat que fa augmentar l'absorbància dels efluent a les longituds d'ona de 280, 237 i 205 nm, a més després de l'etapa X disminueix lleugerament els HexA, i després de l'etapa D augmenta fins el 10% l'eliminació d'aquests àcids.

- **Xilanasa X_G de *Bacillus* sp. BP-7**

Les xilanasas secretades per *Bacillus* sp. BP-7 (López *et al.*, 1998) tallen el xilà en xilobiosa o xilooligosacàrids més grans i no alliberen xilosa, tampoc presenten activitat β -xilosidasa. La xilanasa X_G ha estat clonada i caracteritzada per Gallardo *et al.*, 2004 la qual presenta alta activitat front els xilans de frondoses i pertany a la **família 11** de les xilanasas.

Aquesta xilanasa s'ha aplicat en una seqüència XDP sobre la pasta no rentada i sobre la pasta rentada d'eucaliptus a dosi de 2 U/gps els resultats dels quals es discuteixen al capítol 5. En aquest capítol es conclou que **és la més efectiva de les quatre xilanasas noves utilitzades** i per aquest motiu s'aplica en una seqüència completa ECF de blanqueig XDEopD₁ a dosi de 3 U/gps els resultats dels quals es discuteixen al capítol 6, en aquest mateix capítol s'aplica aquesta xilanasa combinada amb la xilanasa X_J. La xilanasa X_G també és aplicada en una seqüència TCF per tal de veure si és capaç de potenciar l'efecte del sistema lacasa-mediador en una seqüència XLE, els resultats dels quals s'analitzen i discuteixen als capítols 7, 8 i 9.

Al capítol 5 s'observa que al aplicar aquesta xilanasa en una seqüència **XDP**, augmenta la deslignificació al llarg de les etapes X, D i P. Paral·lelament augmenta la blancor després de l'etapa X i després de l'etapa P, tot i que aquest últim efecte depèn de si la pasta ha estat o no rentada. Aquesta xilanasa també incrementa l'eliminació d'HexA de les pastes després de les etapes X i D, l'efecte del qual també depèn de la pasta utilitzada.

La cromatografia en capa fina dels efluent de l'etapa X revela que l' X_G **és la xilanasa que més efecte ha produït en hidrolitzar el polímer de xilà**. Quan és aplicada sobre la pasta no rentada augmenta considerablement la quantitat de xilà dissolt pel diòxid de clor, l'augment en la dissolució del xilà després de l'etapa D coincideix amb una gran disminució dels HexA després d'aquesta etapa. Aquest fet indica que els xilans que ha dissolt el diòxid de clor contenen els HexA. Per últim, l'espectre UV dels efluent de l'etapa X també revela que aquesta xilanasa és la més eficient en alliberar productes que absorbeixen a 280, 237 i 205 nm.

Quan aquesta xilanasa s'aplica a la seqüència completa de blanqueig **XDEopD₁**, augmenta la blancor a l'etapa X, i potencia la deslignificació i blanqueig al llarg de les etapes D, Eop i D₁. De la mateixa manera, també **augmenta l'eliminació d'HexA al llarg de l'etapa X i de les següents etapes de blanqueig, el que està relacionat amb l'augment en la dissolució del polímer de xilà** presents als efluent de les etapes X i D. D'altra banda, augmenta la DQO i el color acumulats dels efluent, degut principalment a la mateixa etapa enzimàtica.

- **Xilanasa X_J de *Bacillus* sp. BP-7**

Es disposa d'una xilanasa de la **família 5** de les glicosil hidrolases, aquest fet confereix gran interès científic i tecnològic a l'enzim degut a que només recentment han estat descrites xilanasos d'aquesta família (Collins *et al.*, 2005; Gallardo, 2007). A més, **no existeix fins el moment cap assaig paperer amb xilanasos d'aquesta família enzimàtica, fet que dóna gran rellevància als estudis d'aplicació en el blanqueig amb aquest enzim**.

S'ha avaluat l'efecte d'aquesta xilanasa en seqüències ECF, al capítol 5 en una seqüència XDP a dosi de 2 U/gps i al capítol 6 en una seqüència completa XDEopD₁ a dosi de 3 U/gps, i combinada amb la xilanasa X_G . Quan és aplicada a la seqüència **XDP**, augmenta la blancor després de l'etapa X i després de l'etapa P disminueix l'Ik i augmenta el grau de blanc, després de l'etapa D disminueix lleugerament el contingut en HexA de la pasta. Quan és aplicada a la seqüència **XDEopD₁**, produeix un lleuger

efecte en disminuir l'Ik, en augmentar la blancor i en disminuir el contingut en HexA al llarg de la seqüència.

Quan al capítol 6 es realitza la cromatografia en capa fina dels efluent de l'etapa X, s'observa que aquesta xilanasa ha actuat sobre la pasta provocant la **hidròlisi del polímer de xilà donant lloc a uns productes de més alt pes molecular que la xilotetraosa** (Figura 6-6) i l'espectre d'UV dels efluent d'aquesta etapa indica que augmenta la quantitat de productes que absorbeixen al voltant de les longituds d'ona de 280 i 240 nm. També augmenta lleugerament la DQO i color acumulats dels efluent.

- **Xilanasa X_k de *Paenibacillus* sp. BP-7**

Aquesta xilanasa ha estat caracteritzada per Blanco *et al.*, (1999), i obtenen que els productes de la hidròlisi del polímer de xilà per aquesta xilanasa són la xilotetraosa, la xilotriosa, la xilobiosa, i la xilosa i té major activitat front els oligosacàrids de més alta longitud, el que indica que és una endoxilanasa, i pertany a la **família 10** de les glicosil hidrolases. Aquesta xilanasa s'ha aplicat a la pasta d'eucaliptus en una seqüència **XDP** a 2 U/gps i els resultats es discuteixen al capítol 5. No produeix cap efecte ni en augmentar la deslignificació ni en augmentar la blancor de les pastes al llarg de la seqüència, però sí que **disminueix el contingut en HexA** de les pastes al llarg de les etapes X i D, sobretot després de l'etapa X. La cromatografia en capa fina dels efluent de les etapes X i D, també corrobora que aquesta xilanasa **ha actuat provocant la hidròlisi del polímer de xilà a l'etapa X** i augmentant la dissolució de xilans durant l'etapa amb diòxid de clor. L'espectre d'UV dels efluent de l'etapa X, indica que durant aquesta etapa s'eliminen productes de les pastes que absorbeixen a les longituds d'ona al voltant de 280, 237 i 205 nm.

15.2.4 Són comparables les xilanasas noves amb les comercials?

Entre els capítols del 3 al 6, s'escull la millor xilanasa comercial la qual resulta ser l'X_C i la millor xilanasa nova (X_G). Al capítol 4 es realitza una seqüència complerta ECF de blanqueig aplicant la xilanasa X_C a 2 unitats/gps (X_{2C}DEopD₁) i al capítol 6 es realitza la mateixa seqüència complerta però amb la xilanasa nova X_G a dosi de 3 U/gps (X_{3G}DEopD₁). A continuació es comparen els efectes que han produït les dues xilanasas al llarg de la seqüència de blanqueig tant en les propietats de les pastes com dels efluent. Per a comparar les dues xilanasas es mesuren els efectes que produeix cada xilanasa respecte la seva seqüència del blanc corresponent (X₀DEopD₁).

A la Figura 15-1 es mostra representat gràficament l'augment en deslignificació i en blancor que les dues xilanases X_C i X_G han produït al llarg de la seqüència de blanqueig. Després de l'etapa **X**, la xilanasa comercial X_C augmenta la deslignificació però no augmenta la blancor en aquesta etapa mentre que amb la xilanasa nova X_G , després de l'etapa X s'augmenta la blancor però no es produeix augment en deslignificació. Aquesta diferència de comportament que s'observa després de la mateixa etapa enzimàtica pot ser degut a que **el tipus de xilans o compostos cromòfors que s'eliminen en aquesta són diferents segons la xilanasa utilitzada**.

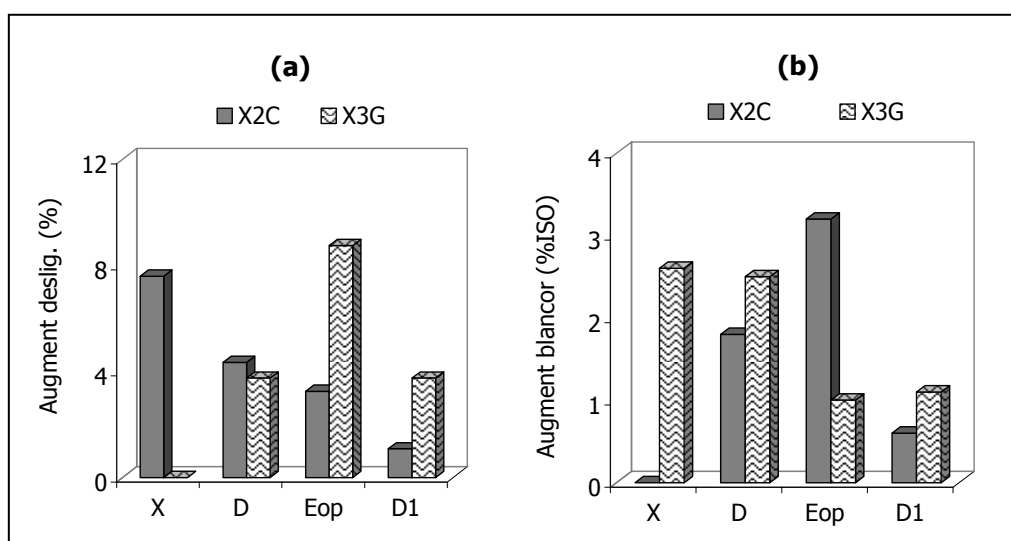


Figura 15-1. Augment en deslignificació (a) i en blancor (b) produït per la xilanasa comercial X_C i per la xilanasa nova X_G al llarg de la seqüència completa de blanqueig

La cromatografia en capa fina dels efluents d'aquestes etapes indica que les dues xilanases han produït la hidròlisi del polímer de xilà i els productes d'aquesta hidròlisi han passat als efluents. Les dues xilanases produeixen com a productes de la hidròlisi xilotriosa, xilotetraosa i d'altres de més alt pes molecular, i a més, en els efluents de la xilanasa X_C també hi apareix la xilobiosa (Figures 3-2 i 6-6). Aquest augment de xilans en els efluents és el major responsable de l'augment que s'ha produït en la DQO en aquesta etapa per les dues xilanases tal com queda reflectit a la Figura 15-2 (a), on també s'observa que la xilanasa X_G produeix un augment en la DQO lleugerament superior a l' X_C . En els efluents de l'etapa enzimàtica X també es produeix un augment de color per les dues xilanases que és més pronunciat amb la xilanasa X_C , el que està relacionat amb els resultats de deslignificació observats (Figura 15-2 (b)).

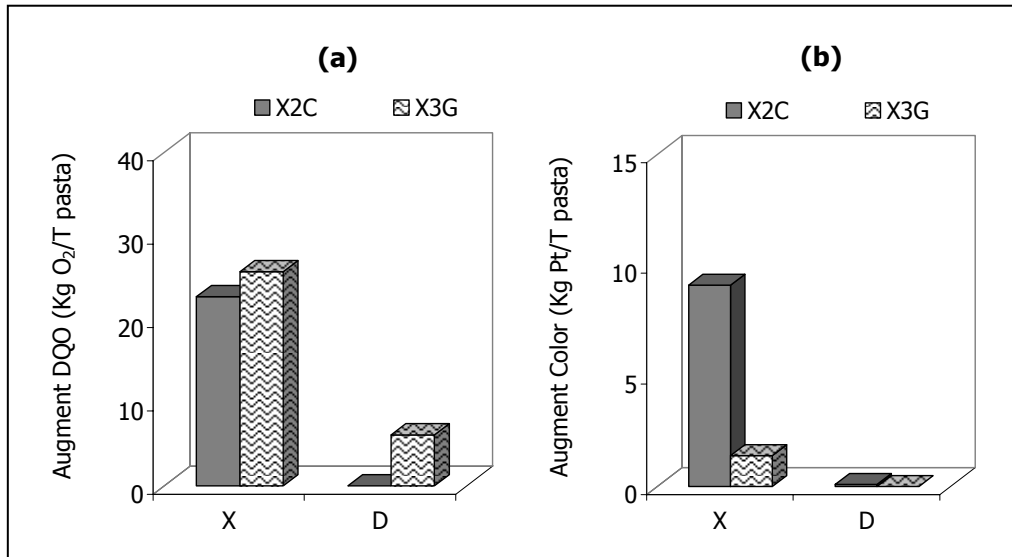


Figura 15-2. Augment en DQO (a) i en color (b) produït per la xilanasa comercial X_C i per la xilanasa nova X_G al llarg de les etapes X i D

Després de l'**etapa D**, les dues xilanases augmenten tant la deslignificació com la blancor de manera similar on l'efecte en augmentar la deslignificació és lleugerament superior per l' X_C mentre que l'efecte en augmentar la blancor és lleugerament superior per l' X_G (Figura 15-1 (a i b)); després d'aquesta etapa les xilanases no fan augmentar el color dels efluent (Figura 15-2 (b)), però la xilanasa X_G augmenta lleugerament la DQO (Figura 15-2 (a)) que és degut a l'augment de la dissolució de xilans com s'ha observat per cromatografia en capa fina al capítol 6 (Figura 6-7).

