

Capítol 16

Conclusions generals

Mitjançant els estudis realitzats a la tesi que ens ocupa, es descobreixen noves xilanases (X) amb activitat potenciadora del blanqueig i es milloren les condicions d'aplicació del sistema lacasa-mediador (L). Un tret de gran rellevància dels diferents tractaments enzimàtics és que poden disminuir el contingut en àcids hexenurònics (HexA) de les pastes. A partir dels resultats dels estudis realitzats al llarg de la tesi s'obtenen diferents conclusions sobre les diferents qüestions analitzades les quals es detallen a continuació.

16.1 APLICACIÓ DE XILANASES (X)

A continuació s'exposen diferents aspectes interessants abans d'avaluar els efectes de les diferents xilanases:

- La seqüència XD és més selectiva que la seqüència XP per a realitzar el primer escrutini de xilanases.
- L'extracte cel·lular en el qual es subministren les xilanases noves no afecta a les propietats de les pastes i per tant no és necessari realitzar el blanc amb aquest extracte.
- Els tractaments que corresponen a la seqüència dels blancs produeixen efectes tant en les propietats de les pastes com dels efluent, la qual cosa fa que sigui necessari sempre comparar els efectes que produeixen les xilanases amb la seqüència del blanc.
- Es determina que el tampó utilitzat per a realitzar l'etapa de pretractament X (fosfat o Tris-HCl) aporta molta DQO als efluent.
- Durant la seqüència completa de blanqueig ECF estudiada (XDEopD₁), els efectes de les xilanases queden atenuats al final de la seqüència després de l'etapa D₁. A més, després de l'etapa Eop s'obtenen bones propietats amb els tractaments amb xilanasa. Això suggereix que es podria suprimir la última etapa D₁ amb el corresponent estalvi de diòxid de clor.

16.1.1 Avaluació de diferents xilanases

S'assagen diferents xilanases per tal de desenvolupar nous enzims amb activitat potenciadora del blanqueig de les pastes d'eucaliptus. S'han avaluat dues xilanases comercials i quatre xilanases noves i a continuació s'exposen les conclusions més importants dels diferents estudis:

- Entre les dues xilanases comercials assajades (X_B i X_C), es demostra que l' X_C és la més efectiva. Al ser aplicada aquesta xilanasa X_C a la seqüència de blanqueig XDEopD₁ es determina que el pretractament X potencia la deslignificació i l'augment de blancor en les següents etapes D i Eop.
- La xilanasa més eficient en potenciar el blanqueig és l' X_G que pertany a la família 11 de les glicosil hidrolases. Aquesta xilanasa potencia el blanqueig de manera perfectament comparable a la millor xilanasa comercial.
- Les xilanases de la família 10 (X_A i X_K) no produeixen efectes en potenciar el blanqueig però han provocat la hidròlisi del polímer de xilà i fan disminuir el contingut en HexA de les pastes el que representa un valor afegit i un tret de gran rellevància per una xilanasa.
- Es demostra per primera vegada l'efectivitat de xilanases de la família 5 (X_J) com a potenciadores del blanqueig.
- Augmentar la dosi enzimàtica potencia els efectes en les propietats de les pastes tant per la xilanasa comercial X_C com per les xilanases noves X_G i X_J .
- Quan les dues xilanases noves X_G i X_J són aplicades conjuntament, els efectes són superiors que els produïts quan són aplicades individualment i s'observa un efecte sinèrgic entre les dues només després de la primera etapa amb diòxid de clor.
- Totes les xilanases utilitzades són específiques de xilans ja que no degraden la cel·lulosa i no fan disminuir la viscositat, el qual representa una característica interessant per una xilanasa ja que no es veuran afectades les propietats finals dels papers.
- El tractament amb xilanasa no deteriora les propietats finals dels papers després del refí i augmenta la fibril·lació de les fibres i provoca la presència de solcs o fenedures a les fibres visibles per SEM. A través d'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...

16.1.2 Efecte de les xilanases sobre els efluentes

Els efectes que es produeixen als efluentes contribueixen a la comprensió de la manera d'actuació de diferents xilanases. A més, els efectes als efluentes van estretament lligats als efectes que s'han produït a les propietats de les pastes. A continuació s'exposen els efectes més importants que el pretractament amb xilanasa provoca als efluentes:

