

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA
BARCELONATECH**

Programa de Doctorat d'Enginyeria Tèxtil i Paperera

**Blanqueig enzimàtic de pasta de kenaf
emprant sistemes lacasa-mediador**

Tesi Doctoral

Maria Gloria Andreu Terren

Terrassa, 2013

La Doctora TERESA VIDAL LLUCIÀ, Catedràtica d'Universitat del Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera de la Universitat Politècnica de Catalunya

CERTIFICA:

Que **Maria Gloria Andreu Terren**, Llicenciada en Químiques, ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació titulat "*Blanqueig enzimàtic de pasta de kenaf emprant sistemes lacasa-mediador*" que presenta per optar al grau de Doctor

I perquè així consti, expedeix el present certificat a Terrassa a ...

Teresa Vidal Lluçia
Catedràtica d'Universitat
Universitat Politècnica de Catalunya

“Nunca es tarde si la dicha es buena” ...

dita castellana que indica que qualsevol moment es bo per començar allò que ens pot aportar plaer o millora.

Agraïments

El treball de tesi doctoral ha estat un llarg camí, no ha sigut fàcil fer-ho compatible amb la docència i trobar el temps per posar-s'hi. En aquest punt, moltes són les persones i institucions gràcies a les quals aquesta recerca ha estat possible i, a les que vull expressar el meu agraïment.

Al Grup de Recerca Paperer i Gràfic (CIPAGRAF), del Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeries Industrial i Aeronàutica de Terrassa, per donar-me l'oportunitat de dur a terme aquest treball de tesi al seu laboratori.

A la meva directora de tesi, la Dra. Teresa Vidal, pels seus consells, reflexions, coneixements i aportacions científiques que m'han guiat durant la realització de la tesi.

A la Teresa Vidal, pel seu proselitisme de passadís que finalment va donar fruit i el seu optimisme contagiós que fa veure el final a prop.

Molts anys, molts noms (per rigorós ordre d'aparició) : Ursula - Cristina, Edith, Jordi - Amanda - Elisabetta i finalment, Elisabet - Oriol - Facundo, moltes gràcies per la vostra particular i constant ajuda i sobre tot per fer-me sentir una doctoranda més, ha estat una experiència fantàstica i irreplicable.

Al Dr. Josep F. Colom, pels seus constants ànims i respostes als meus dubtes terminològics paperers.

A la Blanca i en Toni per compartir bons moments paperers i la nostra particular teràpia (English class).

A l'Antonio Clemente i l'Adrián Oliva, per trobar sempre la vostra ajuda al laboratori.

A la Maria, pel seu ajut i disponibilitat en tots els tràmits i gestions.

Al Carlos Vila per punxar les mostres i fer el tractament de dades.

Al Dr. Agustín Garcia Barneto, de la "Universidad de Huelva" per l'anàlisi termogravimètrica.

A les empreses CELESA, i Novozymes per subministrar la pasta de kenaf, i els enzims necessaris per la realització de la tesi. A l'INRA (Marsella) per la lacasa de *Pycnopus cinnabarinus*.

...

Un particular agraïment a la Xita, la Pilar i en Torrades pel seu regal d'un semestre sabàtic i per compartir des de ja fa tant de temps el dia a dia docent.

...

Als meus fills, en Martí i l'Arnau, pel seu incondicional suport i per ser com són.

A en Josep, per la seva infinita ∞ ajuda, has estat sempre ... gràcies.

Terrassa, gener 2013

Nomenclatura

ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonat), mediador
AS	Acetosiringona, mediador
AV	Acetovainillona, mediador
DBO	Demanda Biològica d'Oxigen
DQO	Demanda Química d'Oxigen
C*	Chroma, paràmetre òptic
E	Etapa d'extracció alcalina
ECF	Seqüència de blanqueig lliure de clor elemental
E_{Homo}	Energia orbitals moleculars
G	Unitat guaiacil
g.p.s.	Referit a pes sobre pasta seca
H	p-hidroxifenilpropà
HexA	Àcids hexenurònics
HBT	1-hidroxibenzotriazol, mediador
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
k/s	Índex de refracció segons Teoria de Kubelka- Munk
KL	Lignina de Klason
$L^*a^*b^*$	Coordenades cromàtiques
L	Tractament enzimàtic
LMS	Tractament amb el sistema lacasa-mediador
LP	Tractament enzimàtic i posterior etapa de blanqueig amb peròxid d'hidrogen
Lsox	Tractament enzimàtic amb posterior extracció amb acetona
LsoxP	Tractament enzimàtic-extracció acetona i peròxid d'hidrogen
NHA	N-hidroxiacetalinilida, mediador
NK	Número kappa

NK _{HexA}	Número kappa degut als àcids henenuroònics
NK _{lig}	Número kappa degut a la lignina
NK _{”nolig”}	Número kappa degut a estructures minoritàries
Op	Etapa de deslignificació amb oxigen i peròxid d’hidrogen
ORP	Potencial d’oxidació-reducció
P	Etapa de blanqueig amb peròxid d’hidrogen
PcL	Lacasa de <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
PDA	Percentatge de disminució d’àrea de la corba k/s
Po	Etapa de blanqueig amb peròxid d’hidrogen pressuritzat
PC	Àcid p-cumàric, mediador
Q	Etapa quelant
R _∞	Reflectància intrínseca
R ₄₅₇	Reflectància intrínseca mesurada a 457 nm
S	Unitat siringil
SA	Siringaldehid, mediador
SEM	Microscòpia electrònica d’escombrat
TCF	Seqüència de blanqueig totalment lliure de clor
TG	Corbes termogramimètriques
TvL	Lacasa de <i>Trametes villosa</i>
V	Vainillina, mediador
VA	Àcid vilúric, mediador
Wa	Rentat àcid
X	Etapa enzimàtica amb xilanasa

ÍNDIX

Resum	R-1
Capítol 1. Antecedents, Introducció i Objectiu	
1.1. Matèries primes en la fabricació de paper	1-4
1.1.1. Estructura i composició de la lignocel·lulosa	1-4
1.1.2. Fibres no fusteres	1-9
1.1.3. Kenaf	1-11
1.2. Producció de pasta i paper	1-13
1.3. Blanqueig de la pasta	1-15
1.3.1. Bioblanqueig : Utilització de lacases	1-17
1.4. Objectiu	1-20
1.5. Bibliografia	1-23
Capítol 2. Materials i Mètodes	
2.1. Matèria prima	2-1
2.2. Enzims	2-2
2.2.1. Lacases	2-2
2.2.1.1. Mediadors	2-2
2.2.2. Xilanases	2-2
2.3. Tractaments enzimàtics (Etapa L)	2-3
2.3.1. Tractament amb xilanasa (Etapa X)	2-4
2.4. Extracció alcalina (Etapa E)	2-4
2.5. Seqüències de blanqueig	2-5
2.5.1. Etapa quelant (Etapa Q)	2-5
2.5.2. Tractament amb peròxid d'hidrogen (Etapas P i Po)	2-6
2.5.3. Rentat àcid (Wa)	2-6
2.6. Extracció amb Soxhlet	2-7

2.7. Caracterització de la pasta	2-7
2.7.1. Propietats òptiques	2-7
2.7.1.1. Corbes de reflectància	2-8
2.7.1.2. Índex k/s i percentatge de disminució d'àrea (PDA)	2-8
2.7.1.3. Coordenades cromàtiques	2-9
2.7.2. Àcids hexenurònics	2-10
2.7.3. Anàlisi de sucres i lignina de Klason	2-10
2.7.4. Classificació de fibres	2-11
2.7.5. Microscòpia electrònica d'escombrat (SEM)	2-11
2.8. Anàlisi per termogravimetria	2-12
2.9. Caracterització d'efluents	2-12
2.9.1. Demanda Química d'Oxigen i color	2-12
2.9.2. Toxicitat	2-12
2.10. Característiques del kenaf	2-12
2.11. Bibliografia	2-17
Capítol 3. Efectes de l'aplicació del sistema lacasa-mediador natural en la pasta de kenaf	
3.1 Introducció	3-2
3.2 Materials i mètodes	3-2
3.3 Resultats i discussió	3-4
3.3.1 Efectes de les etapes L i E	3-6
3.3.2 Efecte dels mediadors en l'etapa enzimàtica (Etapa L)	3-8
3.3.3 Influència del peròxid d'hidrogen (Etapa P)	3-10
3.3.4 Dosificació del mediador i caracterització d'efluents	3-12
3.4 Conclusions	3-14
3.5 Bibliografia	3-14
Capítol 4. Capacitat oxidativa del sistema lacasa-mediador: Paper dels mediadors	
4.1. Introducció	4-2