Després de l'**etapa Eop** l'efecte en augmentar la deslignificació és superior per la xilanasa nova X_G mentre que l'augment en blancor és superior en el tractament amb la xilanasa comercial X_C . Després de l'**etapa D₁**, disminueixen els efectes de les dues xilanases degut als baixos nivells d' I_k i a l'alt grau de blanc que s'assoleix degut a la mateixa seqüència, de tota manera, els efectes en augmentar la deslignificació i la blancor són lleugerament superiors al aplicar la xilanasa nova X_G .

Per tant, es pot dir que **la millor xilanasa nova obtinguda potencia el blanqueig de manera perfectament comparable amb la millor xilanasa comercial**. En treballs anteriors també s'obté un efecte positiu en disminuir l' I_k al aplicar una xilanasa nova (Torres *et al.*, 2000) i una comercial (Siles *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 1997; Madlala *et al.*, 2001) al llarg d'una seqüència ECF de blanqueig en pastes d'eucaliputs.

15.2.5 Com afecta la dosi d'enzim aplicada?

Als capítols del 3 al 6 on s'han avaluat les diferents xilanases, s'han aplicat diferents dosis d'enzim a l'etapa X. En un primer anàlisi (capítol 3) s'apliquen les xilanases a dosi d'1 U/gps per tal de veure si són efectives i es conclou que és necessari augmentar la dosi d'aplicació per a identificar millor els efectes de les xilanases. Seguidament es realitza un anàlisi de la dosi d'enzim variant entre 0,5 i 2 U/gps amb la xilanasa comercial X_C (capítol 4), en aquest es conclou que augmentar la dosi 0,5 U/gps no produeix més efectes sobre les pastes mentre que si que varia si s'augmenta la dosi 1 U/gps. Així, en aquest mateix capítol es realitza una seqüència completa de blanqueig XDEopD₁ aplicant 1 i 2 U/gps d'enzim; els resultats demostren que s'obtenen millors propietats a més dosi enzimàtica.

Així, al capítol 5 es realitza un anàlisi de quatre xilanases noves en una seqüència XDP aplicant 2 U/gps d'enzim i tot i que s'aprecien diferents efectes entre les xilanases, es decideix augmentar més la dosi enzimàtica per a poder identificar millor els efectes. Per aquest motiu, al capítol 6 s'apliquen les xilanases X_G i X_J a 3 U/gps en una seqüència XDEopD₁.

La xilanasa X_A s'ha aplicat a 1 U/gps sobre la pasta no rentada i a 2 U/gps sobre la pasta rentada però no ha produït efectes significatius en les propietats d'Ik i blancor en cap de les dues dosis assajades.

A continuació es comparen els efectes que les xilanases X_G i X_J han produït al ser aplicades entre 2 i 3 U/gps. La Figura 15-3 mostra l'efecte de la xilanasa X_G en disminuir l'Ik, en augmentar el blancor i en disminuir el contingut en HexA a les dues dosis assajades. En aquest cas les dues seqüències s'han realitzat sobre la pasta rentada. S'observa que tant l'augment de blancor (b) com la disminució dels HexA (c) és superior a major dosi (X_{3G}) al llarg de les diferents etapes. D'altra banda, la disminució en Ik (a) és superior a menor dosi (X_{2G}) durant les etapes X i D però és superior a major dosi després de les etapes P/Eop.

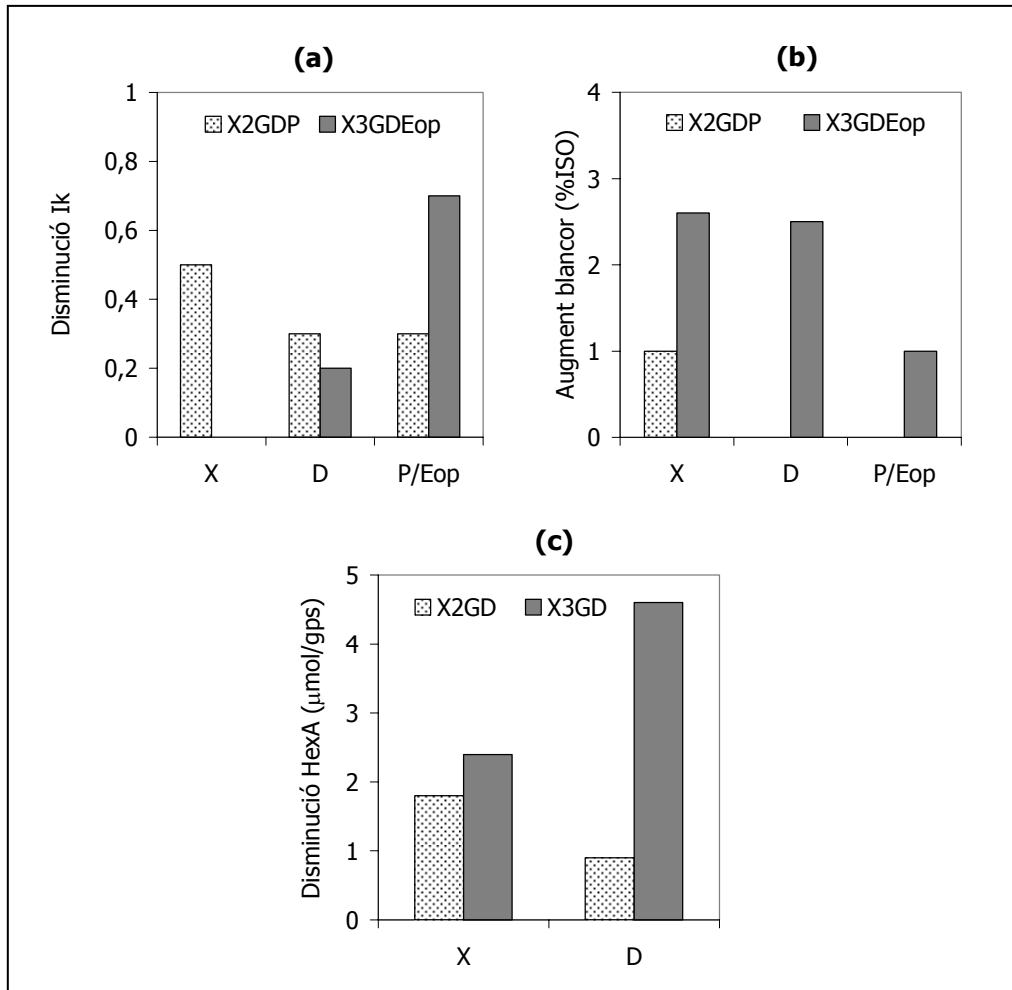


Figura 15-3. Efecte de la xilanasa X_6 a les dosis de 2 i 3 U/gps en la disminució de l'Ik (a), en augmentar la blancor (b) i en disminuir els HexA (c)

La Figura 15-4 mostra l'efecte de la xilanasa X_3 en disminuir l'Ik, en augmentar la blancor i en disminuir el contingut en HexA a les dues dosis assajades. Al llarg de les etapes X i D, tant la disminució de l'Ik (a) com la disminució dels HexA (b) és superior a major dosi (X_{3j}). D'altra banda, l'augment de blancor després de l'etapa X i de les etapes P/Eop és superior a menor dosi (X_{2j}); de la mateixa manera, la disminució en Ik després de les etapes P/Eop és superior a l' X_{2j} . De tota manera, s'ha de tenir en compte que el tractament X_{2j} s'ha realitzat sobre la pasta no rentada i el tractament X_{3j} sobre la pasta rentada, la qual cosa pot també influir en els resultats.

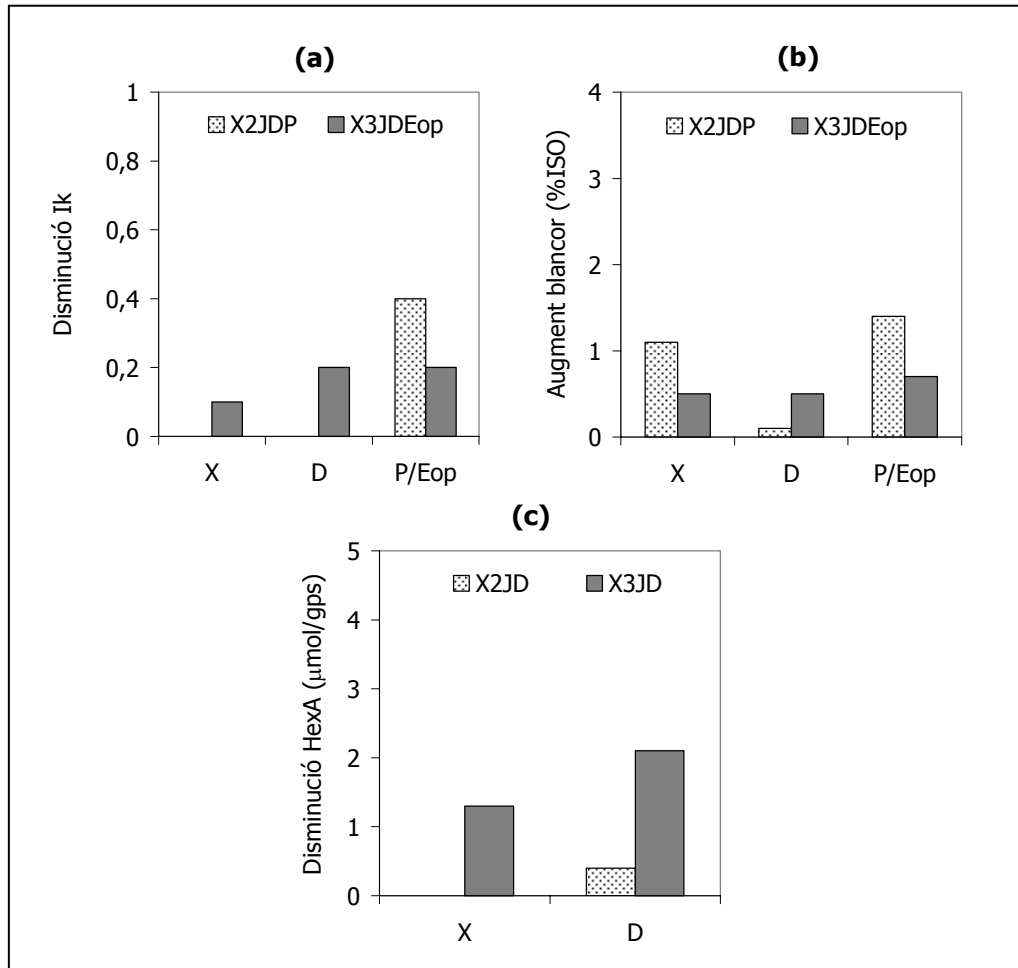


Figura 15-4. Efecte de la xilanasa X_j a les dosis de 2 i 3 U/gps en la disminució de l'Iκ (a), en augmentar la blancor (b) i en disminuir els HexA (c)

D'aquests resultats es pot concloure que en general, **augmentar la dosi enzimàtica potencia els efectes en les propietats de les pastes tant per la xilanasa X_G com per l' X_j .**

15.2.6 Existeix un efecte sinèrgic entre xilanases?

Al capítol 6 es discuteix la possibilitat que existeixi un efecte sinèrgic entre les xilanases X_G i X_j ja que les dues provenen del mateix bacteri. D'aquest estudi es conclou d'una banda que **les dues xilanases actuen quan són aplicades conjuntament** ja que els efectes són superiors que els produïts quan són aplicades individualment. D'altra banda **s'observa un efecte sinèrgic entre les dues, només**

després de la primera etapa amb diòxid de clor ja que aquest penetra millor a l'interior de les fibres alliberant més quantitat de productes.

15.2.7 Afecten les xilanases a la lignina de la pasta?

S'ha mesurat la relació entre les unitats de lignina Siringil/Guaiacil (S/G) de diferents pastes tractades amb xilanasa al llarg de la seqüència XDEopD₁. Aquest anàlisi s'ha realitzat a l'IRNA de Sevilla. A la Taula 15-1 es mostra el resultat S/G de la pasta tractada segons la seqüència control (X₀) i segons els tractaments X_{3G}, X_{3J} i X₃₊₃. A la taula també es mostra el resultat d'Ik d'aquestes pastes els quals s'han discutit al capítol 6. No es mostren els resultats de les etapes Eop i D₁ ja que en aquestes etapes no s'ha detectat lignina.

Taula 15-1. Ik i relació S/G de diferents pastes tractades amb xilanasa al llarg de les etapes X i D

	X		D	
	Ik	S/G	Ik	S/G
Inicial	8,0	3,2	-	-
X₀	7,9	3,3	3,5	1,6
X_{3G}	7,9	3,3	3,2	1,6
X_{3J}	7,8	3,4	3,3	1,6
X₃₊₃	7,5	3,4	2,7	1,8

Segons aquests resultats es pot dir que **el tractament enzimàtic X no afecta a l'estructura S/G de la lignina**. Per tant, **la disminució de l'Ik a les pastes pretractades amb xilanasa és degut principalment a la disminució dels HexA**.

15.2.8 Afecten les xilanases a la viscositat de les pastes?

Al llarg dels capítols del 3 al 6 també es mesuren els efectes que les xilanases provoquen en la viscositat de les pastes. La viscositat de les pastes no es veu afectada en cap dels casos el que indica que **les xilanases utilitzades són específiques de xilans** i no presenten activitat cel·lulasa. Aquest fet representa una característica interessant per una xilanasa ja que **no es veuran afectades les propietats finals dels papers**. Els resultats de cromatografia en capa fina dels efluents ho confirmen, ja que no apareixen en cap cas marques corresponents als productes de degradació de la cel·lulosa com la glucosa o la cel·lobiosa o altres oligosacàrids.