- Durant l'etapa X augmenta la quantitat de xilans dissolts als efluentes visibles per cromatografia en capa fina. D'aquest estudi s'observa que: *i)* diferents xilanases hidrolitzen de diferent manera el polímer de xilà, ja sigui en quantitat com en el tipus de xilooligòmers que apareixen; *ii)* l'alliberació de xilans va estretament lligat en l'efecte d'una xilanasa en potenciar la deslignificació i blanqueig.
- El pretractament amb xilanasa fa augmentar la DQO acumulada dels efluentes però aquest augment es produeix a la mateixa etapa enzimàtica X degut principalment a la dissolució de xilans.
- El color acumulat dels efluentes 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 durant la mateixa etapa enzimàtica.
- Als efluentes de l'etapa de pretractament X de les quatre xilanases noves utilitzades augmenta l'absorbància al voltant de les longituds d'ona de 280, 240 i 205 nm que correspon a lignina i àcids hexenurònics units a xilooligosacàrids. L'augment d'aquests productes està relacionat amb l'efecte posterior d'una determinada xilanasa en potenciar el blanqueig.

16.2 APLICACIÓ DEL SISTEMA LACASA-MEDIADOR (L)

Sobre l'aplicació de lacases amb el conegut sistema lacasa-mediador (tractament L) es plantegen diferents qüestions les quals es mostren a continuació amb les diferents conclusions obtingudes en cada cas.

Per tal de millorar les condicions d'aplicació del tractament L s'ha realitzat un pla estadístic optimitzant les respostes d'Ik i blancor. Les variables del sistema són la dosi

de lacasa, la dosi de mediador i el temps de tractament. Les conclusions més importants són les següents:

- Segons els models d'Ik i blancor, les tres variables influeixen on 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 que menys influeix en tots els models, el que resulta interessant ja que és la que més interessa reduir en el sistema.
- S'observa un efecte generalitzat en funció del temps de tractament en gairebé tots els models en dues fases de comportament: una que va d'1 hora fins a les 3-5 hores i l'altra que va de les 3-5 hores a les 7 hores de tractament
- Durant la seqüència LE, els comportaments observats per 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 el comportament és semblant entre etapes. Es conclou que els HexA són els responsables d'aquestes diferències.
- El punt escollit amb una seqüència L s'obté a 20 U/gps, al 0,5% sps de mediador i a les 6,4 hores, en aquest punt l'Ik és de 6,3 i la 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).
- A la seqüència LE s'escull el punt d'aplicació on s'obté la major blancor i on la dosi de lacasa és alta (20 U/gps), la dosi de mediador baixa (0,5% sps) i el temps de tractament mig (3,4 hores). En aquest punt l'Ik és 5,2 i la blancor del 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.

Seguidament s'ha plantejat si el tractament L depèn de la seqüència de blanqueig on s'aplica i les conclusions més importants són les següents:

- El tractament L funciona millor amb pasta crua i si es realitza a la pasta una etapa de pretractament enzimàtic amb xilanasa (X).

- 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:
- Durant l'etapa L l'Ik disminueix un 25% i conseqüentment també augmenta la blancor un 9%ISO. L'etapa d'extracció alcalina posterior a L fa disminuir l'índex kappa de les pastes un 38% i en fa augmentar la blancor un 13%ISO, degut a que s'extreuen fraccions de lignina que han quedat a la pasta a conseqüència del tractament L.
- 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.

Es planteja també la utilització de mediadors alternatius a l'HBT així com la utilització de la tirosinasa:

- Es demostra que l'NHA és un mediador de la lacasa tant eficient com l'HBT en deslignificar la pasta i presenta l'avantatge de ser més barat i en principi menys contaminant que l'HBT. A més, la seva oxidació és reversible i això representa un avantatge addicional ja que es podrà reutilitzar en el procés.
- S'ha realitzat una recerca de mediadors naturals produïts durant el creixement natural de *P. cinnabarinus* sobre la fusta de pi.
- Es realitza un primer estudi preliminar d'aplicació de tirosinasa en el blanqueig de pasta de paper. Sembla que la tirosinasa produeix algun efecte sobre la pasta però cal continuar la recerca provant altres mediadors i/o altres condicions d'aplicació.

Seguidament s'analitza com afecta el tractament L als àcids hexenurònics de la pasta:

- Els HexA disminueixen entre l'11 i el 35% en les seqüències LE i XLE, i 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.
- 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) mentre que augmentar la dosi de lacasa i de mediador sí que afecta al contingut en HexA de les pastes.

- Les diferències de comportament observades entre l'índex kappa i la blancor segons els models d'una mateixa seqüència i també entre les dues seqüències LE i XLE són degudes als HexA de les pastes. Aquests presenten gran influència a l'Ik i s'eliminen diferent depenent de les condicions d'L i de l'etapa de pretractament X. A més, l'augment de blancor està lligat principalment amb la disminució de la lignina.