4.2. Materials i mètodes	4-3
4.2.1. Càlcul de les energies dels orbitals moleculars (E_{Homo})	4-4
4.3. Resultats i discussió	4-4
4.3.1. Potencial d'oxidació-reducció de les dissolucions de lacasa amb els compostos fenòlics	4-4
4.3.2. Potencial d'oxidació-reducció del sistema lacasa-mediador en presència de pasta de kenaf	4-8
4.3.3. Procés de bioblanqueig : Número kappa i blancor	4-11
4.4. Conclusions	4-12
4.5. Bibliografia	4-13
Capítol 5. Nova seqüència de blanqueig: Constatació de la rellevància del mediador i anàlisi termogravimètrica	
5.1 Introducció	5-2
5.2 Materials i mètodes	5-3
5.3 Resultats i discussió	5-4
5.3.1 Efectes de la naturalesa del mediador en l'etapa enzimàtica	5-4
5.3.2 Blanqueig amb peròxid d'hidrogen (Etapa P)	5-9
5.3.3 Efecte de la seqüència en la viscositat de la pasta	5-11
5.3.4 Resultats i discussió de l'anàlisi termogravimètrica	5-13
5.3.4.1 Efecte de l'aplicació del sistema lacasa i lacasa-HBT en la degradació tèrmica de la pasta de kenaf	5-13
5.3.4.2 Efecte de l'aplicació del sistema lacasa-mediador en la degradació tèrmica de la pasta de kenaf	5-15
5.4 Conclusions	5-17
5.5 Bibliografia	5-18
Capítol 6. Millora de l'etapa de blanqueig químic: Seqüència LQPoWa. Influència dels àcids hexenurònics: Seqüència LXP	
6.1 Introducció	6-2

6.2	Material i mètodes	6-4
6.2.1	Determinació del contingut d'àcids hexenurònics	6-5
6.2.2	Determinació de l'actuació de les xilanases	6-5
6.2.2.1	Cromatografia de capa fina	6-6
6.2.3	Propietats de la pasta	6-6
6.3	Resultats de l'aplicació de la seqüència LQPoWa	6-7
6.3.1	Efecte en el número kappa i la blancor	6-7
6.3.2	Efecte en les propietats òptiques de la pasta	6-9
6.3.3	Efecte en la viscositat de la pasta	6-12
6.3.4	Efecte del tractament en la morfologia de les fibres	6-13
6.3.5	Caracterització dels efluent	6-14
6.3.6	Millora de l'etapa de blanqueig	6-15
6.4	Influència dels àcids hexenurònics	6-15
6.5	Aplicació de la seqüència LXP	6-20
6.5.1	Resultats i discussió	6-21
6.5.1.1	Efecte del tractament amb xilanasa en el contingut d'HexA de la pasta de kenaf	6-21
6.5.1.2	Efecte de la xilanasa en la morfologia de les fibres	6-24
6.5.1.3	Comparació dels tractaments 4 ₄ LQPoWa i 4 ₄ LXP	6-25
6.6	Conclusions	6-29
6.7	Bibliografia	6-30
Capítol 7. Consideracions generals, conclusions i perspectives de futur		
	Consideracions generals, conclusions i perspectives de futur	7-1
	Bibliografia General	B-1
	Normativa	Nt-1

RESUM

La present tesi s'emmarca dins d'una de les línies del Grup de Recerca Paperer i Gràfic (CIPAGRAF), del Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeries Industrial i Aeronàutica de Terrassa, encaminada a l'aplicació de la Biotecnologia per desenvolupar nous sistemes enzimàtics per al blanqueig de pastes i modificació de fibres cel·lulòsiques.

La implantació d'etapes enzimàtiques en les seqüències de blanqueig de pasta de paper a nivell industrial continua essent, avui en dia, un dels principals reptes en el camp de la investigació paperera. La reducció de l'impacte ambiental, l'optimització de costos, així com el desenvolupament de productes paperers amb propietats noves i millorades, justifiquen l'estudi de noves seqüències enzimàtiques basades en l'aplicació de sistemes lacasa-mediador. La utilització d'una matèria prima renovable, el kenaf, està en sintonia amb el creixent interès de l'ús de fibres no fusteres per a l'obtenció de nous productes lignocel·lulòsics d'alt valor afegit.

Així doncs, aquesta tesi es fonamenta en l'ús d'enzims per a blanquejar pasta de kenaf. Les seqüències de blanqueig enzimàtic estudiades consten de diferents tractaments amb el sistema lacasa-mediador (Etapa L). Les lacases utilitzades en aquesta etapa provenen dels fongs *Pycnoporus cinnabarinus* i *Trametes villosa*, les quals s'apliquen amb diferents mediadors naturals (compostos fenòlics derivats de la lignina) i amb un mediador sintètic. L'etapa enzimàtica es completa amb diferents etapes de blanqueig químic (quelant, peròxid d'hidrogen i peròxid d'hidrogen pressuritzat).

Al final de les seqüències s'obtenen, en funció del mediador utilitzat en l'etapa enzimàtica, fibres de kenaf amb un alt contingut de cel·lulosa i altes blancors. En aquest sentit, en el transcurs de l'experimentació s'ha constatat la importància de la naturalesa química del mediador, ja que els diferents radicals fenoxi formats en l'etapa enzimàtica determinen la capacitat oxidativa del sistema lacasa-mediador.

Per altra banda, els resultats obtinguts remarquen el paper de la composició química de la lignina de kenaf en el procés enzimàtic. La capacitat oxidativa de la lacasa augmenta

en presència de pasta de kenaf i la quantitat d'àcids hexenurònics presents en la mateixa limita el grau de blancor assolit en els diferents tractaments, encara que el resultat final es semblant o superior a una pasta TCF convencional. L'aplicació de xilanases després de l'etapa enzimàtica lacasa-mediador es mostra efectiva en l'eliminació d'aquests àcids, essent una possible via de millora als tractaments proposats en la present tesi.

SUMMARY

The present thesis has been performed in the research group CIPAGRAF (Grup de Recerca Paperer i Gràfic) of the Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera at the Escola Tècnica Superior d'Enginyeries Industrial i Aeronàutica de Terrassa. One of the research topics of the group is the application of enzymes in pulp biobleaching processes and in the modification of cellulosic fibers.

The implementation of enzymatic stages in paper pulp bleaching sequences is, at present, one of the main challenges of the research in the paper industry. The application of laccase-mediator systems can lead to a reduction of environmental impact and to cost optimization, as well as to the development of paper-derived products with novel and improved properties. The use of a renewable raw material - kenaf- is in accordance with the growing interest in the utilization of non-wood fibers for the production of new high-added value lignocellulosic products. Consequently, the present thesis is based on the use of enzymes for kenaf pulp bleaching.

The enzymatic bleaching sequences studied involve different treatments with the laccase-mediator system (Stage L). The two fungal enzymes used in this stage- *Pycnoporus cinnabarinus* and *Trametes villosa* laccases- have been assisted by different natural mediators (lignin-derived phenolic compounds) and a synthetic one. The enzymatic stage has been completed with different chemical bleaching stages (chelating, hydrogen peroxide and pressurized hydrogen peroxide).

At the end of the sequences, kenaf fibers with high cellulose levels and brightness were obtained. The significance of the chemical nature of the mediator has been emphasized because the different phenoxy radicals formed in the enzymatic stage determine the oxidative capacity of the laccase-mediator system.

In addition, the results obtained also show the role of the chemical composition of kenaf lignin in the enzymatic process. The laccase oxidative capacity increases in the presence of kenaf pulp, and the amount of hexenuronic acids present limits the degree of brightness. Nevertheless, for the enzymatic treatments, the final results are similar to

or better than for a conventional chlorine-free treatment. The application of xylanases after the laccase-mediator stage has been shown to be efficient in hexenuronic acids removal, opening possible new improvements to the treatments reported in this work.

Capítol 1

ANTECEDENTS, INTRODUCCIÓ I OBJECTIU

L'interès per l'aplicació de la Biotecnologia en els processos de fabricació de pasta i paper respon a la necessitat de la indústria paperera tant d'adequar-se a les normatives ambientals vigents, com al fet d'obrir noves perspectives en el seu desenvolupament present i futur. L'aplicació de la biotecnologia en el processos paperers ha comportat a hores d'ara resultats destacables tals com: millora de la qualitat i propietats dels productes, reducció de costos de producció i desenvolupament de nous processos productius respectuosos amb el medi ambient.

L'aparició en el mercat de productes tals com les pastes ECF (Elemental Chlorine Free) i les pastes TCF (Totally Chlorine Free) han sigut mostres concretes de les innovacions realitzades per la indústria paperera. Aquestes innovacions, parlant a nivell de planta de blanqueig, varen comportar l'eliminació dels compostos organoclorats derivats de la utilització de clor i un major ús de la deslignificació amb oxigen, peròxid d'hidrogen i ozó (van Lierop et al., 1996).