En algun cas s'observa que la viscositat és lleugerament superior al blanc, el que pot ser explicat per la pèrdua d'hemicel·luloses que són hidrats de carboni de cadena curta donant lloc a un valor mig de viscositat superior tal com també obtenen Roncero *et al.*, (1996); Siles *et al.*, (1996); Vidal *et al.*, (1997) i Torres *et al.*, (2000).

15.2.9 Quin efecte té el pretractament enzimàtic amb xilanasa sobre els efluents?

En principi, el pretractament amb xilanasa potencia l'efecte dels agents químics i permet un estalvi dels mateixos disminuint notablement la generació de contaminants durant el procés de blanqueig (Amin, 2006) com per exemple la disminució del nivell d'AOX als efluents degut a una disminució del diòxid de clor utilitzat (Aumont *et al.*, 1996). L'estudi de la influència dels diferents tractaments enzimàtics i dels diferents agents i seqüències de blanqueig en els efluents és de gran importància per a conèixer els factors determinants de la producció de vertits, i establir les estratègies necessàries per a minimitzar l'impacte ambiental dels processos de blanqueig. A més, la informació aconseguida a partir de l'anàlisi dels efluents contribuirà a l'elucidació de l'acció dels enzims en les hemicel·luloses i lignina residual, i en el desenvolupament de noves seqüències de blanqueig.

Per aquest motiu, durant els capítols del 3 al 6, s'han analitzat diferents propietats dels efluents així com l'efecte que el pretractament X els produeix. En tots ells s'ha determinat la cromatografia en capa fina dels efluents de l'etapa X. Aquest anàlisi és de gran utilitat per a determinar l'acció d'una xilanasa sobre la pasta en hidrolitzar el polímer de xilà. Un augment dels xilans dissolts visibles per cromatografia en capa fina és el resultat de hidròlisi del polímer de xilà de la pasta per part de la xilanasa. Així, s'ha vist que **diferents xilanases hidrolitzen de diferent manera el polímer de xilà, ja sigui en quantitat com en el tipus de xilooligòmers que apareixen**. En aquests capítols també s'ha observat que **l'alliberació de xilans visibles per cromatografia en capa fina va estretament lligat a l'efecte d'una xilanasa en potenciar la deslignificació i blanqueig**. D'altra banda, l'augment d'aquests xilans dissolts als efluents produeix diferents problemes ja que una pèrdua en el contingut en hemicel·luloses (xilans) de les pastes comporta una pèrdua de rendiment del procés, i a més, provoca un augment en la DQO en els efluents d'aquesta etapa. De tota manera, l'alliberació de xilans de les fibres també implica una reducció del contingut en HexA de les pastes amb els efectes positius que això comporta. Per exemple, Johanson i Germgard, (2006) comenten que és més important la concentració en HexA de les pastes que la quantitat de xilà que es perd.

La demanda química d'oxigen (DQO) i el color dels efluent s'han mesurat al capítol 4 durant les etapes X i D amb la xilanasa comercial X_C mentre que al capítol 6 s'han mesurat al llarg de la seqüència XDEopD₁ amb les xilanases noves X_G i X_J . En aquests, s'obté que **el pretractament amb xilanasa fa augmentar la DQO acumulada dels efluent. Aquest augment es produeix a la mateixa etapa enzimàtica X** la qual és la responsable del 94% de la DQO acumulada en la seqüència XD i del 70% en la seqüència XDEopD₁. De tota manera, cal destacar que aquest augment de la DQO **és deguda majoritàriament als xilans dissolts**, (i per tant correspon a DBO) els quals seran fàcilment biodegradables. De la mateixa manera, el color dels efluent també augmenta en les seqüències on s'hi ha afegit xilanasa degut a l'eliminació de lignina o bé d'hidrats de carboni amb grups cromòfors. Aquest augment es produeix durant l'etapa X.

Els alts valors de DQO i color de les seqüències amb etapa de pretractament enzimàtic amb xilanasa provenen de l'etapa X, coincideixen amb experiències anteriors (Siles *et al.*, 1996; Roncero, 2001) i constitueix el principal inconvenient d'aquest pretractament en els processos de blanqueig de pastes. Una possible forma de solucionar aquest problema seria la recirculació dels efluent procedents del pretractament enzimàtic cap al rentat de la pasta crua i el seu posterior enviament cap a la secció de recuperació.

Als capítols 5 i 6 també s'ha realitzat un espectre UV-Visible dels efluent de l'etapa X i s'observa que **els tractaments amb xilanases fan augmentar la quantitat d'uns determinats productes els quals estan molt relacionats amb el seu posterior efecte en potenciar el blanqueig. Aquests productes absorbeixen al voltant de les longituds d'ona de 280 nm i 240 nm els quals es conclou que són lignina i àcids hexenurònics units a xilooligosacàrids. Aquest anàlisi constitueix un mètode ràpid per tal d'identificar el posterior efecte d'una xilanasa en potenciar el blanqueig**. A més, es demostra que totes les xilanases augmenten aquests productes tot i que en diferent quantitat, inclús aquelles que no han estat efectives en deslignificar i blanquejar.

15.2.10 Efectes en la morfologia de les fibres per SEM

Una de les tècniques més útils per estudiar l'acció dels enzims i agents blanquejants sobre les fibres cel·lulòsiques és la microscopia electrònica d'escombrat (SEM). Aquesta tècnica permet visualitzar de forma clara la superfície de les fibres i avaluar la presència de reprecipitats de lignina residual i hemicel·luloses, així com la fibril·lació 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 $X_{3J}\text{DEopD}_1$. 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 **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).

15.2.11 És possible un estalvi de reactius amb un pretractament X?

Tant al capítol 4 on s'ha estudiat la xilanasa comercial X_C en la seqüència completa de blanqueig $X\text{DEopD}_1$, com al capítol 6 on s'ha realitzat la mateixa seqüència però amb les xilanasas noves X_G i X_J i amb la combinació de les dues (X_{3+3}): **els efectes de les xilanasas queden atenuats al final de la seqüència després de l'etapa D_1** degut als baixos valors d' Ik i l'alt grau de blanc que s'assoleix ja amb la seqüència del blanc, el mateix s'observa en els àcids hexenurònics al capítol 6.

Cal destacar que al capítol 6 (Taula 6-4) s'obté un **alt grau de blanc després de l'etapa Eop (88%ISO)**, a la seqüència pretractada amb xilanasa (X_{3+3}). Aquest fet suggereix que **es podria suprimir la següent etapa D_1** . Això permetria un estalvi del diòxid de clor i per tant una reducció de la contaminació dels efluents i de la seva càrrega en AOX.

Una altra manera de seguir veient l'efecte beneficiós de la xilanasa fins al final de la seqüència de blanqueig, podria ser disminuint bé la dosi de diòxid de clor a la primera o última etapa D o bé la dosi de peròxid d'hidrogen de l'etapa Eop. En treballs anteriors es parla de la possibilitat d'estalvi de reactius com diòxid de clor (Paice *et al.*, 1995; Siles *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 1997; Shah *et al.*, 2000) o bé peròxid d'hidrogen (Vicuña *et al.*, 1997; Roncero, 2001; Popovici *et al.*, 2004).

15.2.12 Propietats finals dels papers

Després de realitzar la seqüència complerta de blanqueig XDEopD₁ amb la xilanasa comercial X_C (capítol 4), i amb les xilanasas noves X_G i X_J (capítol 6), les pastes es refinen i es mesuren les propietats finals dels papers. Els resultats demostren que el pretractament enzimàtic no deteriora les propietats físiques finals dels papers.

15.2.13 Depèn l'efectivitat en el blanqueig de la família de glicosil hidrolases a la qual pertanyen les xilanasas?

Segons l'anàlisi de les xilanasas noves utilitzades, s'obté que **la xilanasa més eficient en potenciar el blanqueig és l'X_G que pertany a la família 11 de les glicosil hidrolases**. D'altra banda, les xilanasas de la família 10 no han produït efectes en potenciar el blanqueig però sí que produeixen efecte en disminuir el contingut en HexA de les pastes el que representa un valor afegit i un tret de gran rellevància per una xilanasa. S'ha demostrat l'efectivitat de la xilanasa X_J en el blanqueig de la pasta que com s'ha dit, pertany a la família 5 que és una família nova de xilanasas. Estudis anteriors demostren l'efectivitat de xilanasas de les famílies 10 i 11 de les glicosil hidrolases mentre que **en aquest treball es demostra per primera vegada l'efectivitat de xilanasas de la família 5 com a potenciadores del blanqueig**.

15.3 APLICACIÓ DEL SISTEMA LACASA-MEDIADOR

Les lacases són oxidoreductases ligninolítiques que necessiten la presència d'oxigen per actuar i oxidar els grups fenòlics de la lignina. El seu potencial redox no és gaire elevat el què limita la seva capacitat oxidativa i a més, el seu gran pes molecular li fa difícil l'accés a la lignina de la paret cel·lular (Bourbonnais i Paice, 1995). Per aquest motiu, és necessària la presència d'un mediador que és un compost de baix pes molecular que actua com intermediari redox. La seva forma oxidada és capaç de difondre's a la fibra i reaccionar amb les fraccions fenòliques i no fenòliques de la lignina i així deslignificar la pasta (Freudenreich, *et al.*, 1998) formant el conegut sistema lacasa-mediador (**L**). L'efectivitat d'un sistema lacasa-mediador per a degradar lignina depèn de les propietats de la lacasa, del mediador i de la seva combinació (Li, *et al.*, 1999).

Els mediadors amb grups funcionals N-OH s'oxiden al seu radical corresponent (NO·) en el tractament amb lacasa el qual és el responsable de l'alta oxidació de la lignina (Rocheffort *et al.*, 2004). Tanmateix, la seva naturalesa de radical causa alguns

problemes d'estabilitat el què limita el seu ús en la deslignificació ja que pot atacar la lacasa provocant una disminució en la seva activitat (Sigoillot *et al.*, 2005). Aquesta inactivació de la lacasa per part de la forma oxidada dels mediadors depèn del mediador utilitzat (Li *et al.*, 1999) i representa un inconvenient pel sistema lacasa-mediador.

Un altre dels problemes que presenta el sistema lacasa-mediador és l'elevat cost del mediador i la possible toxicitat del sistema. L'ABTS va ser el primer mediador utilitzat capaç de deslignificar la pasta (Bourbonnais i Paice, 1992) però actualment han estat estudiats altres tipus de mediadors, sent els que contenen un grup funcional N-OH els mediadors de la lacasa més efectius descrits per a deslignificar la pasta (Xu, *et al.*, 2000), entre ells, l'HBT (1-hidroxibenzotriazol) sembla ser el més efectiu descrit fins el moment (García *et al.*, 2003; Camarero *et al.*, 2004; Sigoillot *et al.*, 2005).

Així, com el tractament amb xilanases és viable industrialment i actualment algunes fàbriques de pasta l'han ja incorporat en les seves seqüències de blanqueig (Bajpai, 2004; Popovici *et al.*, 2004), **la implantació industrial del procés de blanqueig L encara ha de fer front a alguns reptes com: i) la disponibilitat de la lacasa** (ha de ser disponible en suficient quantitat per a la producció a fàbrica); **ii) el cost i possible toxicitat dels mediadors en els efluents** (interessa d'una banda reduir al mínim la seva dosi d'aplicació i d'altra banda impulsar la recerca de nous mediadors més barats i més respectuosos pel medi ambient); **iii) el temps de tractament** (interessa que sigui mínim per a poder ser integrat en els processos industrials de blanqueig).

15.3.1 És possible millorar les condicions d'aplicació del sistema lacasa-mediador?

En aquesta tesi s'han dut a terme diferents estudis per tal de fer el tractament L més factible industrialment. D'una banda, **s'ha optimitzat el tractament L mitjançant un pla estadístic seqüencial utilitzant com a variables la dosi de lacasa, la dosi de mediador i el temps de tractament amb l'objectiu de reduir al mínim les tres variables.** S'ha donat preferència a disminuir la dosi de mediador, seguit de disminuir el temps de tractament i per últim disminuir la dosi de lacasa. Aquest estudi s'ha dut a terme entre els capítols 7 i 8, on el mediador utilitzat ha estat d'HBT i les propietats d'índex kappa i blancor han estat les respostes optimitzades després de la mateixa etapa L (capítol 7) i després d'una etapa d'extracció alcalina (E) posterior a L (capítol 8).

D'altra banda, **s'ha assajat també un mediador sintètic que ha estat descobert recentment, que és més barat i en principi menys tòxic que l'HBT** i igual que aquest, pertany al grup de mediadors amb un grup funcional N-OH. Aquest mediador és **l'NHA** (N-hydroxyacetanilida) i l'efectivitat d'aquest en deslignificar la pasta ha estat demostrada per alguns autors (Chakar i Ragauskas 2000; Balakshin *et al.*, 2001; Poppius-Levlin *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001). Per últim, també s'ha dut a terme la **recerca de nous mediadors naturals** que són produïts durant el creixement natural de *Pycnoporus cinnabarinus* sobre la fusta de pi.