A continuació es resumeixen els efectes que el tractament L ha produït sobre la lignina, la viscositat i sobre els esterols de la pasta:

- La "deslignificació real" que es produeix durant una seqüència LE arriba fins el 71%. El tractament L oxida la lignina i produeix una "deslignificació real" que depèn de les condicions d'aplicació d'L i que pot arribar fins el 47%, mentre que l'etapa E posterior a L també produeix "deslignificació real" que arriba fins el 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.
- La degradació de la lignina de la pasta arriba un punt que s'estabilitza al augmentar les variables del tractament L.
- Després de l'etapa L la viscositat disminueix lleugerament depenent de les condicions d'aplicació.
- 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 de pastes i papers amb la corresponent reducció dels costos.
- La disminució dels esterols depèn principalment del temps de tractament seguit de la dosi de lacasa. La dosi de mediador només influeix sobre els esterols a temps curts.
- El temps de tractament té una influència en dues fases sobre els esterols de la pasta, una que va d'1 a 5 hores i l'altra de 5 a 7 hores.

Es qüestiona com el pretractament enzimàtic amb xilanasa potencia l'efecte del tractament L i les conclusions que s'han obtingut són les següents:

- Les pastes XLE obtingudes presenten un Ik 1 unitat inferior, una blancor fins al 6%ISO superior i el contingut en HexA és de 10 µmol/gps inferior a les pastes LE, mentre que l'Ik_{ig} és semblant entre seqüències

- Tot el sistema lacasa-mediador penetra millor al interior de la fibra i actua més eficientment després d'haver-ne eliminat els xilans amb una etapa de pretractament X.
- 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 Ik en les pastes XLE.
- 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 degut al menor contingut en àcids hexenurònics.

A continuació es planteja si el tractament L és comparable a realitzar una etapa amb diòxid de clor (D):

- 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 ja que durant la seqüència LE, es pot disminuir l'Ik fins al 43% i augmentar la blancor fins un 26%.
- Durant 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%).
- El pretractament enzimàtic amb xilanasa potencia més l'efecte d'una etapa L que d'una etapa D tant en disminuir l'Ik com en augmentar la blancor com en disminuir els HexA.

16.3 ÀCIDS HEXENURÒNICS (HEXA)

A continuació s'exposen les conclusions més rellevants que s'han obtingut de l'evolució dels HexA al llarg dels diferents tractaments:

- 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.
- Els HexA-xilooligosacàrids que passen als efluent durant l'etapa X absorbeixen 237 nm i representen un mètode ràpid per avaluar l'acció d'una xilanasa.

- Un tractament L fa disminuir lleugerament 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. Amb una etapa de pretractament X es "facilita" l'eliminació dels HexA per part del tractament L.
- Es determina que 10 μ mols 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 per altres pastes.
- El diòxid de clor és un eficient oxidant dels HexA 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 s'extreu lignina unida a xilans els quals contenen HexA.
- Els àcids hexenurònics presenten més influència al final d'una seqüència TCF XLE (entre el 55 i el 60%) que al final d'una seqüència ECF XDEopD₁ (20%).

16.4 CONCLUSIONS FINALS

Mitjançant la tesi que ens ocupa, s'ha aconseguit trobar una xilanasa nova que potencia el blanqueig de manera equivalent a la millor xilanasa comercial i com a fets de gran rellevància sobre l'aplicació de xilanasas és que es demostra l'efectivitat de la xilanasa de la família 5 per a potenciar el blanqueig i que les quatre xilanasas noves utilitzades contribueixen a disminuir els HexA de les pastes.

S'han millorat les condicions d'aplicació del sistema lacasa-mediador reduint la dosi de mediador HBT, i es demostra que el pretractament X facilita l'acció del tractament L en eliminar HexA. D'altra banda, es demostra que la utilització de l'NHA és molt prometedora. A través dels diferents anàlisis sobre les pastes (HexA, $I_{k_{ig}}$, viscositat, esterols) i de la mesura dels resultats després de la mateixa etapa L s'ha permès augmentar els coneixements sobre com actua el sistema lacasa-mediador.

L'interès i els beneficis d'aquest projecte consisteixen en:

- ❖ La utilització de pasta d'eucaliptus com a matèria prima
- ❖ El descobriment de noves xilanasas amb activitat potenciadora del blanqueig
- ❖ La millor comprensió dels mecanismes d'actuació de diferents xilanasas

- ❖ La millora de les condicions d'aplicació del sistema lacasa-mediador
- ❖ La millor comprensió de l'efecte del tractament L sobre les diferents propietats de les pastes
- ❖ L'eliminació d'HexA durant diferents tractaments enzimàtics