És en el blanqueig de pasta de paper que la utilització de la biotecnologia ha presentat resultats de gran interès a nivell industrial. L'ús de xilanases va determinar una important millora tecnològica: el seu ús potencia l'efecte blanquejant dels agents químics, permet un estalvi dels mateixos i disminueix notablement la generació de contaminants en el procés (Roncero et al., 2005; Amin, 2006).

Capítol 1

La utilització de lacases a través del sistema lacasa-mediador (LMS) ha constituït un nou plantejament en el blanqueig de pastes químiques: el sistema lacasa-mediador actua directament sobre la lignina de la pasta, permet desenvolupar seqüències de blanqueig TCF, substituir l'etapa de deslignificació amb oxigen o ozó, estalviar reactius, blanquejar i reduir el número kappa de la pasta (Bajpai et al., 2004).

L'1-hidroxibenzotriazol (HBT), l'àcid vilúric (VA) i la N-hidroxiacetanilida (NHA), tres compostos tipus N-OH, han sigut àmpliament investigats com mediadors (sintètics) en el blanqueig de diferents tipus de pasta a escala de laboratori (Moldes i Vidal, 2008; Fillat i Roncero, 2009a; Valls et al. 2010; Fillat et al, 2011). Aquests mediadors són eficients però tenen un cost elevat (Widsten i Kandelbauer, 2008). Per aquest motiu, s'investiga la utilització de nous mediadors amb millor relació cost-efectivitat.

Aquest fet, juntament amb la possible toxicitat, ha portat a la recerca de mediadors alternatius, els anomenats genèricament mediadors naturals. Aquests mediadors de la lacasa són compostos produïts durant la biodegradació de la lignocel·lulosa o en el metabolisme secundari dels fongs (Camarero et al., 2005; Nousiainen et al., 2009). Són compostos derivats dels tres tipus d'unitats fenil propà que componen el polímer de la lignina: unitats p-hidroxifenil, guaiacil i siringil. La relació cost-efectivitat d'aquets mediadors que es poden obtenir a partir de plantes (degradació de la lignina), licors de pastejat o com subproductes industrials va ser investigada per Camarero et al. 2007.

A continuació es presenten algunes aplicacions industrials de la lacasa, escollides entre les referenciades per Widsten i Kandelbauer, 2008, tot destacant les millores aportades en el procés corresponent. Així, el "biopulping" redueix energia en el refinatge (Burto, 2001) i millora els problemes de "pitch" (van Beek et al. 2007); el tractament enzimàtic (LMS) augmenta la resistència del paper (Chandra et al. 2004), incorpora propietats antimicrobianes (Schröder et al. 2007) i obra la via a nous productes industrials en base al biografting (incorporació de compostos de baix pes molecular a la lignina) (Grönqvist et al. 2006). El destintat (Hager et al. 2002) i la reducció de la càrrega contaminant dels efluent són també exemples de millores

aportades per l'aplicació de la lacasa en la manufactura del paper (Widsten et al. 2004).

Des d'una perspectiva mediambiental existeix en l'actualitat un interès renovat per la utilització de plantes no fusteres com matèria prima per la fabricació de pasta de paper. De fet, la desigual distribució dels recursos fusters al nostre planeta fa que cada regió utilitzi, com a matèria prima per la producció de paper, la que li és més afí i propera. Les matèries primes no fusteres són la principal font de fibres per la fabricació de paper en països en vies de desenvolupament, on les reserves de fusta són escasses o poc disponibles (Índia, Xina,...). En els països desenvolupats, la fusta continua essent la base en la fabricació de paper, però les possibilitats que proporcionen aquestes matèries no fusteres ha desenvolupat un mercat exitós en la manufactura de papers de gran qualitat (Moore, 1996). Entre aquestes fibres no fusteres utilitzades per la fabricació de paper es poden anomenar entre moltes altres, el lli, el sisal i el kenaf. Recerques recents han demostrat un augment de blancor, reducció del número kappa i millora de les propietats, després de l'aplicació del sistema lacasa-mediador, en pastes de lli (Fillat, 2011) i sisal (Aracri, 2012).

La present tesi sorgeix de la decidida aposta feta pel Grup de Recerca Paperer i Gràfic (CIPAGRAF), del Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeries Industrial i Aeronàutica de Terrassa, de treballar per la implantació de processos biotecnològics en la indústria paperera. Així l'aplicació del sistema lacasa-mediador com eina biotecnològica en el tractament de matèries primes no fusteres que comporti processos sostenibles de manufactura de paper amb propietats renovades està en la filosofia d'aquest treball.

Capítol 1

1.1 Matèries primes en la fabricació de paper

La primera producció de paper, tal com la entenem actualment, està datada a la Xina cap al 105 a.C. El perfeccionament de les tècniques de producció va fer que cada vegada s'aprofitessin més tipus de fibres, el "koko", l'escorça de morera i el bambú (McGinnis i Shafizadez, 1981). La fabricació i ús del paper s'estengué arreu, però durant segles fou un luxe a l'abast de només uns pocs. Finalment, al segle XIX, les màquines papereres a vapor van fer possible fabricar paper amb fibra de pasta de fusta. A partir d'aleshores, la producció industrial del paper tingué dues conseqüències : la universalització de l'accés al paper (alfabetització, llegir el diari, escriure cartes, ...) i l'augment de la pressió sobre els boscos. Des d'aleshores, a Occident paper i arbres van indissolublement units.

1.1.1 Estructura i composició de la lignocel·lulosa

La fusta és el més abundant dels materials lignocel·lulòsics, la seva estructura i composició varia considerablement entre les diferents espècies, fins i tot entre fibres de parets d'un mateix vegetal. La paret cel·lular presenta una estructura complexa i semirígida constituïda per un entramat de microfibril·les cristal·lines de cel·lulosa recobertes d'hemicel·lulosa i lignina. A la paret cel·lular es distingeixen dues zones : la paret primària (P) i la secundària constituïda per tres capes (S1, S2 i S3) que difereixen en l'orientació de les microfibril·les. Les parets primàries de dues cèl·lules adjacents estan unides per lignina, aquesta capa s'anomena làmina mitja (ML).

Els polisacàrids cel·lulosa i hemicel·lulosa són els components majoritaris de les parets vegetals. Aquestes contenen també proteïnes, lípids, minerals i en els últims estats de desenvolupament del vegetal una gran quantitat de lignina (Fengel i Wegener, 1989).

La Figura 1.1, presenta el detall de l'estructura de la paret cel·lulòsica segons la representació de Kirk i Kullen, 1998.

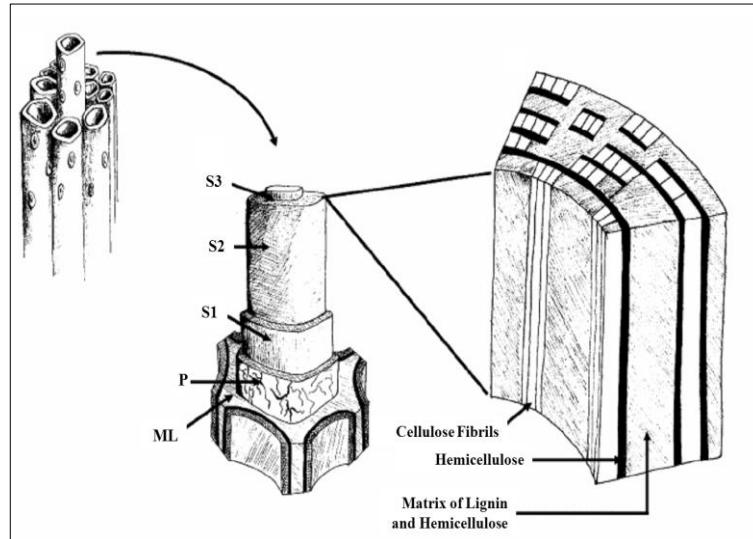


Figura 1.1. Estructura de la paret de les fibres lignocel·lulòsiques (Kirk i Kullen, 1998).