15.3.1.1 Optimització del sistema lacasa-mediador (L)

Als capítols 7 i 8 s'obtenen models que prediuen la variació de l'Ik i la blancor en funció de les variables del sistema lacasa-mediador que són la dosi de lacasa, la dosi de mediador i el temps de tractament. Les seqüències realitzades han estat seqüències LE i XLE i les respostes s'optimitzen després de l'etapa L i després de l'etapa E. Segons els models obtinguts, s'observa que en tots els casos les tres variables influeixen. Després de l'etapa L el temps de tractament és la variable més influent, mentre que després de l'etapa E la dosi de lacasa i el temps de tractament són les que més influeixen. La dosi de mediador és en general la variable menys important en tots els models, el que resulta positiu ja que és la que més interessa reduir en el sistema. Un dels objectius de realitzar aquest pla estadístic és trobar les condicions òptimes d'aplicació del tractament L obtenint el menor Ik i el major grau de blanc i reduint al màxim les variables.

Cal destacar un efecte generalitzat del temps de tractament en gairebé tots els models: **s'observen dues fases ben diferenciades de comportament. Una que va d'1 hora a aproximadament entre les 3 i 5 hores i l'altra que va d'entre les 3 i 5 hores a les 7 hores.** Durant la primera fase, l'Ik disminueix ràpidament mentre que durant la segona fase l'Ik s'estabilitza. D'altra banda, sobre la blancor només s'observa aquest efecte en dues fases a la seqüència LE: després de l'etapa L, durant la primera fase aquesta disminueix i a la segona fase augmenta; per l'etapa E l'efecte és el contrari, és a dir, durant la primera fase la blancor augmenta i a la segona fase aquesta disminueix lleugerament. García *et al.*, (2003) van observar una reversió de la blancor a partir de temps de tractaments de més de 12 hores que justifiquen per la formació de grups carbonil a la cadena de cel·lulosa durant el tractament L.

Al comparar els models entre ells (capítol 9), s'observa que **durant la seqüència LE, els comportaments de les respostes d'Ik i blancor són diferents entre les**

etapes L i E. D'altra banda, els models de la seqüència XLE són en general més senzills i la tendència és semblant entre etapes.

Al capítol 7 s'han escollit les millors condicions d'aplicació d'acord amb les corbes de nivell dels models obtinguts després de l'etapa L (Figura 7-13). Després d'aquesta etapa s'ha observat gran diferència entre les millors propietats d'Ik i blancor ja que on s'obté el menor Ik la blancor és baixa i viceversa. Les millors condicions d'aplicació s'escullen donant preferència a minimitzar l'Ik ja que l'objectiu de l'etapa L és deslignificar. Així, el punt escollit per la seqüència L és a 20 U/gps de lacasa, al 0,5% sps de mediador i a les 6,4 hores, que correspon a un Ik de 6,3 i a una blancor del 58%ISO. Unes condicions semblants d'aplicació s'han obtingut per a la seqüència XL, però amb aquesta l'Ik és inferior (5,2) i la blancor també és inferior (56%ISO). Després d'aquesta etapa doncs, s'obtenen diferències entre les condicions escollides d'Ik i blancor i entre seqüències.

Així, al capítol 8 es realitza una etapa d'extracció alcalina de totes les pastes anteriors i igual que al capítol 7 s'obtenen models que prediuen l'Ik i la blancor en funció de les variables d'L. Durant una etapa E, la pasta es deslignifica i blanqueja degut a que s'extreuen fraccions de lignina de la pasta no solubles al pH de l'etapa anterior enzimàtica (Call i Muecke, 1997; Freudenreich *et al.*, 1998; Chakar i Ragauskas, 2000 i 2001). Després d'aquesta etapa, els models d'Ik i blancor se segueixen comportant diferent i les condicions d'aplicació escollides també són diferents ja que mentre que per obtenir el menor Ik el temps ha de ser alt i la lacasa mitja, per obtenir la major blancor la dosi de lacasa ha de ser alta i el temps mig; de tota manera, els resultats d'Ik i blancor en aquests punts no són tant diferents com després de l'etapa L i **s'escull el punt d'aplicació on s'obté la major blancor i on la dosi de lacasa és alta (20U/gps), la dosi de mediador baixa (0,5%sp) i el temps de tractament mig (3,4 hores).** En aquest punt **l'Ik és 5,2 i la blancor és 68%ISO a la seqüència LE.** Pel què fa la **seqüència XLE,** s'escull un punt semblant d'aplicació de les variables però **l'Ik que s'obté és 1 unitat inferior i la blancor és l'1%ISO superior a LE (al revés que després de l'etapa L on la blancor era inferior).** La diferència de comportament entre seqüències LE i XLE indicaria que després de l'etapa L es forma algun producte a la pasta que interfereix en la blancor i que es forma en major quantitat en XL, aquest producte s'extreu amb l'etapa d'extracció alcalina.

Els resultats obtinguts després de l'etapa L serveixen per a avaluar el que està passant a les pastes durant aquesta etapa, tot i que l'efecte real d'L és el que s'observa després de l'etapa E, per tant, cal quedar-se amb les millors condicions d'aplicació que s'han obtingut després de l'etapa d'extracció alcalina.

En els models obtinguts gairebé no s'han detectat interaccions entre les diferents variables, només s'ha trobat una interacció significativa en el model Ik de la seqüència LE (després de cada etapa) entre la dosi de lacasa i el temps de tractament, però el coeficient d'aquestes variables no és gaire elevat (0,17-0,18) i provoca pocs efectes. També s'observen interaccions significatives en el model de blancor de la seqüència XLE després de l'etapa E però amb efectes poc importants. Així, no es pot dir que hi hagi cap inhibició de l'activitat de la lacasa ni a causa del temps de tractament ni a causa del mediador a les condicions estudiades. Al realitzar l'optimització del tractament L als capítols 7 i 8, la dosi d'HBT es limita entre 0,5 i 2,5 ja que en altres treballs (García *et al.*, 2003) s'observa una inhibició de la lacasa per part del mediador HBT a partir de dosis superiors a 2,64%*sps*; al no haver observat aquest efecte, indica que els límits de dosi de mediador escollits al pla han estat adequats. Al capítol 11 s'ha analitzat l'evolució de l'activitat de la lacasa al llarg de 4 hores de tractament en presència de pasta i del 3% del mediador HBT i s'observa que a partir de la primera hora la lacasa perd activitat a causa de la formació del radical nitroxil de l'HBT com també obtenen Ibarra *et al.*, (2006 (b)) i Sigoillot *et al.*, (2005). Al cap de 4 hores queda el 38% d'activitat de la lacasa.

15.3.1.2 Depèn l'efectivitat d'L de la seqüència de blanqueig?

Al capítol 11 s'optimitzen les condicions d'aplicació de l'etapa L tenint en compte si el sistema actua millor amb una **pasta crua o amb una pasta deslignificada amb oxigen** i si funciona millor amb una etapa de pretractament **enzimàtic amb xilanasa o amb ferulat esterasa**. Es conclou que tant el tractament L_{HBT} (sistema lacasa-mediador amb HBT com a mediador) com el tractament L_{NHA} (sistema lacasa-mediador amb NHA com a mediador) **funcionen millor amb una pasta crua i si es realitza a la pasta una etapa de pretractament enzimàtic X**. D'altra banda, als capítols 7 i 8 on s'optimitza el tractament L, s'obté que després de l'etapa X, tot el sistema lacasa-mediador actua més eficientment.

Al capítol 9 es planteja si **és realment necessari l'etapa d'extracció alcalina posterior al tractament L**, i per això es comparen els resultats i els models obtinguts entre les etapes L i E als capítols anteriors. Al mateix capítol se separen els efectes que són produïts a cada etapa i es comenta que amb una etapa **L l'Ik disminueix fins el 25%** i conseqüentment també **augmenta la blancor fins un 9%ISO**, mentre que l'etapa **d'extracció alcalina posterior al tractament L fa disminuir l'índex kappa de les pastes fins el 38%** i en fa augmentar la blancor fins el **13%ISO degut a que s'extreuen fraccions de lignina que han quedat a la pasta a conseqüència del tractament L**. També es conclou que durant l'etapa L la deslignificació i blanqueig que es produeix depèn de les condicions d'aplicació d'L mentre que l'efecte que es

produeix durant l'etapa E és independent de les condicions a les que s'ha aplicat l'etapa L. A més, tal com s'ha demostrat al capítol 10, durant l'etapa E s'extreu lignina i s'eliminen HexA (degut a l'extracció de lignina unida a xilans que contenen HexA).

15.3.1.3 Avaluació del mediador NHA

En varis treballs anteriors es parla de l'efectivitat del mediador HBT per a blanquejar i deslignificar la pasta. D'altra banda, pocs treballs s'han realitzat amb el mediador NHA (Chakar i Ragauskas 2000; Balakshin *et al.*, 2001; Poppius-Levlin *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001). Al capítol 11 es compara l'efectivitat del mediador NHA amb l'HBT. A partir de les constants cinètiques d'aquest es demostra que la lacasa oxida l'NHA més ràpid que l'HBT, això és degut en part a que l'NHA té un potencial redox més baix que l'HBT i la lacasa el pot oxidar millor. El baix potencial redox de l'NHA no disminueix la seva efectivitat sobre la pasta ja que es demostra que en deslignificar és igual d'eficient que l'HBT. D'altra banda, degut a la formació de quinones amb el sistema L_{NHA} o a la coloració que dona l'NHA oxidat, l'augment de blancor és superior quan s'utilitza el sistema L_{HBT} . Aquest problema es podria solucionar aplicant una etapa P posterior ja que el peròxid d'hidrogen és eficient en l'eliminació de quinones (Dence i Reeve, 1996).

Al capítol 11 també s'observa que els dos mediadors produeixen un efecte similar sobre la lacasa ja que els dos l'inactiven a partir de la primera hora quan s'incuben 20U/gps de lacasa amb l'1% d'NHA o el 3% d'HBT, aquesta inactivació s'argumenta que és deguda a causa dels radicals nitroxil dels mediadors que es formen al ser oxidats per la lacasa tal com també comenten Ibarra *et al.*, (2006 (b)). També s'observa que la presència de pasta provoca un efecte protector en l'activitat de la lacasa front els dos mediadors.

Per últim, la voltametria cíclica demostra que l'oxidació de l'NHA és depenent de pH i que a pH 5 és més reversible que a pH 4, el mateix tractament sobre la pasta a pH 5 demostra que al ser més reversible també és més efectiu. D'altra banda, l'HBT presenta una reacció de tipus irreversible.

Aquest estudi sobre l'NHA el converteix en un mediador alternatiu a l'HBT molt prometedor ja que és més barat i en principi menys contaminant que l'HBT. A més, el fet que la seva oxidació sigui reversible representa un avantatge addicional ja que es podrà reutilitzar en el procés.

15.3.1.4 Recerca de mediadors naturals

Degut a l'alt cost i a la possible toxicitat dels mediadors sintètics, **s'ha realitzat al capítol 12 una recerca de mediadors naturals produïts durant el creixement natural de *P. cinnabarinus* sobre la fusta de pi** ja que alguns compostos, ja sigui produïts pel fong o bé presents durant la biodegradació dels substrats de la lignocel·lulosa, poden actuar com a mediadors naturals de la lacasa (Johannes i Majcherczyk, 2000) i aquests poden ser eficients per a deslignificar i blanquejar la pasta (Camarero *et al.*, 2005 i 2007) o bé per eliminar compostos lipofílics (Gutiérrez *et al.*, 2007).

Al aplicar el sobrenedant obtingut del creixement de *P.cinnabarinus* sobre la fusta de pi com una etapa L en una seqüència de blanqueig XLE s'observa que l'Ik disminueix lleugerament, el que indica la presència d'una substància que ha actuat com a mediador natural ja que la lacasa per si sola no produeix deslignificació. Per tal d'identificar aquesta substància cal analitzar la mostra per LC-MS, GC-MS.

15.3.2 Afecta el tractament amb el sistema lacasa-mediador als àcids hexenurònics de les pastes?

Al capítol 10 es mesura el contingut en HexA de diferents pastes obtingudes segons les seqüències LE i XLE a diferents condicions d'aplicació d'L. Aquestes condicions d'L corresponen a quan totes les variables es troben al nivell baix, quan les tres es troben al nivell mig i quan es troben al nivell alt. En aquest capítol es demostra que **els HexA disminueixen entre l'11 i el 35%** en les seqüències LE i XLE, i que aquesta disminució d'HexA es produeix **tant durant l'etapa L com durant l'etapa E i és influenciada per les condicions d'aplicació de l'etapa L i per l'etapa de pretractament X.**

També s'observa que no hi ha diferència entre passar de condicions baixes a mitges d'aplicació d'L mentre que els HexA disminueixen al passar a condicions altes. Es comenta que no se sap si aquesta disminució dels HexA és produïda per una de les variables en concret ja que Gamelas *et al.*, (2007) obtenen que els HexA disminueixen al augmentar el temps de tractament i el fet d'estar 7 hores amb el tampó tartrat a condicions àcides podria fer disminuir els HexA. Per aquest motiu s'ha mesurat el contingut en HexA en el punt on tant la dosi de lacasa com la dosi de mediador són mínimes ($X_1=-1$ i $X_2=-1$) i variant el temps de tractament del punt mínim ($X_3=-1$) al punt màxim ($X_3=+1$). D'aquesta manera es pot saber si és l'augment de temps el responsable d'aquesta disminució dels HexA. Aquests resultats es mostren representats gràficament a la Figura 15-5, la primera i segona columnes corresponen a

la seqüència LE i si es comparen entre elles s'observa que l'augment del temps de tractament no produeix una disminució dels HexA, mentre que la tercera i la quarta columnes corresponen a la seqüència XLE i tampoc un augment del temps de tractament d'1 a 7 hores fa disminuir el contingut en HexA.