La cel·lulosa és el component majoritari en els materials lignocel·lulòsics, determina la naturalesa de les fibres i la seva utilització en la manufactura de paper. És un polímer lineal format per unitats de glucopiranosas unides per enllaços glucosídics β -1,4, essent la cel·lobiosa la unitat repetitiva (Figura 1.2)

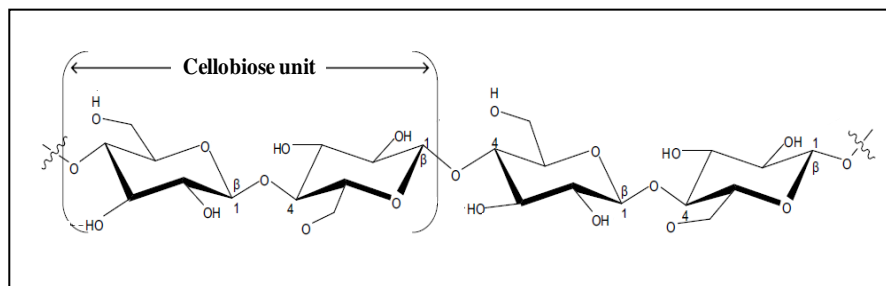


Figura 1.2. Molècula de cel·lobiosa a la cadena de cel·lulosa

El grau de polimerització de la cel·lulosa depèn de l'espècie vegetal i dels tractaments als quals s'hagi sotmès la matèria prima (Klemm et al. 2005). Les molècules de cel·lulosa presenten en la seva estructura enllaços intra i intermoleculars. Les cadenes ordenades de cel·lulosa (per acció dels enllaços d'hidrogen intermoleculars) s'agrupen

Capítol 1

al llarg de les microfibril·les formant zones cristal·lines contraposades a les zones amorfes on les cadenes cel·lulòsiques continuen mantenint un cert grau de desordre. Les zones cristal·lines confereixen resistència, mecànica o química, a les fibres. Les propietats de la fibra, tals com la resistència a la tracció o capacitat d'estirament depenen del grau de polimerització i disminueixen amb la degradació de les cadenes cel·lulòsiques (Clark 1978). En contraposició, les zones amorfes són més accessibles i sensibles a qualsevol tipus de reacció química, facilitant la hidratació, l'inflat i l'allargament de les fibres (García Hortal 2007b).

Les hemicel·luloses són polisacàrids ramificats formats, a diferència de la cel·lulosa, per diferents tipus de sucres. Les hemicel·luloses actuen juntament amb la lignina com matriu de suport per les microfibril·les de la cel·lulosa a la paret cel·lular. Són amorfes amb un rang de grau de polimerització entre 50 - 300 (Sears et al. 1978), fàcilment hidrolitzables en medi àcid i solubles en medi alcalí (Eklund i Lindström, 1991). Degut a aquest caràcter hidrofílic tenen gran capacitat d'adsorció d'aigua durant el refinat de polpa, millorant les propietats mecàniques que depenen dels enllaços entre les fibres.

A diferència de la cel·lulosa, les hemicel·luloses presenten una considerable variació entre les diferents classes de fusta (García Hortal, 2007 b). Les frondoses tenen principalment hemicel·luloses amb unitats de cinc carbonis (xilosa i arabinosa) i en les coníferes són més abundants les hemicel·luloses amb unitats de sis carbonis (glucosa, manosa i galactosa). En les plantes no fusteres, les hemicel·luloses tenen una composició encara molt més variable en funció de l'espècie concreta considerada; els sucres dominants en el lli i el cànem són la manosa i la galactosa, i la xilosa ho és en el kenaf i el sisal (Marques et al. 2010).

La lignina dona suport estructural als teixits de les plantes, impermeabilitat als elements vasculars, resistència en front als microorganismes i a l'estrès mecànic. Químicament es tracta d'un polímer aromàtic format per la condensació oxidativa de tres precursors fenòlics: alcohols p-cumàrilic, coniferílic i sinapílic (Figura 1.3). El polímer (molt ramificat, tridimensional i amorf) actua com material incrustant entre la làmina mitja i les parets de la fibra (Figura 1.1). Dels tres compostos representats a la

Figura 1.3., deriven respectivament les tres unitats monomèriques de la lignina: 4-hidroxifenilpropà (H), guaiacilpropà (G) i siringilpropà (S).

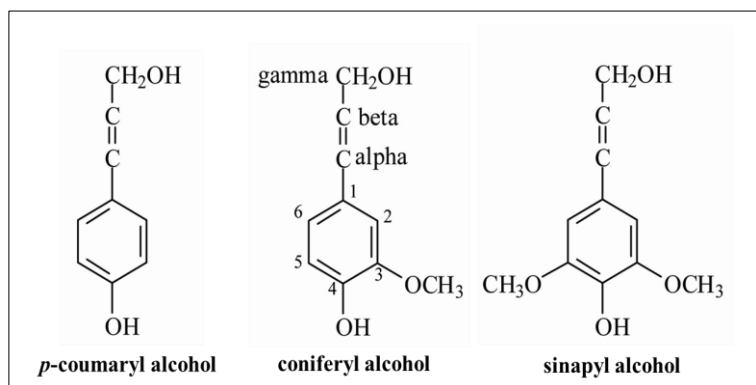


Figura 1.3. Fenilpropans precursors de la lignina (Sjöstrom, 1981)

La Figura 1.4 mostra els diferents tipus d'unió que contribueixen a la formació del polímer de la lignina.

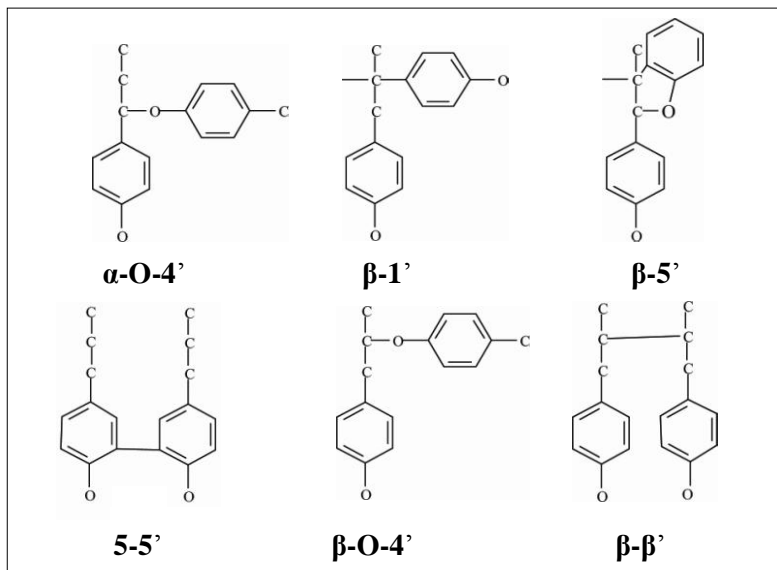


Figura 1.4. Unions en la lignina (Sjöstrom ,1981)

La quantitat de lignina i distribució a través de les parets cel·lulars difereix segons els orígens, essent el seu percentatge major en les coníferes que en les frondoses. La unitat

Capítol 1

monomèrica bàsica de la lignina també difereix entre coníferes i frondoses. En les coníferes el monòmer predominant és el guaiacil (G), i en les frondoses la lignina és un mescla entre guaiacil i siringil (S) (Parham, 1983; Higuchi, 1985). La lignina en les fibres no fusteres varia considerablement en funció de l'espècie i es construeix a partir del monòmer de p-hidroxifenil (H) més unitats S i G en proporcions variables.

A la Figura 1.5 es mostra la complexitat de l'estructura de la lignina d'una fusta de conífera

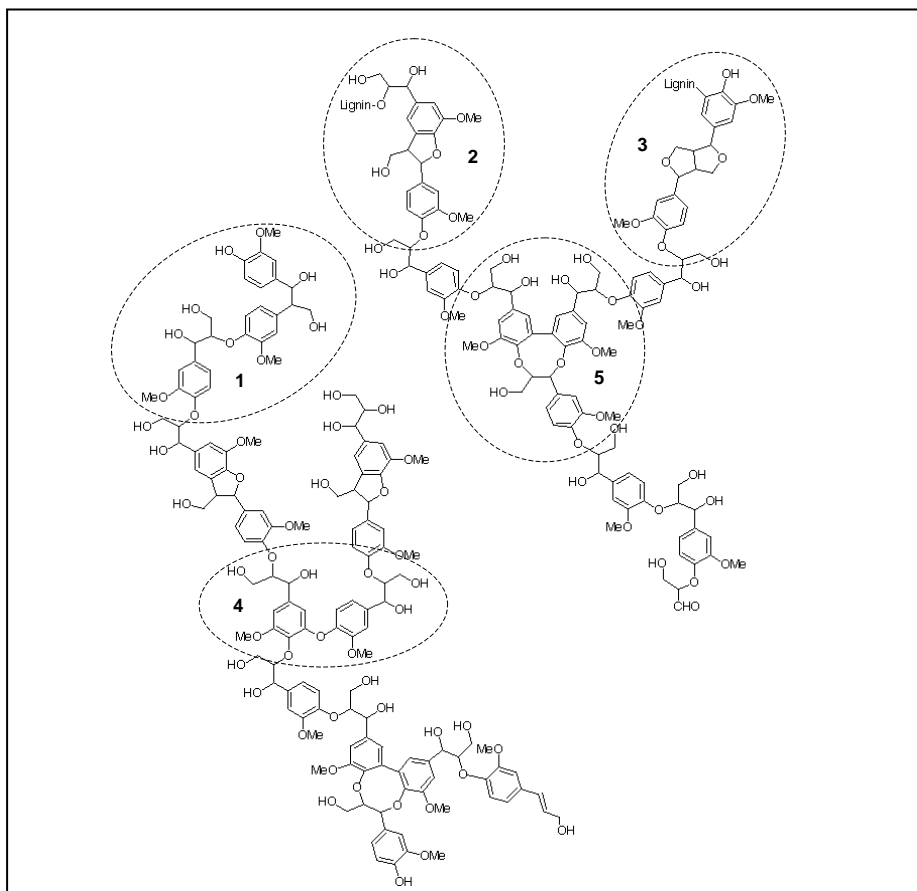


Figura 1.5. Estructura de la lignina. Model per a la lignina d'una fusta de conífera, formada per polimerització deshidrogenativa de l'alcohol coniferilic amb les diferents tipus d'estructures a partir d'unitats guaiacil :1) guaiacilglicerol-β-arilèter; 2) fenilcumarà; 3) pinoresinol; 4) difenilèter; 5) dibenzodioxocina. **1-4** són estructures de dos monòmers (Adler, 1977) i **5** és una estructura de tres monòmers descrita per Karhunen et al. (1995).

Les unitats S de la lignina són més reactives que les unitats G, així que l'eficiència d'un procés de deslignificació està lligat a la relació S/G de la lignina en la pasta tractada (Dence, 1996; del Río et al. 2001). Degut al caràcter hidrofòbic de la lignina, la seva presència en les pastes inhibeix l'adsorció d'aigua, l'inflament de la fibra i dificulta el refinatge.

Altres components minoritaris dels materials lignocel·lulòsics són els extractius i les cendres (material inorgànic). Els **extractius** són compostos de baix pes molecular, que no són afectats durant els processos de cocció i blanqueig i poden ser estrets de la fusta amb dissolvents orgànics polars (extractius polars) o apolars (extractius lipofílics) (Hillis, 1989; Sjöström, 1993). La quantitat i la composició dels extractius és molt variable depenent de l'espècie i part de la planta considerada, època de l'any en la qual es recol·lecta, etc. Una de les principals funcions d'aquests compostos és la protecció de la planta contra els agents patògens degut a la seva baixa degradació. Aquesta baixa capacitat de degradació, és al mateix temps, la causa de la formació de dipòsits insolubles coneguts com "pitch" (Gutiérrez et al. 2007) durant el procés de producció de pastes i la manufactura del paper. Finalment, els materials inorgànics obtinguts després de la incineració de la pasta són les anomenades **cendres** de la pasta.

1.1.2 Fibres no fusteres

La fusta continua essent la matèria primera més utilitzada en la fabricació industrial de pasta i paper, de fet només un 9% de la producció mundial de fibra utilitzada en la producció de paper correspon a fibres no fusteres.

El percentatge d'utilització d'aquestes fibres en la indústria paperera per àrees geogràfiques és dispar i està condicionat per la disponibilitat de recursos forestals dels diferents països tal com és posa de manifest a la Taula 1.1. (Leponiemi 2008).

Capítol 1

	Producció pasta no fustera respecte a la producció total (%)
Europa	1.3
Amèrica del Nord	0.4
Amèrica del Sud	2.7
Àsia	38.6
- <i>Xina</i>	74.9
- <i>Índia</i>	50.4
Àfrica	11.5
Oceania	0.0
Món	9.0

Taula 1.1. Producció de pasta de matèria no fustera respecte al total de producció de pasta en l'any 2004 (Leponiemi 2008).

No obstant, en països tradicionalment rics en massa forestal, han començat a considerar aquest tipus de fibres en la manufactura de paper (Kissinger et al. 2007), constatant-se un substancial augment en la utilització de fibres no fusteres (FAO, 2009; López et al, 2010). El terme de “fibra no fustera” inclou una gran quantitat de plantes de procedències diverses: residus agrícoles com la palla, plantes naturals de creixement autòcton (bambú) o les cultivades específicament pel seu alt contingut en fibra tals com el cànem, kenaf, lli i sisal entre d'altres (Atchinson 1998). Aquestes plantes són de conreu anual i desenvolupen el seu potencial de fibra en una determinada estació. Aquesta estacionalitat en la producció, la dificultat de transport i manipulació (degut al seu gran volum i baixa densitat), així com l'eliminació de grans quantitats de sílice durant el seu processament), són les principals desavantatges en la seva utilització en la indústria paperera (Pande, 1998). Paral·lelament, la menor quantitat de lignina que presenten facilita la seva eliminació amb processos químics més respectuosos en el medi ambient (Madakadze et al. 1999, Madakadze et al. 2010).

En els països desenvolupats, les fibres no fusteres s'utilitzen en la fabricació de papers amb propietats especials, que no poden ser obtinguts fàcilment a partir de fibres fusteres. Per altra banda, algunes característiques pròpies del paper tals com: porositat, permeabilitat a l'aire, resistència a l'esquinçament i la tracció, així com la capacitat de

doblegar-se estan associades a l'estructura física intrínseca d'algunes fibres no fusteres, facilitant la seva utilització com matèria prima l'obtenció de papers amb valor afegit.

La combinació de pastes de fibres no fusteres soles o amb certs percentatges de fusteres i polpa de paper reciclat, permet desenvolupar la producció de paper amb propietats específiques i de la qualitat requerida pel mercat (Hurter R.W. 2001).

A la Taula 1.2 és presenta la composició química de diferents fibres no fusteres així com les mateixes característiques per frondoses i coníferes.

Composició química (% del total)				
	<i>Cel·lulosa</i>	<i>Lignina</i>	<i>Pentoses</i>	<i>Cendres</i>
Lli (escorça)	70-80	1-6	2-6	1-2
Cànem	57-77	9-13	14-17	<1
Kenaf	44-57	15-19	22-23	2-5
Sisal	47-62	7-9	21-24	0.6-1
Frondoses	38-49	23-30	19-26	<1
Coníferes	40-45	26-34	7-14	<1

Taula 1.2. Comparació de la composició química de diferents fibres no fusteres amb les fibres de frondoses i coníferes (Garcia Hortal 2007 a; Page 1989).

1.1.3 Kenaf

El kenaf (*Hibiscus cannabinus*) és una planta dicotiledònia de creixement ràpid i de conreu anual. El seu origen probablement sigui en la zona central de l'est d'Àfrica, el seu nom és degut als perses encara que la planta és coneguda per gran varietat de noms locals. Es conrea àmpliament a l'Índia, Sud-est d'Àsia i Amèrica Central; cal destacar com majors productors mundials a la Xina, l'Índia i Tailàndia (Gracia Hortal, 2007a).

El kenaf és una planta de tija fibrosa resistent als insectes que requereix de pocs plaguicides en el seu conreu. És adaptable a diferents tipus de sòl i li calen pocs fertilitzants per créixer amb eficiència (Zaveri et al. 2004). Estudis recents indiquen que durant el seu creixement el kenaf presenta un alt nivell d'absorció de diòxid de

Capítol 1

carboni, aproximadament 1.5 vegades el seu pes, el més alt en diferents plantes no fusteres estudiades com el lli, cànem, bambú (Mohanty et al. 2005).

La fibra de kenaf consta de dues parts diferenciades, les fibres llargues de l'escorça ("bast") i les fibres curtes de la zona interior ("core"). Les fibres procedents de cada fracció són diferents química i morfològicament i és convenient, en vista a un major aprofitament paperer, la seva separació abans de l'obtenció de la pasta (Ohtani et al. 2001). Les propietats de les fibres de kenaf, especialment la composició química, estan condicionades per múltiples factors relacionats amb les condicions de creixement de la planta: mètode i any de conreu, clima, sòl (Ashori, 2006). La determinació concreta de les característiques del kenaf és essencial ja que aquestes afecten directament a les propietats de la pasta i condicionen el tipus de paper obtingut. Aquestes consideracions fan necessària la descripció de les característiques del kenaf utilitzat en aquesta tesi que es farà en el capítol de Materials i Mètodes, apartat 2.10.

Com ja s'ha comentat el kenaf té una llarga història de cultiu a l'Àfrica, i en diverses parts d'Àsia: Índia, Bangla Desh i Tailàndia; iniciant-se últimament el seu cultiu en el sud-est d'Europa. Les seves plantacions són molt productives, el que converteix a aquesta planta en una alternativa eficaç i rendible per a la producció de paper. A l'Estat Espanyol no hi ha conreus de kenaf, solament experiències en Centres d'Investigació com el de "La Orden Valdesequera" de la Junta d'Extremadura. En aquest centre s'ha posat a punt l'agronomia del conreu de kenaf d'acord amb les condicions climàtiques i s'han fet proves de producció de paper amb paper reciclat i fibra de kenaf sense tractament químic (Gonzalez, 2012).