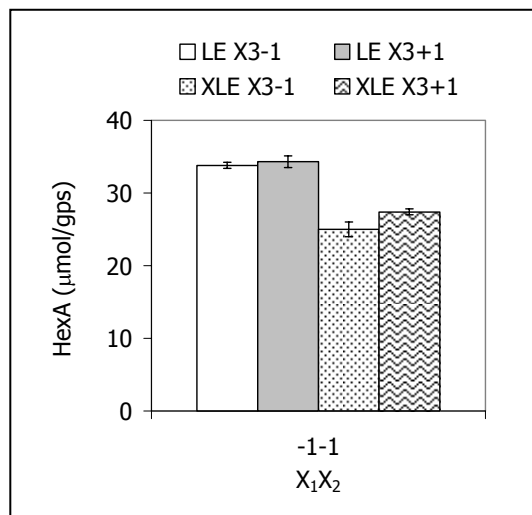


Figura 15-5. Efecte de l'augment del temps de tractament quan la dosi de lacasa i de mediador es troben al nivell mínim

Cal destacar que al capítol 8 (Figura 8-5) s'ha determinat que augmentar el temps de tractament en aquestes mateixes condicions ($X_1=-1$ i $X_2=-1$) provoca una disminució de l'Ik i un augment en blancor. Com que els HexA no disminueixen, la disminució de l'Ik és deguda a que s'elimina lignina al augmentar el temps.

Així doncs, **el temps de tractament no és el responsable de la disminució dels HexA durant el tractament L (quan les altres dues variables es troben al nivell mínim)**, per aquest motiu s'ha mesurat també el contingut en HexA de les pastes quan el temps és màxim i quan les variables dosi de lacasa i de mediador varien entre els punts +1 i -1. A la Figura 15-6 (a) es mostra l'efecte d'augmentar la dosi de lacasa del nivell mínim al màxim quan la dosi de mediador és mínima (A) o màxima (B), mantenint sempre el temps al nivell alt ($X_3=+1$). A la seqüència LE (primera i segona columna de cada bloc), augmentar la dosi de lacasa produeix efecte en disminuir els HexA quan la dosi de mediador és alta (B), mentre que a la seqüència XLE (tercera i quarta columna), augmentar la dosi de lacasa disminueix els HexA en A i en B tot i que és major a B.

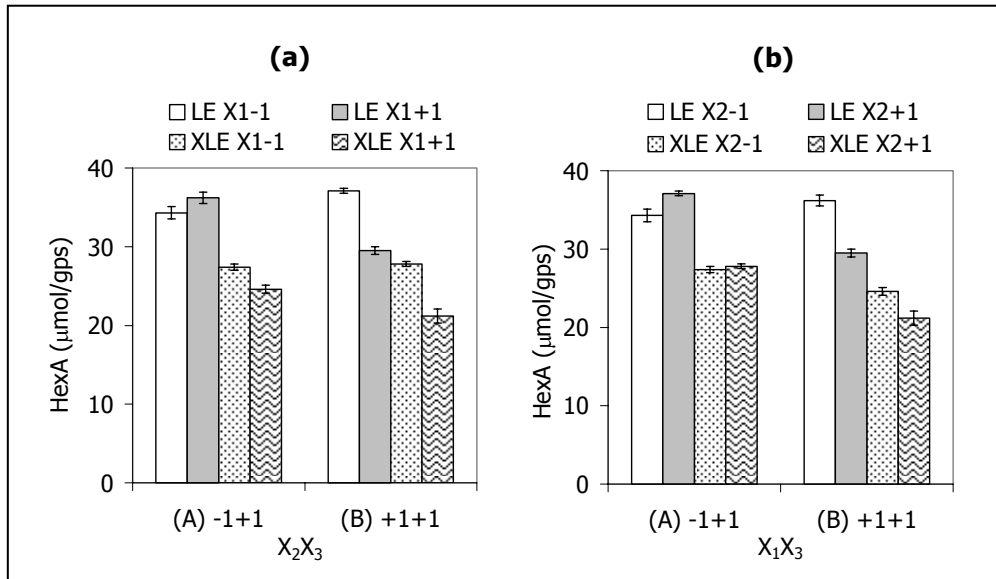


Figura 15-6. Efecte de l'augment de la dosi de lacasa (a) i de mediador (b) segons les condicions de les altres dues variables

A la Figura 15-6 (b) es mostra l'efecte d'augmentar la dosi de mediador del nivell mínim al màxim quan la dosi de lacasa és mínima (A) o màxima (B), mantenint sempre el temps al nivell alt ($X_3=+1$). A la seqüència LE (primera i segona columna de cada bloc), augmentar la dosi de mediador provoca una disminució dels HexA quan la dosi de lacasa és alta (B) i el mateix efecte s'observa a la seqüència XLE (tercera i quarta columna).

D'aquests resultats es pot dir que **la dosi de lacasa i de mediador sí que afecten al contingut en HexA de les pastes** però de tota manera seria necessari realitzar els HexA a tots els punts del pla i analitzar els resultats amb un model estadístic per tal de poder extreure més conclusions. Un efecte generalitzat en tots els punts mesurats és que les pastes XLE tenen sempre un contingut en HexA al voltant de 10 µmol/gps inferior a les pastes de la seqüència LE.

15.3.2.1 Com afecten els HexA als models d'Ik i blancor?

Com s'ha comentat anteriorment, als capítols 7 i 8 s'han observat **diferències en el comportament de l'índex kappa i la blancor segons els models d'una mateixa seqüència i també s'han observat diferències de comportament entre les dues seqüències LE i XLE. Els àcids hexenurònics (HexA) podrien ser els responsables d'aquesta diferència de comportament** per varies raons:

- 1) S'ha demostrat que aquests àcids s'eliminen diferent depenent de les condicions d'aplicació d'L i de si a la pasta s'ha realitzat una etapa de pretractament X
- 2) Aquests àcids presenten gran influència a l'Ik durant les seqüències LE-XLE que pot arribar fins el 70% tal com s'ha determinat al capítol 10 (Figura 10-6)
- 3) Al capítol 14 s'ha determinat que l'eliminació d'HexA no presenta una relació directa amb la blancor (Figura 14-7) i al capítol 10 es demostra que l'augment en la blancor de les pastes està lligat principalment amb l'eliminació de lignina, això justificaria que no vagin lligades les propietats d'Ik i blancor en els models
- 4) Al llarg de la seqüència XLE, la quantitat d'HexA és sempre inferior a la seqüència LE el que explicaria les diferències de comportament entre seqüències i també que els models de la seqüència XLE siguin més senzills i clars que els de la seqüència LE
- 5) Al capítol 7 s'obté que per un mateix punt d'aplicació d'L, amb un pretractament amb xilanasa s'aconsegueix un Ik 1,5 unitats inferior mentre que la blancor és igual entre les pastes L i XL o bé inferior en XL: el menor Ik en aquest punt és degut al menor contingut en HexA de les pastes XL

García *et al.*, (2003) no van observar aquesta diferència de comportament entre els models d'Ik i blancor al realitzar un anàlisi estadístic similar amb pasta de lli, la qual cosa resulta coherent ja que aquesta pasta, al contrari que la pasta d'eucaliptus, no conté àcids hexenurònics.

15.3.3 Com afecta el tractament L a la lignina i a la viscositat?

Al capítol 10 es mesura l'índex kappa degut a la lignina (IK_{lig}) i la viscositat de les pastes tractades a diferents condicions d'aplicació del sistema lacasa-mediador.

La determinació de l' IK_{lig} permet calcular l'eliminació de lignina o "deslignificació real" que es produeix a les pastes. Els resultats d' IK_{lig} indiquen que **el tractament L oxida la lignina de la pasta produint una "deslignificació real" que depèn de les condicions d'aplicació d'L i que pot arribar fins al 47%**. D'altra banda, també es demostra que **l'etapa d'extracció alcalina (E) posterior a L també produeix "deslignificació real" que arriba fins al 27% degut a que extreu les fraccions de lignina no solubles al pH de l'etapa enzimàtica, i que no depèn de les condicions d'aplicació d'L**. Així, la "deslignificació real" que es produeix durant una **seqüència LE arriba fins al 71%**.

S'observa que **la degradació de la lignina** de la pasta durant el tractament L **és major al augmentar les condicions de les variables d'L fins al punt mig**, però si les tres variables passen al nivell superior l'efecte s'estabilitza i ja no s'elimina més lignina que la del punt mig. Aquest efecte està relacionat amb els models obtinguts, on s'ha comentat que a la majoria d'ells hi havia un efecte quadràtic del temps de tractament, on en una primera fase d'1 a les 3-5 hores aproximadament l'Ik disminueix ràpidament mentre que a partir de les 3-5 hores s'estabilitza. A l'apartat 15.3.2 s'ha comentat que l'augment del temps de tractament no és el causant de la disminució dels HexA, per tant, el fet d'augmentar el temps de tractament fins a les 3-5 hores fa disminuir la lignina de la pasta. A partir d'aquest punt el sistema lacasa-mediador podria oxidar els HexA ja que aquests disminueixen a condicions altes d'aplicació d'L. També es demostra que la degradació de la lignina per part del tractament L és la principal responsable de l'augment en la blancor d'aquesta etapa.

Al mesurar la viscositat de les pastes, després de la mateixa etapa enzimàtica L, sembla que disminueix lleugerament al passar de condicions baixes a mitges mentre que s'estabilitza al passar a condicions altes.

15.3.4 Com potencia la xilanasa l'efecte del sistema lacasa-mediador?

Ja s'ha comentat anteriorment que si el tractament L s'aplica després d'una etapa de pretractament X actua millor. Aquest fet s'ha demostrat tant al capítol 11 on s'ha observat que tant el sistema L_{HBT} com el sistema L_{NHA} són més efectius després de l'etapa de pretractament X, com als capítols 7 i 8 on es comparen models que preveuen les variacions d'Ik i blancor en funció de les variables d'L entre pastes obtingudes segons les seqüències LE i XLE i al capítol 10 on es compara l'eliminació d'HexA i lignina entre aquestes mateixes seqüències.

El pretractament enzimàtic amb xilanasa actua hidrolitzant els xilans que han quedat dipositats a la superfície de la fibra després de la cocció i que taponen l'accés dels reactius a les posteriors etapes de blanqueig. S'ha demostrat que al quedar la fibra més accessible, **el sistema lacasa-mediador ha actuat més eficientment després d'aquesta etapa X ja que fa augmentar tant la disminució de l'Ik (un 15%) com l'eliminació d'HexA (un 10%) per part del tractament L**. D'altra banda, **el pretractament X no facilita l'eliminació de lignina** i es pot dir que el menor Ik de les pastes XLE és degut al menor contingut en HexA d'aquestes.

Al comparar els diferents models obtinguts entre ells, s'observa que les variables influeixen de manera similar entre els models LE i XLE. Per això es conclou que **és tot**

el sistema lacasa-mediador el que penetra millor al interior de la fibra i actua més eficientment després d'haver-ne eliminat els xilans amb una etapa de pretractament X.

Les pastes XLE obtingudes presenten un I_k 1 unitat inferior, una blancor fins al 6%ISO superior i el contingut en HexA és de 10 $\mu\text{mol/gps}$ inferior a les pastes LE, mentre que $I_{k_{ig}}$ és semblant entre seqüències. Es pot dir que amb una etapa L sense etapa prèvia X, s'ataca sobretot la lignina de la pasta que és la principal responsable de la disminució de I_k , en canvi, amb una etapa de pretractament X abans d'L, la disminució de I_k és deguda tant a l'eliminació de lignina com d'HexA. **L'etapa X deixa la fibra de tal manera que el sistema lacasa-mediador hi pot actuar més eficientment facilitant-ne sobretot l'eliminació d'HexA que són els principals responsables del menor I_k en les pastes XLE.** La major blancor de les pastes XLE és degut principalment a que la mateixa etapa X fa augmentar la blancor a causa de l'eliminació de xilans amb compostos cromòfors o units a lignina.

Degut a les millors propietats que s'obtenen amb un tractament L posterior a una etapa enzimàtica X, es considera la possibilitat d'estalviar lacasa i mediador i de reduir el temps de tractament al que s'aplica una etapa L. Als capítols 7 i 8 es demostra que tant després de l'etapa L com de l'etapa E es poden reduir les variables d'L amb una etapa de pretractament X. De tota manera s'ha de considerar l'estalvi obtingut després de l'etapa E ja que després de l'etapa L les pastes XL no presenten major blancor. Així, **per una determinada blancor (al voltant del 70%ISO) es pot estalviar un 28,5% de lacasa, un 80% de mediador i reduir el temps de tractament 3 hores amb una etapa de pretractament X**, obtenint pastes amb menor índex kappa. L'índex kappa inferior és degut al menor contingut en àcids hexenurònics.