Les pastes de kenaf són ideals per paper de premsa, impressió i escriptura. La separació del kenaf en els seus dos components permet l'obtenció de dues categories de pastes, amb propietats característiques i diferenciades. Les propietats papereres de les fibres obtingudes de l'escorça es comparen favorablement amb les de les coníferes. Confereixen als papers opacitat, porositat, resistència a la tracció, esquinçament i rebentament. Són adequades per un ampli rang d'especialitats: papers per fer moneda i premsa, tissús, papers amb resistència al greix i antiadhesius etc. (Garcia Hortal,

2007a). Les pastes químiques obtingudes a partir de les fibres curtes (“core”) tenen una molt bona resistència d’enllaç. S’utilitzen en un ampli rang de papers que necessiten de bones propietats superficials: qualitat d’escriptura i impressió, capes superficials de cartró (Kaldor et al. 1990). En aquest sentit hi ha una considerable utilització de pasta de kenaf per papers d’escriptura de diferents qualitats. Per exemple, l’empresa Kenaf Eco Fibers Italy S.p.A (Reggio Emilia, Italia) comercialitza una ampla gama de productes destinats a paper de premsa, paper estucat i diferents tipus de paper de seda (K.E.F.I., 2012).

A l’Estat Espanyol existeixen varies empreses que fabriquen pasta de paper a partir del kenaf i d’altres fibres no fusteres. Entre aquestes destaca CELESA que utilitza les fibres liberianes per fabricar pasta de cel·lulosa per papers especials de diferents característiques, com són els papers per filtres, cigarretes, bosses de té i pel buit, decoratius i per circuits elèctrics (Marques, 2010).

Recentment s’han començat a utilitzar les fibres el kenaf per a la fabricació de panells d’aïllament tèrmic i acústic, tant en bioconstrucció com en el sector automobilístic i afins, essent considerat com un material força prometedor per el desenvolupament de nous biomaterials.

1.2 Producció de pasta i paper

La fabricació de la pasta de paper consisteix bàsicament en la separació de les fibres de cel·lulosa, que es troben cimentades per la lignina. Les propietats finals d’un paper depenen no tant sols de l’espècie vegetal utilitzada (matèria prima) sinó també del procés d’obtenció de la pasta (Hortal 2007c). Per a l’obtenció de la pasta de paper és necessari aconseguir primerament una suspensió de fibres cel·lulòsiques amb unes característiques determinades quant a grandària de fibres, distribució de grandàries, composició, flexibilitat, resistència, etc. Els processos de separació de les fibres i l’obtenció de pastes poden ser mecànics, químics o una combinació de tots dos.

Així parlem de:

Capítol 1

- **Pastes mecàniques:** S'utilitza única i exclusivament energia mecànica en el procés de separació. En aquest procés, el contingut en hemicel·luloses i cel·lulosa es manté pràcticament al 100%, i es consideren processos d'alt rendiment. S'obtenen pastes que resulten avantatjoses per a alguns tipus de paper (paper de premsa i papers absorbents), ja que confereixen baixa resistència mecànica, alta opacitat i bona imprimibilitat. No obstant això, l'alt contingut de lignina en la pasta va en detriment de la qualitat del paper ja que les fibres són poc flexibles, no estan ben unides entre si, i el paper té baixa resistència mecànica i blancor, i tendeix a esgrogueir amb la llum solar (per oxidació de la lignina residual i altres components de la pasta).
- **Pastes químiques:** L'eliminació d'una bona part de la lignina de la fusta, en aquests processos, té lloc per la seva dissolució amb diferents reactius químics a temperatures i pressions elevades. La baixa selectivitat dels productes químics utilitzats produeix la degradació de carbohidrats (cel·lulosa i hemicel·lulosa), obtenint-se rendiments en pasta al voltant del 50% (Gomez i Brito, 2008). Les pastes químiques (obtingudes en processos de dissolucions alcalines o àcides) confereixen al paper gran resistència mecànica i opacitat. Sense blanquejar, s'utilitzen per embalatges i, blanquejades, per papers d'impressió i escriptura. Les pastes obtingudes per cocció amb hidrogenulfít de calci (procés àcid) són menys resistents que les pastes kraft (procés alcalí) però tenen un major rendiment i són més fàcils de blanquejar.
- **Pastes semi-químiques:** En la seva obtenció es combinen processos químics i mecànics, obtenint-se rendiments que oscil·len entre el 60 i 90%. Les propietats conferides al paper per aquestes pastes depenen del procés químic-mecànic utilitzat; però en general es pot dir que li confereixen una bona conformabilitat i baixa capacitat d'absorció.

En relació a les fibres no fusteres, el procés d'obtenció de pastes més utilitzat és la cocció amb hidròxid de sodi (procés alcalí) i antraquinona. Aquest mètode s'ha generalitzat en les últimes dècades degut a la capacitat d'aquest catalitzador

(antraquinona) d'augmentar la capacitat selectiva de deslignificació protegint les cadenes de carbohidrats i augmentant la producció de pasta (Blain, 1993).

El contingut, la composició i l'estructura química de la lignina són paràmetres importants en la producció de pasta de cel·lulosa ja que influeixen decisivament en la deslignificació de les fibres, el consum de reactius i en el rendiment final en pasta. La major reactivitat de les lignines de tipus S respecte de les de tipus G és ben coneguda (Chang i Sarkanen, 1973; Tsutsumi et al. 1995), i valors més alts de la relació S/G impliquen una major facilitat de deslignificació, menys consum de reactius i, per tant, un major rendiment de pasta (del Rio et al. 2005).

1.3 Blanqueig de la pasta

El blanqueig és el procés que té com objectiu eliminar o modificar les restes de lignina que romanen en la pasta després de la seva obtenció (lignines residuals) i que fan que aquesta presenti una tonalitat fosca (Sjöström 1993). El blanqueig d'una pasta paperera es realitza en diverses etapes i cadascuna elles es caracteritza pel seu agent blanquejant, el pH, la temperatura i el temps de durada del procés.

La blancor és la reflectància mesurada a la longitud d'ona de 457 nm en les fibres de pasta que formen les fulles de paper. El blanqueig augmenta la capacitat d'aquest per acceptar imatges impreses o escrites, augmentant al seva utilitat; és també una manera de purificar les pastes, augmentar la seva estabilitat i realçar les seves propietats.

El desenvolupament de lleis ambientals més restrictives en relació als processos contaminants (Brooks et al. 1994) i especialment contra els compostos clorats (persistents en el sòl i l'aigua), ha portat a la indústria paperera a introduir una molt ràpida evolució en els sistemes de producció de pasta blanquejada. Aquestes modificacions van donar lloc primer a l'aparició de seqüències de blanqueig lliures de clor elemental (ECF), utilitzant el diòxid de clor i l'hipoclorit com agents blanquejants (Widsten i Kandelbauer, 2008); i posteriorment a seqüències totalment lliures de clor (TCF). L'eliminació del clor i dels seus derivats requereix la utilització d'altres agents de blanqueig com oxigen, ozó o peròxid d'hidrogen.

Capítol 1

L'eficiència de l'etapa de blanqueig i les propietats finals de la pasta poden estar afectades negativament per la presència d' àcids hexenurònics (HexA) en la pasta a blanquejar. Aquests àcids es formen durant la cocció kraft, on l'àcid 4-O-metilglucorònic present en els xilans, es converteix en el seu corresponent àcid hexenurònic insaturat (àcid 4-deoxi- β -L-threo-hex-4-enopiranosilurònic) per la pèrdua de metanol tal com es mostra a la Figura 1.6 (Danielsson et al. 2006).

És conegut que la presència d' àcids hexenurònics en una pasta comporta els següents efectes en un procés de blanqueig :

- Contribució al número kappa: Els àcids hexenurònics interfereixen en el mètode estàndard de determinació del número kappa. La seva reacció d'oxidació amb el permanganat de potassi dona lloc a una mesura errònia del contingut en lignina de la pasta (Roncero 2001, Costa i Colodette, 2007).
- Consum de reactius de blanqueig (Jiang et al. 2000).
- Participació en la retenció de ions metàl·lics: Degut a la seva estructura química, aquests àcids tenen un fort efecte quelant contribuint a la retenció d'ions metàl·lics en la pasta. Aquests ions poden actuar com a catalitzadors en la descomposició d'alguns agents de blanqueig com el peròxid d'hidrogen amb el conseqüent efecte negatiu en els resultats del blanqueig (Vuorinen et al. 1999)
- Contribució a la reversió del grau de blancor: Diversos estudis suggereixen que l'envelliment està relacionat amb la quantitat d'àcids hexenurònics presents a la pasta blanquejada (Vuorinen et al. 1999, Cadena et al. 2010).
- Contribució a la formació d'àcid oxàlic: Alguns autors creuen que el contingut en àcids hexenurònics en la pasta contribueix a la formació d'àcid oxàlic responsable de la formació d'oxalat de calci donant lloc a problemes d'incrustació en el circuit del procés (Vuorinen et al. 1999, Elsander et al. 2000).