15.3.5 Quin efecte produeix el sistema lacasa-mediador sobre els esteroles?

Els coneguts dipòsits de "pitch" que es formen durant els processos d'obtenció de pastes i paper fan disminuir dràsticament la qualitat del producte final i afecten negativament el funcionament de la màquina de paper i són els responsables d'algunes parades de les operacions a fàbrica, el que resulta en pèrdues econòmiques en aquest sector industrial (Back, 2000). Els dipòsits de "pitch" tenen l'origen en els components lipofílics de la matèria prima (fusta) que no són afectats durant els processos de cocció i blanqueig. Els problemes de "pitch" s'han intensificat amb la introducció de seqüències totalment lliures de clor (TCF) ja que l'oxigen i el peròxid d'hidrogen utilitzats en les seqüències TCF no són tan efectius com els reactius amb

clor, com el diòxid de clor, en alliberar aquests compostos lipofílics (Gutiérrez *et al.*, 2001; Freire *et al.*, 2003 i 2006).

Els esterols lliures i conjugats són els principals responsables dels problemes de "pitch" i recentment, s'ha demostrat que el tractament amb el sistema lacasa-mediador és capaç d'alliberar els esterols de la pasta d'eucaliptus, tant utilitzant el mediador HBT (Gutiérrez *et al.*, 2006 (a i b)) com utilitzant mediadors naturals (Gutiérrez *et al.*, 2007). Per aquest motiu s'ha analitzat el contingut en esterols de les pastes després de l'etapa amb el sistema lacasa-mediador (L) a totes les experiències del pla experimental per tal de veure quines variables influeixen en l'eliminació d'aquests esterols. Els resultats d'esterols lliures de totes les pastes L es mostren a la Taula 15-2.

Taula 15-2. Contingut en esterols lliures de les diferents experiències després de l'etapa L

Exp.	x ₁	x ₂	x ₃	Esterols lliures (mg/Kg pasta)
Inicial	-	-	-	326,2
1	-1	-1	-1	198,9
2	1	-1	-1	111,2
3	-1	1	-1	169,3
4	1	1	-1	51,2
5	-1	-1	1	63,9
6	1	-1	1	19,3
7	-1	1	1	65,2
8	1	1	1	8,7
9	0	0	0	20,2
10	0	0	0	17,7
11	0	0	0	19,1
12	1	0	0	11,5
13	0	-1	0	35,5

Abans d'analitzar com afecten les diferents variables en els esterols de la pasta, primerament es relacionen els resultats del contingut en esterols amb els d'índex kappa i blancor obtinguts per aquestes experiències al capítol 7 (Taula 7-5, seqüència L) tal com es mostra a la Figura 15-7 (a i b). Segons aquestes figures es pot dir que sembla que **els esterols són influenciats per les diferents experiències del tractament L i la variació en aquests està relacionada amb les variacions d'Ik i blancor**, on la disminució dels esterols va lligada amb la disminució de l'Ik i amb l'augment de blancor.

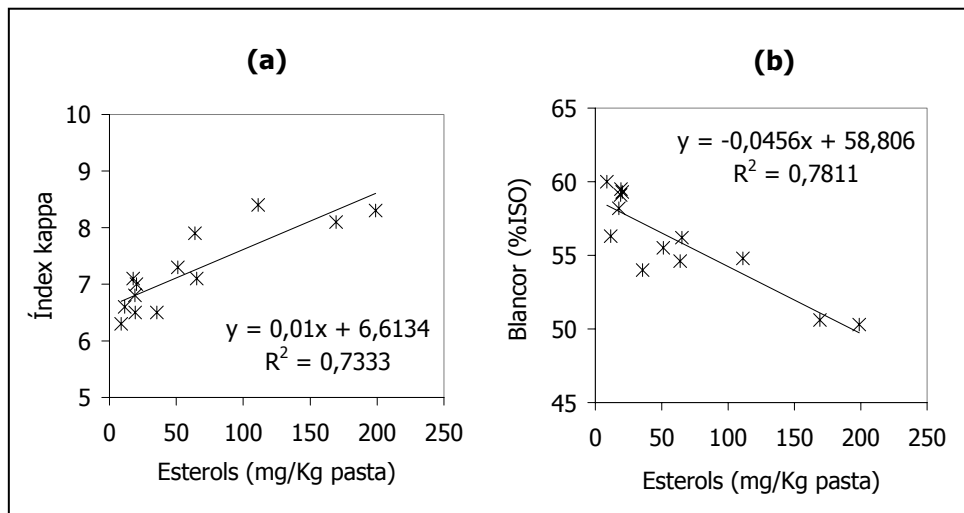


Figura 15-7. Relació entre els esterols i l'índex kappa (a) i la blancor (b) de les experiències L

A continuació es realitza un primer anàlisi de com afecta l'augment de cada variable en els esterols en funció de les altres dues i seguidament es realitza un anàlisi estadístic que permet obtenir un model preliminar que prediu la variació dels esterols en funció de les variables.

15.3.5.1 Efecte de la dosi de lacasa (x_1)

A la Figura 15-8 s'avalua l'efecte que produeix la dosi de lacasa en disminuir els esterols de la pasta. S'observa que **passar del nivell mínim al màxim de lacasa** (és a dir, passar d'1 a 20 U/gps) **provoca una disminució del contingut en esterols de la pasta que depèn de les condicions de les altres variables**. L'efecte de la lacasa és superior a temps baixos i el major efecte es produeix quan el temps és mínim i la dosi de mediador és màxima (B) on els esterols disminueixen 118 mg/kg pasta al augmentar la dosi de lacasa.

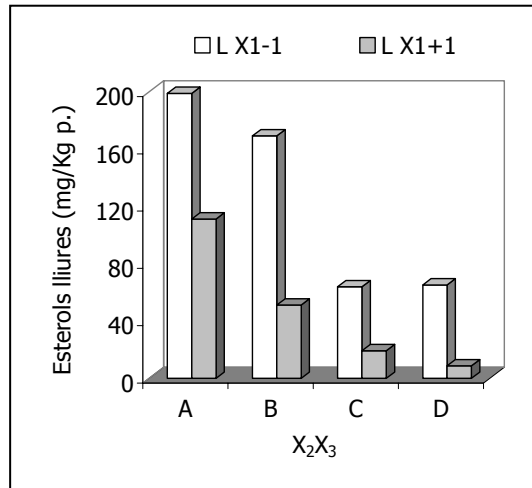


Figura 15-8. Efecte de la dosi de lacasa x_1 en els esterols durant l'etapa L. A ($x_2=-1$; $x_3=-1$), B ($x_2=+1$; $x_3=-1$), C ($x_2=-1$; $x_3=+1$) i D ($x_2=+1$; $x_3=+1$)

15.3.5.2 Efecte de la dosi de mediador (x_2)

A la Figura 15-9 s'avalua l'efecte que produeix la dosi de mediador en disminuir els esterols de la pasta. **Augmentar la dosi de mediador de 0,5 a 2,5% sps només produeix efectes significatius a temps curts** i és quan la dosi de lacasa es troba al nivell màxim (B) on es produeix el major efecte on els esterols disminueixen 60 mg/kg de pasta degut a l'augment de la dosi de mediador.

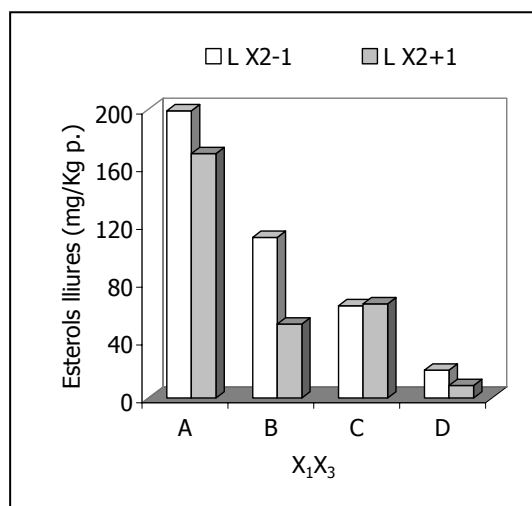


Figura 15-9. Efecte de la dosi de mediador x_2 en els esterols durant l'etapa L. A ($x_1=-1$; $x_3=-1$), B ($x_1=+1$; $x_3=-1$), C ($x_1=-1$; $x_3=+1$) i D ($x_1=+1$; $x_3=+1$)

15.3.5.3 Efecte del temps de tractament (x_3)

A la Figura 15-10 s'avalua l'efecte que produeix el temps de tractament en disminuir els esterols de la pasta. **Augmentar el temps de tractament d'1 a 7 hores, provoca sempre una disminució dels esterols de la pasta que depèn de les condicions de les altres dues variables.** L'efecte del temps és superior quan la lacasa es troba al nivell mínim (A i C) tot i que el major efecte es dóna quan també el mediador es troba al nivell mínim (A) on els esterols disminueixen 135 mg/kg de pasta degut a l'augment del temps de tractament.

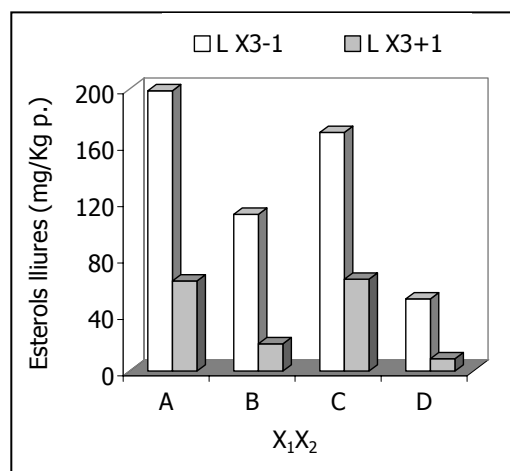


Figura 15-10. Efecte del temps de tractament x_3 en els esterols durant l'etapa L. A ($x_1=-1$; $x_2=-1$); B ($x_1=+1$; $x_2=-1$); C ($x_1=-1$; $x_2=+1$); D ($x_1=+1$; $x_2=+1$)

15.3.5.4 Representació del model obtingut pels esterols

Es realitza un anàlisi estadístic a partir dels punts experimentals. Primerament s'analitza el model lineal 2^3 i seguidament s'afegeixen les tres experiències al centre on es determina que el terme quadràtic és significatiu, per aquest motiu són necessàries dues experiències addicionals per a determinar quina variable o variables tenen el terme quadràtic significatiu i desconfondre'l. Després d'un segon anàlisi es troba l'equació del model per als esterols.

El model obtingut, representa un ajust provisional que prediu les variacions en els esterols segons les variables del sistema. Tal com també demostren els valors de la Taula 15-2, als punts mitjos de les variables (000) s'assoleixen valors d'esterols molt baixos, el que implica que augmentar les variables ja no suposa disminuir els esterols. Així, seria necessari realitzar un altre pla acotant els valors màxims de les variables a valors més baixos.

S'observen dues fases de comportament dels esterols en funció del temps, una que va d'1 a les 5 hores on augmentar el temps comporta disminuir ràpidament els esterols mentre que en una segona fase que va de les 5 a les 7 hores, on el nivell d'esterols s'estabilitza. Aquest efecte en dues fases del temps de tractament també s'ha observat en les propietats d'Ik i blancor al capítol 7 (Figures 7-7 i 7-8). A la Figura 15-11 (a) s'ha representat gràficament la variació dels esterols en funció del temps de tractament a dosi de lacasa constant. En aquesta figura, s'observa que al augmentar la dosi de lacasa (de -1 a 0) el contingut en esterols al llarg del temps disminueix.

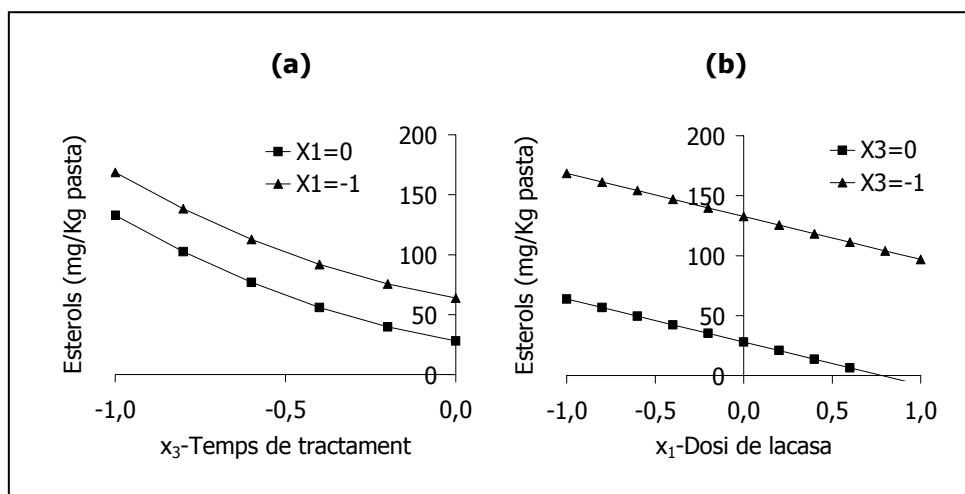


Figura 15-11. Variació dels esterols en funció del temps de tractament a dosi de lacasa constant (a) i en funció de la dosi de lacasa per a un temps de tractament constant (b)

A la Figura 15-11 (b) s'ha representat gràficament la variació dels esterols en funció de la dosi de lacasa per a un temps de tractament constant. S'observa que sempre **augmentar la dosi de lacasa comporta disminuir el contingut en esterols** independentment del temps de tractament. Aquest efecte correspon amb el que s'ha observat en el model d'Ik després d'aquesta mateixa etapa. A la figura, també s'observa un salt important en els esterols al passar de temps curts ($x_3=-1$) a temps mitjos ($X_3=0$).

Cal destacar que la variable x_2 dosi de mediador no presenta influència en disminuir els esterols segons el model obtingut, de tota manera, tal com s'ha observat a la Figura 15-9 si que augmentar la dosi de mediador influeix lleugerament a temps curts.

Per tant, **es demostra que amb un sistema lacasa-mediador, a part de disminuir l'Ik i augmentar la blancor també disminueixen els esterols de la**

pasta el que comportarà diferents avantatges com una reducció del “pitch” durant la fabricació dels papers amb la corresponent reducció dels costos.

15.3.6 És el tractament L comparable a D?

En aquesta tesi, s’han trobat diferents aspectes positius per a la utilització del sistema lacasa-mediador (L). A continuació es comparen els diferents efectes que el tractament L ha produït sobre la pasta amb els efectes que ha produït el diòxid de clor (D).

15.3.6.1 Efecte de D i L en les diferents propietats de les pastes

A la Taula 15-3 es mostren els diferents efectes que les etapes D i L han produït a les propietats de les pastes d’índex kappa, blancor, àcids hexenurònics i viscositat, tant després de la mateixa etapa D o L com després de l’extracció alcalina posterior corresponent (Eop o E).

Taula 15-3. Efecte dels tractaments D i L en les diferents propietats de les pastes

	Disminució Ik (%)	Augment blancor (%ISO)	Disminució HexA (%)	Viscositat (mL/g)
D	56	24,4	58	960±5
L	25	8,8	11	859±28
DEop	65	34,1	57	894±50
LE	44	17,6	22	

Segons els resultats que es mostren a la taula, s’observa que el diòxid de clor és més efectiu en millorar les diferents propietats de les pastes, de tota manera, el sistema lacasa-mediador sembla ser un mètode prometedor per a blanquejar pasta kraft. A la Taula 15-1 s’ha observat que el diòxid de clor redueix a la meitat la lignina de la pasta assolint un valor d’S/G d’1,6 després de l’etapa D, mentre que Ibarra *et al.*, (2007) obtenen que després d’una etapa L la relació entre les unitats de lignina S/G és de 2,3.

El diòxid de clor és un agent de blanqueig barat i eficient que no pot ser totalment substituït per un sistema lacasa-mediador sense afectar el blanqueig final de la pasta. Tanmateix hi podria haver beneficis substituint una fracció del diòxid de clor amb l’addició d’un sistema lacasa-mediador a la seqüència de blanqueig d’una fàbrica de blanqueig ECF. D’altra banda, **el tractament L té l’avantatge que pot ser implementat en una fàbrica sense grans canvis en la infraestructura de la seqüència de blanqueig**: una solució amb lacasa i mediador hauria de ser afegida in via en una torre d’oxigen existent, per exemple.

15.3.6.2 Efecte de D i L en els esterols i àcids grassos

A l'apartat anterior s'ha observat que el tractament L disminueix els esterols de la pasta els quals constitueixen un dels principals causants del pitch durant la fabricació de paper. A continuació es compara l'efecte que el tractament L els produeix amb l'efecte que els causa una etapa amb diòxid de clor (D) així com l'efecte que aquests tractaments provoquen als àcids grassos de les pastes (Taula 15-4).

Taula 15-4. Contingut en àcids grassos i esterols de les pastes inicial, D i L

	Àcids grassos (mg/Kg pasta)	Esterols lliures (mg/Kg pasta)
Pasta inicial	31,1	326,2
D	18,0	149,5
L	16,3	8,7

Segons els resultats de la taula, s'observa que els àcids grassos disminueixen lleugerament respecte la pasta inicial però sense diferències entre tractaments; d'altra banda els esterols són més afectats per una etapa L que per una etapa D, així, després de **l'etapa L gairebé s'eliminen tots els esterols de la pasta (el 97%) mentre que amb una etapa D encara queden gran quantitat d'esterols (se n'elimina el 54%)**. La disminució dels esterols com ja s'ha comentat és molt influenciada pel temps de tractament d'L i també per la dosi de lacasa. La disminució dels esterols representa un efecte molt beneficiós per un tractament L ja que es reduiran els problemes del pitch durant la fabricació de paper.

15.3.6.3 Potència X més el blanqueig abans d'una etapa D o abans d'una etapa L?

D'altra banda, un aspecte a destacar del tractament L és que quan ha estat aplicat posterior a una etapa de pretractament X, s'ha vist el seu efecte molt incrementat. Per aquest motiu, a la Figura 15-12 es comparen els efectes que produeix el pretractament enzimàtic X quan és aplicat en una seqüència ECF abans d'una etapa D, amb els efectes que produeix quan és aplicat en una seqüència TCF abans d'una etapa enzimàtica amb el sistema lacasa-mediador. S'observa que tant en disminuir l'Ik (a) com en augmentar la blancor (b) com en disminuir els HexA (c), l'efecte de la xilanasas es veu més pronunciat quan és aplicada abans de l'etapa amb el sistema lacasa-mediador (L). Si es compara l'efecte d'X en disminuir l'Ik (a) s'observa que tant després de la mateixa etapa D o L com de l'etapa Eop o E, l'efecte d'X és més pronunciat després d'L que després de D, mentre que si es compara l'efecte d'X en augmentar la blancor (b), després de D/L l'efecte és superior en D mentre que després

de l'etapa Eop/E és superior en LE, això és degut a que durant l'etapa L es produeixen quinones i grups cromòfors sobre la pasta que són extrets amb una etapa E d'extracció alcalina.

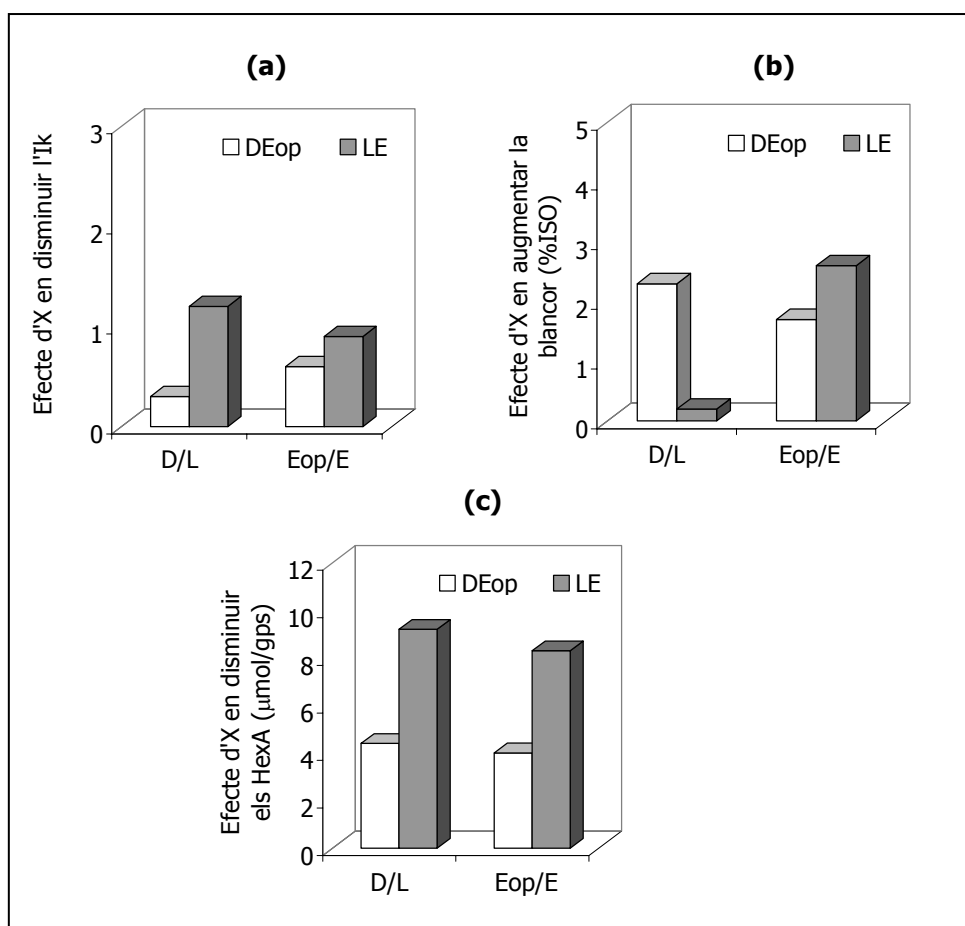


Figura 15-12. Efecte d'X en potenciar la disminució de l'Ik (a), en augmentar la blancor (b) i en potenciar la disminució dels HexA (c) abans d'una etapa amb diòxid de clor (D) i abans d'una etapa de tractament amb el sistema lacasa-mediador (L)

L'efecte d'X en augmentar la disminució dels HexA és també més accentuat durant la seqüència LE que durant la seqüència DEop (c), aquesta disminució dels HexA és la principal responsable de la major disminució de l'Ik ja que el pretractament X potencia l'eliminació d'HexA i no l'eliminació de lignina.

15.4 ÉS POSSIBLE UTILITZAR LA TIROSINASA PER A BLANQUEJAR LA PASTA KRAFT D'EUCALIPTUS?

La tirosinasa és una oxidoreductasa amb varies aplicacions biotecnològiques conegudes (Halaouli *et al.*, 2005 i 2006) però que no s'ha aplicat mai en el blanqueig de pasta de paper. La seva semblança amb la lacasa fa pensar que també sigui capaç d'oxidar la lignina de la pasta. Al capítol 13 s'explica com s'ha dut a terme un estudi preliminar d'aplicació de la tirosinasa sobre la pasta d'eucaliptus. Primerament es produeix suficient quantitat de l'enzim fent créixer el fong *Aspergillus niger* en un fermentador. Seguidament s'avalua la capacitat d'aquesta de deslignificar i blanquejar la pasta kraft d'eucaliptus. Per això es planteja la teoria que la tirosinasa actuï sobre la pasta a través d'un sistema tirosinasa-mediador però no s'aprecien efectes significatius en el blanqueig. D'altra banda, també es planteja la possibilitat que la tirosinasa pugui actuar com un mediador de la lacasa o del sistema lacasa-mediador, i per això s'aplica la tirosinasa en presència d'L-Dopa i de lacasa i NHA. En aquests tractaments es produeixen efectes en disminuir l'Ik i en augmentar la blancor tot i que la formació de quinones dificulta la interpretació dels resultats.

Aquest treball correspon al primer estudi preliminar d'aplicació de tirosinasa en el blanqueig de pasta de paper. Tot i que els resultats no han estat del tot satisfactoris, **sembla que la tirosinasa produeix algun efecte sobre la pasta però cal continuar la recerca provant altres mediadors i/o altres condicions d'aplicació.**

15.5 ÀCIDS HEXENURÒNICS

Com ja s'ha comentat, un dels aspectes a considerar d'aquesta tesi és estudiar com els HexA són afectats tant pels diferents tractament enzimàtics com pels diferents agents de blanqueig degut a la creixent importància d'aquests àcids en els processos de blanqueig (Vuorinen *et al.*, 1996; Elsander *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2000; Sevastyanova *et al.*, 2006; Costa i Colodette, 2007; Forsström *et al.*, 2007). Al llarg d'aquest capítol s'ha anat comentant com els tractaments enzimàtics han afectat en aquests àcids. Al capítol 14 es discuteix detalladament la importància d'aquests i com han estat afectats pels diferents tractaments al llarg de la tesi. A continuació s'exposen les diferents conclusions i els resultats més rellevants que s'han obtingut:

- **Un pretractament enzimàtic amb xilanasa disminueix els HexA de les pastes** degut a que elimina xilans de la superfície de la fibra que contenen HexA, aquest aspecte ha estat confirmat tant per la disminució del

contingut en HexA després d'aquest pretractament com per l'anàlisi dels efluents on apareixen xilans dissolts visibles per cromatografia en capa fina i HexA-xilooligosacàrids als efluents que absorbeixen a 237 nm.

- Un tema important relacionat també amb l'aplicació de les noves xilanases és que tot i que no totes les xilanases són efectives en potenciar el blanqueig, és a dir, en disminuir l'Ik i en augmentar la blancor de les pastes, es demostra que **les quatre xilanases noves utilitzades disminueixen el contingut en HexA** de les pastes degut a l'eliminació de xilans que contenen aquests àcids.
- També es demostra que **un tractament L fa disminuir el contingut en HexA** que és afectat per l'augment de la dosi de lacasa i de mediador i no per l'augment del temps de tractament, i **amb una etapa de pretractament X es "facilita" l'eliminació dels HexA per part del tractament L.**
- Es determina que **10 μmols d'HexA contribueixen en 1,5 unitats a l'índex kappa** en pasta d'eucaliptus, la qual és una contribució lleugerament superior a la trobada per Gellerstedt i Li el 1996.
- El **diòxid de clor és un eficient oxidant dels HexA** i produeix més efecte a la primera etapa D en una seqüència DEopD₁ mentre que **els HexA no queden afectats amb una etapa d'extracció alcalina amb oxigen i peròxid** posterior a l'etapa D. D'altra banda, els HexA disminueixen amb una etapa E posterior al tractament L degut probablement a que **durant l'etapa E posterior a L s'elimina lignina unida a xilans els quals contenen HexA.**
- Els àcids hexenurònics presenten més influència en l'Ik al final d'una seqüència TCF XLE (entre el 55 i el 60%) que al final d'una seqüència ECF XDEopD₁ (20%).
- Degut a la gran influència que presenten els HexA en la mesura de l'índex kappa (fins el 70% en una seqüència LE) és més correcte parlar de **disminució de l'Ik** que deslignificació ja que la "deslignificació real" que es produeix pot ser considerablement superior.