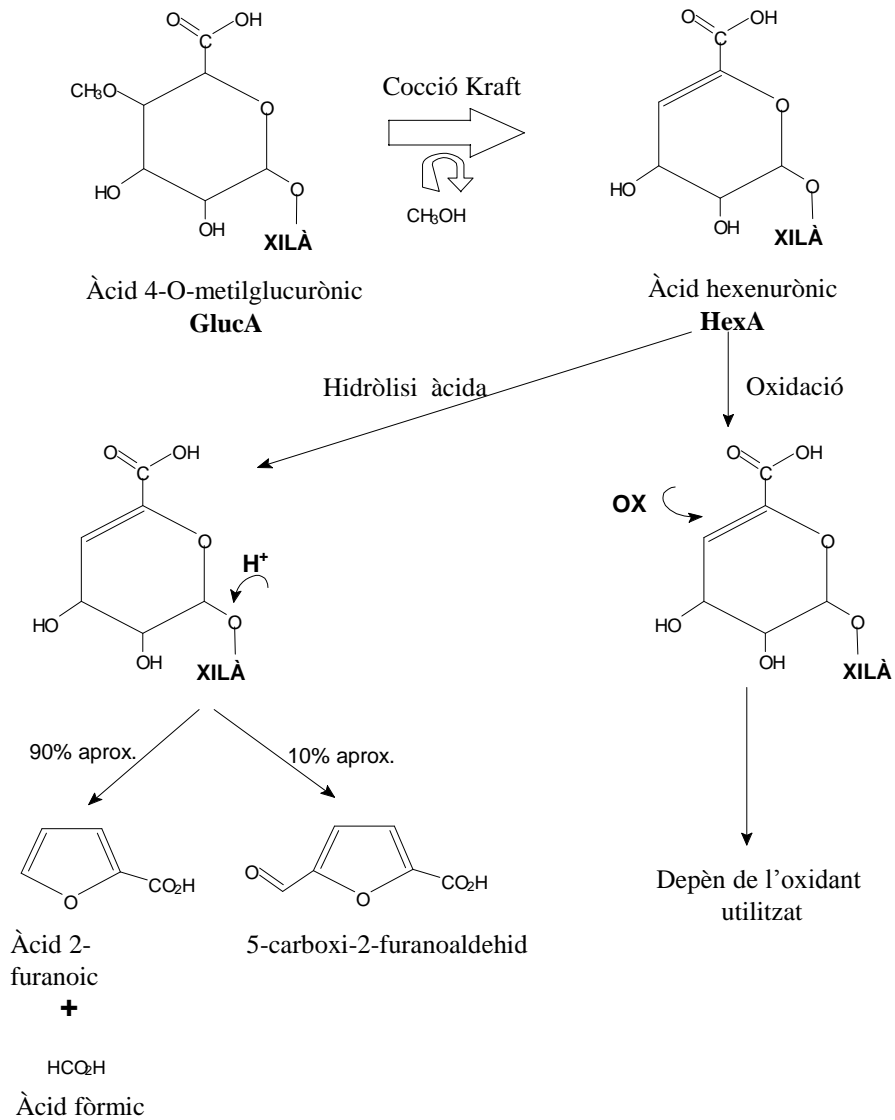


Figura 1.6. Formació dels àcids hexenurònics (HexA) i la seva eliminació per hidròlisi o oxidació.

1.3.1 Bioblanqueig: Utilització de lacases

La utilització d'enzims en la producció de pasta blanquejada és una de les aplicacions biotecnològiques que ha suscitat un interès creixent, conseqüència de les possibilitats

Capítol 1

que ofereixen aquests tractaments biològics en plantejar processos respectuosos amb el medi ambient.

S'entén per “**bioblanqueig**” la substitució de reactius clorats per enzims durant l'etapa de blanqueig de la pasta (Paice et al. 1995). Entre els enzims utilitzats destaquen les xilanases, que actuen catalitzant la hidròlisi dels xilans situats entre les microfibril·les de la cel·lulosa i la lignina. En desaparèixer la unió entre aquestes estructures, la lignina pot eliminar-se amb una major facilitat en les posteriors etapes de blanqueig (Turner et al. 1992). La utilització de xilanases va comportar la disminució del consum de reactius clorats (fins a un 35%). Aquestes millores van comportar la implantació industrial de les xilanases en el procés de blanqueig de diferents tipus de pastes (Kenealy i Jeffries 2003; Bajpai, 2004). No obstant això, existeixen dos inconvenients principals derivats de la utilització de xilanases: el descens del rendiment en pastes i l'augment de la demanda biològica d'oxigen (DBO) dels efluents.

Una alternativa en el procés de blanqueig és la utilització d'oxidoreductases (lacases i peroxidases) capaces de degradar la lignina d'una forma selectiva. Les lacases són oxidases multi-coures que catalitzen l'oxidació monovalent de fenols substituïts, anilines i tiols aromàtics, als seus corresponents radicals amb la consegüent reducció de l'oxigen molecular a aigua (Widsten i Kandelbauer, 2008). Aquests enzims, les lacases, són produïts per plantes i fongs de podridura blanca responsables de la degradació de lignina en la natura (Thurston, 1994); no obstant també s'han descrit i caracteritzat algunes lacases bacterianes (Enguita et al. 2002). L'àmplia especificitat de substrat d'aquests enzims, juntament amb la utilització d'oxigen molecular com acceptor final d'electrons (en front del peròxid d'hidrogen per les peroxidases) són els principals avantatges de la seva utilització tant en la indústria paperera (Paice et al. 1995) com en altres aplicacions industrials i mediambientals.

El baix potencial redox de les lacases (0.3 a 0.8 V), només li permet la degradació directa dels compostos fenòlics de baix potencial que constitueixen únicament el 20% del total de la lignina (Kawai et al. 1987a; 1987b). Aquest fet va limitar durant un cert

temps la seva utilització en la indústria paperera. L'aplicació dels anomenats mediadors va donar l'impuls definitiu a la utilització de les lacases com a biocatalitzadors en la producció de pasta de paper. Aquests compostos amplien l'acció de la lacasa a substrats no fenòlics, augmentant la seva capacitat oxidativa sobre la lignina i altres compostos aromàtics (Call i Mücke, 1997).

La base del sistema lacasa-mediador és l'ús de compostos de baix pes molecular que actuen com a intermediaris redox. En aquest procés l'oxigen molecular oxida a la lacasa (amb formació d'aigua), la lacasa oxidada es redueix oxidant el mediador fins a un radical lliure estable; aquest radical oxida finalment a la lignina present en la pasta. La Figura 1.7 presenta la seqüència d'actuació dels sistema lacasa-mediador descrit anteriorment.

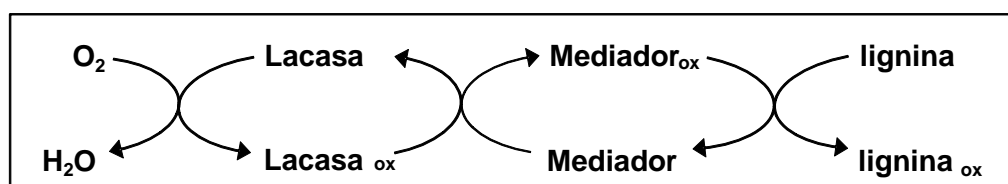


Figura 1.7. Sistema lacasa-mediador

Des de la seva descripció, els sistemes lacasa-mediador han estat investigats amb èxit per la deslignificació i blanqueig de diferents pastes de paper (Bourbonnais i Paice, 1996; Nelson et al.1998; Sealey et al. 1999; García et al. 2003). No obstant això, com s'ha esmentat a l'inici del capítol, l'elevat cost i els possibles problemes de toxicitat d'alguns mediadors han dirigit les investigacions a la cerca de mediadors alternatius, anomenats genèricament naturals, incloent alguns metabòlits fúngics així com productes resultants de la degradació de la lignina (Gutiérrez et al. 1994; Martínez et al. 1994; Eggert et al. 1996; Johannes i Majcherczyk, 2000).

Els compostos que es citen a continuació, tots ells compostos que apareixen en la degradació de la lignina, han estat els utilitzats en la present tesi:

- Siringaldehid (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehid: **SA**)
- Acetosiringona (4-hidroxi- 3,5-dimetoxiacetofenona: **AS**)

Capítol 1

- Vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehid: **V**)
- Acetovainillona (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona: **AV**)
- Àcid p-cumàric (**PC**)

Les estructures químiques d'aquests mediadors naturals, juntament amb la del compost 1-hidroxibenzotriazol (**HBT**) estan representades a la Figura 1.8.