15.6 FUTUR DELS TRACTAMENTS ENZIMÀTICS REALITZATS

15.6.1 Aplicació de xilanases

El tractament amb xilanases és viable industrialment i actualment algunes fàbriques de pasta l'han ja incorporat en les seves seqüències de blanqueig (Bajpai, 2004; Popovici *et al.*, 2004), i a Espanya s'ha realitzat algun assaig a planta (Turner *et al.*, 1992). Un punt a destacar per a l'aplicació industrial de xilanases és que no es necessiten especials mesures de seguretat i que són fàcils d'aplicar en comparació amb altres reactius de blanqueig. En processos industrials, els punts ideals per a l'aplicació de l'etapa de pretractament X són la torre d'stock de pasta després de la deslignificació amb oxigen o la torre de pasta crua.

Com a conclusió de les diferents xilanases noves utilitzades, es pot dir que la xilanasa X_G que ha resultat ser la més efectiva podria ser aplicada industrialment ja que actua de manera comparable a la millor xilanasa comercial.

D'altra banda, resulta també interessant continuar l'estudi amb la xilanasa nova X_J ja que és d'una nova família de xilanases, i els diferents anàlisis realitzats demostren que aquesta xilanasa ha actuat sobre la pasta provocant la hidròlisi del polímer de xilà. Els efectes en potenciar el blanqueig al llarg de les seqüències ECF (XDP i XDEopD1) no són molt significatius però potser és que la seqüència estudiada no ha estat l'adequada. D'una banda, es podria disminuir la dosi de diòxid de clor a la primera etapa D o augmentar la dosi d'enzim aplicada per tal de veure els seus efectes més intensificats; d'altra banda, també es podria aplicar en una seqüència de blanqueig TCF com s'ha fet amb la xilanasa X_G : la xilanasa X_G s'ha aplicat amb el sistema lacasa-mediador en una seqüència TCF XLE i s'ha observat que potencia més l'efecte tant en disminuir l'Ik com en augmentar la blancor i sobretot en disminuir el contingut en HexA de les pastes que amb el diòxid de clor.

15.6.2 Aplicació del sistema lacasa-mediador

Ibarra *et al.*, (2006 (a)) comenten que amb una seqüència TCF amb el sistema lacasa-mediador s'obtenen bones propietats de les pastes i és factible industrialment. Segons les diferents accions que s'han dut a terme per a millorar l'aplicació industrial del sistema lacasa-mediador, es pot dir que per una bona efectivitat del tractament L en el blanqueig de pastes, és preferible aplicar el tractament sobre pasta crua, després d'una etapa de pretractament enzimàtic amb xilanasa i posteriorment realitzar una etapa d'extracció alcalina. Unes bones condicions d'aplicació d'L en una seqüència XLE utilitzant el mediador HBT, són 20 U/gps de lacasa, 0,5 % sps de mediador i 4,6 hores

per obtenir un Ik al voltant de 4 i una blancor del 69%ISO, i amb una viscositat alta. Si s'hi realitza una etapa posterior P es pot assolir una blancor del 90%ISO que és la blancor requerida per la indústria en seqüències de blanqueig TCF. S'ha de tenir en compte que l'estudi de seqüències TCF té gran importància per tal de disminuir la contaminació d'AOX en els efluent produïda en les seqüències ECF degut al diòxid de clor.

D'altra banda, si s'utilitza l'NHA durant el tractament L i a pH 5 serà més factible la reutilització del mediador degut a la reversibilitat de la reacció. Això aportarà un gran benefici en el procés, a més, el mediador NHA és en principi potencialment menys tòxic i més barat que l'HBT.

15.7 REFERÈNCIES

- Amin, H.M. (2006) Extended usage of xylanase enzyme to enhance the bleaching of softwood kraft pulp. *Tappi Journal* 5(1):23-26.
- Aumont, M., Vegega, A., Elm, D.D. i Choma, P.P. (1996) Low kappa factor bleaching of oxygen delignified hardwood kraft pulp - xylanase and peroxide applications. *Pulp & Paper Canada* 97(1):72-76.
- Back, E.L. i Allen, L.H. (2000) *Pitch Control, Wood Resin and Deresination*. TAPPI Press. Atlanta, USA.
- Bajpai, P. (1999) Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology progress* 15 (2):147-157.
- Bajpai, P. (2004) Biological bleaching of chemical pulps. *Critical Reviews in Biotechnology* 24(1):1-58.
- Balakshin, M., Chen, C., Gratzl, J.S., Kirkman, A.G. i Jakob, H. (2001) Biobleaching of pulp with dioxygen in laccase-mediator system—effect of variables on the reaction kinetics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16(3-4):205-215.
- 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., Díaz, P., Zueco, J., Parascandola, P. i Pastor, F.I.J. (1999) A multidomain xylanase from a *Bacillus* sp. with a region homologous to thermostabilizing domains of thermophilic enzymes. *Microbiology* 145:2163-2170.

- 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.
- Bourbonnais, R. i Paice, M. (1995) Enzymatic delignification of krat pulp using laccase and a mediator. *Tappi Journal* 79(5):199-204.
- Bourbonnais, R. and Paice, M.G. (1992) Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonate). *Applied Microbiology and Biotechnology* 36:823-827.
- Call, H.P. i Muecke, I. (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym-process). *Journal of Biotechnology* 53(2):163-202.
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., del Rio, J.C., Gutierrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martinez, M.J. i Martinez, A.T. (2004) Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology* 35(2-3):113-120.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J. i Martínez, A.T. (2005) Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4):1775-1784.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, A.T., Romero, J., Gutierrez, A. i del Rio, Jose C. (2007) Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology* 40:1264-1271.
- Chakar, F.S. i Ragauskas, A.J. (2000) Effects of oxidative alkaline extraction stages after laccase_{HBT} and laccase_{NHAA} treatments-an NMR study of residual lignins. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 20(2):169-184.
- Chakar, F.S. i Ragauskas, A.J. (2001) Formation of quinonoid structures in laccase-mediator reactions. *ACS Symposium Series* 785:444-455.
- 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.
- Collins, T., Gerday, C. i Feller, G. (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews* 29(1):3-23.
- 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.

- Dence, C.W. i Reeve, D.W. (1996) Pulp Bleaching. Principles and Practice. TAPPI Press. Atlanta, USA.
- 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.
- Elsander, A., Ek, M. i Gellerstedt, G. (2000) Oxalic acid formation during ECF and TCF bleaching of kraft pulp. *Tappi Journal* 83 (2):73-77.
- Forsstrom, A., Wackerberg, E., Greschik, T., Jour, P. i Holtinger, L. (2007) Alta estabilidade de alvura em sequencias ECF padrao (High brightness stability in standard ECF sequences). *O Papel (Brazil)* 68(10):101-112.
- Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D. i Pascoal Neto, C. (2003) Oxidized derivatives of lipophilic extractives formed during hardwood kraft pulp bleaching. *Holzforschung* 57(5):503-512.
- Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P. i Evtuguin, D.V. (2006) Effect of oxygen, ozone and hydrogen peroxide bleaching stages on the contents and composition of extractives of *Eucalyptus globulus* kraft pulps. *Bioresource Technology* 97(3):420-428.
- Freudenreich, J., Amann, M., Fritz-Langhals, E. i Stohrer, J. (1998) Understanding the Lignozym- Process. *International Pulp Bleaching Conference* 1:71-76.
- 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. (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.
- 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.
- Gamelas, J.A.F., Pontes, A.S.N., Evtuguin, D.V., Xavier, A.M.R.B. i Esculcas, A.P. (2007) New polyoxometalate-laccase integrated system for kraft pulp delignification. *Biochemical Engineering Journal*, 33(2):141-147.

- Garcia, O., Camarero, S., Colom, J.F., Martinez, A.T., Martinez, M.J., Monje, R. i Vidal, T. (2003) Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* 57(5):513-519.
- Gellerstedt, G. i Li, J. (1996) An HPLC method for the quantitative determination of hexenuronic acid groups in chemical pulps. *Carbohydrate Research* 294:41-45.
- Gutierrez, A., Romero, J. i Del Rio, J.C. (2001) Lipophilic extractives from Eucalyptus globulus pulp during kraft cooking followed by TCF and ECF bleaching. *Holzforschung* 55(3):260-264.
- Gutierrez, A., Del Rio, J.C., Rencoret, J., Ibarra, D. i Martinez, A.T. (2006 (a)) Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase-mediator system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(4):845-851.
- Gutierrez, A., Del Rio, J.C., Ibarra, D., Rencoret, J., Romero, J., Speranza, M., Camarero, S., Martinez, M.J. i Martinez, A.T. (2006 (b)) Enzymatic removal of free and conjugated sterols forming pitch deposits in environmentally sound bleaching of eucalypt paper pulp. *Environmental Science and Technology* 40(10):3416-3422.
- Gutierrez, A., Rencoret, J., Ibarra, D., Molina, S., Camarero, S., Romero, J., Del Rio, J.C. i Martinez, A.T. (2007) Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environmental Science and Technology* 41(11):4124-4129.
- Halaouli, S., Asther, M., Kruus, K., Guo, L., Hamdi, M., Sigoillot, J.C., Asther, M. i Lomascolo, A. (2005) Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *Journal of Applied Microbiology* 98:332-343.
- Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J.-., Hamdi, M. i Lomascolo, A. (2006) Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology* 100:219-232.
- Ibarra, D., Camarero, S., Romero, J., Martinez, M.J. i Martinez, A.T. (2006 (a)) Integrating laccase - Mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine-free bleaching of eucalypt kraft pulp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81(7):1159-1165.
- Ibarra, D., Romero, J., Martinez, M.J., Martinez, A.T. i Camarero, S. (2006 (b)) Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalypt pulp by laccase-mediator. *Enzyme and Microbial Technology* 39(6):1319-1327.
- Jiang, Z., Van Lierop, B. i Berry, R. (2000) Hexenuronic acid groups in pulping and bleaching chemistry. *Tappi Journal* 83 (1):167-175.

- Johannes, C. i Majcherczyk, A. (2000) Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2):524-528.
- Johansson, D. i Germgard, U. (2006) The relationship between xylan and hexenuronic acid in eucalyptus kraft pulping. *O Papel* 67(10):84-91.
- Kantelinen, A., Hortling, B., Sundquist, J., Linko, M. i Viikari, L. (1993) Proposed mechanism of the enzymatic bleaching of kraft pulp with xylanases. *Holzforschung* 47:318-324.
- Kolenova, K., Vrsanska, M. i Biely, P. (2006) Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *Journal of Biotechnology* 121(3):338-345.
- Li, K., Xu, F. i Eriksson, K.E.L. (1999) Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6):2654-2660.
- 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.
- Madlala, A.M., Bissoon, S., Singh, S. i Christov, L. (2001) Xylanase-induced reduction of chlorine dioxide consumption during elemental chlorine-free bleaching of different pulp types. *Biotechnology Letters* 23:345-351.
- 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.
- Paice, M.G., Bourbonnais, R., Reid, I.D., Archibald, F.S. i Jurasek, L. (1995) Oxidative bleaching enzymes: a review. *Journal of Pulp and Paper Science* 21 (8):J280-J284.
- 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.
- Poppius-Levlin, K., Tamminen, T., Kalliola, A. i Ohra-Aho, T. (2001) Characterization of residual lignins in pulps delignified by laccase/N-hydroxyacetanilide. *ACS Symposium Series* 785:358-372.
- Rocheftort, D., Leech, D. i Bourbonnais, R. (2004) Electron transfer mediator systems for bleaching of paper pulp. *Green Chemistry* 6:14-24.
- 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.

- 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. Tesi 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.
- 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.
- Sevastyanova, O., Li, J. i Gellerstedt, G. (2006) Influence of various oxidizable structures on the brightness stability of fully bleached chemical pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 21:49-53.
- Shah, A.K., Cooper, D., Adolphson, R. i Eriksson, K.E.L. (2000) Xylanase treatment of oxygen-bleached hardwood kraft pulp at high temperature and alkaline pH levels gives substantial savings in bleaching chemicals. *Journal of Pulp and Paper Science* 26(1):8-11.
- Shatalov, A.A. i Pereira, H. (2004) Uronic (hexenuronic) acid profile of ethanol-alkali delignification of giant reed *Arundo donax* L. *Cellulose* 11(1):109-117.
- Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Perez-Boada, M., Martinez, M.J., Sigoillot, J.C., Asther, M., Colom, J.F. i Martinez, A.T. (2005) Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal of Biotechnology* 115(4):333-343.
- 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.
- Suurnäkki, A., Tenkanen, M., Buchert, J. i Viikari, L. (1997) Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 57:261-287.

- 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.
- Vicuña, R., Escobar, F., Osses, M. i Jara, A. (1997) Bleaching of eucalyptus Kraft pulp with commercial xylanases. *Biotechnology Letters* 19 (6):575-578.
- 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., Teleman, A., Fagerström, P., Buchert, J. i Tenkanen, M. (1996) Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps. *International Pulp Bleaching Conference*:43-51.
- Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H.J.W., Abbate, E., Galinyte, V. i Schneider, P. (2000) Redox chemistry in laccase-catalysed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (5):2052-2056.
- Xu, F., Deussen, H.J.W., Lopez, B., Lam, L. i Li, K. (2001) Enzymatic and electrochemical oxidation of N-hydroxy compounds. *European Journal of Biochemistry* 268:4169-4176.