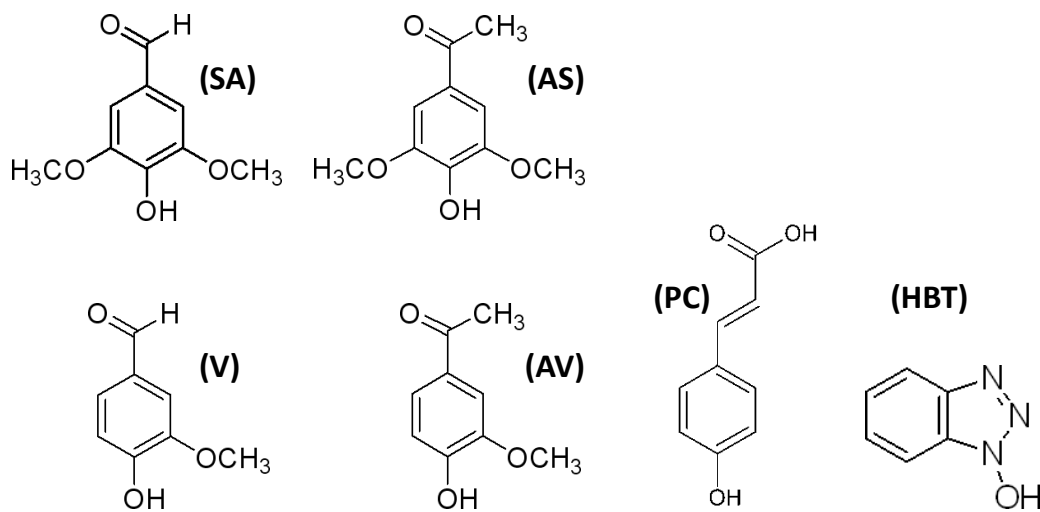


Figura 1.8. Estructura química i abreviatures dels mediadors: Siringaldehid (SA), Acetosiringona (AS), Vainillina (V), Acetovainillona (AV), àcid p-cumàric (PC) i 1-hidroxibenzotriazol (HBT)

1.4 Objectiu

La present tesi s'emmarca dins d'una de les línies del Grup de Recerca Paperer i Gràfic (CIPAGRAF), del Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeries Industrial i Aeronàutica de Terrassa, encaminada a **l'aplicació de la Biotecnologia per desenvolupar nous sistemes enzimàtics per al blanqueig de pastes i modificació de fibres cel·lulòsiques.**

La implantació d'etapes enzimàtiques en les seqüències de blanqueig de pasta de paper a nivell industrial continua essent, avui en dia, un dels principals reptes en el camp de la investigació paperera. La reducció de l'impacte ambiental, l'optimització de costos,

així com el desenvolupament de productes paperers amb propietats noves i millorades, són raons de base per l'estudi de noves seqüències enzimàtiques basades en l'aplicació del **sistema lacasa-mediador**. La utilització d'una matèria prima renovable, **el kenaf**, esta també en sintonia amb el concepte de desenvolupament sostenible (“un desenvolupament que satisfà les necessitats de les generacions presents sense comprometre les possibilitats de les generacions futures per a tal que puguin atendre les seves pròpies necessitats”: (1992 - Declaració de Rio).

Cal considerar com precedent concret a la present tesi, el treball d'investigació : “Utilització papelera de fibres no madereras (kenaf i *Miscanthus sinensis*). Estudio de secuèncias de blanqueo ECF y TCF” (de la Rosa, 2003). Aquesta tesi es va realitzar dintre del grup de recerca CIPAGRAF, i ha estat el punt de partida de la present. Una seqüència TCF convencional, **OpPoP**, assajada en la mateixa es prendrà com referència per les seqüències de bioblanqueig aplicades en el present treball d'investigació. Les propietats determinades pel kenaf xinès blanquejat per la seqüència citada anteriorment varen ser: blancor de 74.5% ISO, número kappa de 6.4 (NK_{lig} : 2.5; NK_{HexA} : 3.9) i una viscositat de $660 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$.

Basant-se en les consideracions anteriorment exposades, es planteja com l'objectiu de la present tesi :

Desenvolupar una seqüència de blanqueig totalment lliure de clor per blanquejar pasta de kenaf basada en l'aplicació del sistema lacasa-mediador.

Per arribar a aquest objectiu final, metodològicament es van plantejar els següents objectius parcials:

- Avaluar l'efecte de les primeres aplicacions del sistema lacasa-mediador en el bioblanqueig del kenaf.
- Estudiar la influència de l'estructura química del mediador en la capacitat oxidativa del sistema lacasa-mediador.
- Determinar la rellevància del mediador utilitzat en l'etapa enzimàtica.

Capítol 1

- Avaluar dues seqüències de blanqueig totalment lliures de clor, incloent el tractament enzimàtic lacasa-mediador, amb peròxid d'hidrogen (P) i peròxid d'hidrogen pressuritzat (Po)
- Determinar la influència dels àcids hexenurònics en el procés de bioblanqueig del kenaf.

L'interès, la novetat i la rellevància de l'objectiu del treball resideix en:

- ✓ Utilització d'una matèria prima no fustera i de conreu renovable, el kenaf, per l'obtenció de pasta de paper d'alt valor afegit.
- ✓ Aplicació del sistema lacasa-mediador en seqüències de blanqueig totalment lliures de clor en una pasta de kenaf.
- ✓ Assaig de diferents compostos fenòlics (acetosiringona, siringaldehid, acetovainillona, vainillina i àcid p-cumàric) i l'1-hidroxibenzotriazol com assistents de la lacasa en l'aplicació del sistema lacasa-mediador.
- ✓ Comprensió del paper rellevant del mediador utilitzat en relació a la seva estructura química.
- ✓ Seguiment de seqüències de blanqueig mitjançant propietats òptiques.

D'acord amb la metodologia plantejada, els capítols 3, 4, 5 i 6 (corresponents del treball experimental) de la present memòria corresponen als objectius parcials proposats per a l'assoliment de l'objectiu final de la mateixa. .

1.5 Bibliografia

Adler, E., 1977. Lignin chemistry: past present and future. *Wood Science and Technology* 11, 169-218.

Amin, H.M., 2006. Extended usage of xylanase enzyme to enhance the bleaching of softwood kraft pulp. *Tappi Journal* 5(1), 23-26.

Aracri, E., 2012. Application of laccase-based systems for biobleaching and functionalization of sisal fibres. PhD Thesis, UPC, Department of Textile and Paper Engineering. <http://hdl.handle.net/10803/77921>

Ashori, A., 2006. Pulp and paper from kenaf bast fibers. *Fibers and Polymers* 7(1), 26-29.

Atchinson, J. E., 1998. Update on global use of non-wood plant fibers and some prospects for their greater use in the United States, in: North American Non-Wood Fiber Symposium, TAPPI Proceedings, pp. 1-3.

Bajpai, P., 2004. Biological bleaching of chemical pulps. *Critical Reviews in Biotechnology* 24, 1-58.

Blain, T. J., 1993. Anthraquinone pulping: fifteen years later". *Tappi Journal* 76, 137-46.

Bourbonnais, R., Paice, M.G., 1996. Enzymic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi Journal* 79, 199-204.

Brooks, R.T., Edwards, L.L., Nepote, J.C. y Caldwell, M.R., 1994. Bleach plant close up and conversion to TCF: A case study using mill data and computer simulation. *Tappi Journal* 77, 3-92.

Burto, S.W., 2001. Low-energy thermomechanical pulping process using an enzyme treatment of wood between refining zones. U.S. Pat appl. US6267841.

Cadena, E.M., Vidal, T., Torres, A.L., 2010. Influence of the hexenuronic acid content on refining and ageing in eucalyptus TCF pulp. *Bioresource Technology* 101, 3554-3560.

Call, H.P., Mücke, I., 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology* 53, 163-202.

Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M. J. and Martínez, Á. T., 2005. Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 1775-1784.

Capítol 1

Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, Á. T., Romero, J., Gutiérrez, A. i del Río, J. C., 2007. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1264-1271.

Chang, H.M., Sarkanen, K.V., 1973. Species variation in lignin-Effect of the species on the rate of kraft pulping. *Tappi* 56(3), 132-134.

Chandra, R.P., Lehtanen, L.K., Ragauskas, A.J., 2004. Modification of high lignin content kraft pulps with laccase to improve paper strength properties. 1. Laccase treatment in the presence of gallic acid. *Biotechnology Progress* 20, 255-261.

Clark, J., 1978. Carbohydrates, cellulose, and lignin, in: Clark, J. (Ed.), *Pulp technology and treatment for paper*. Miller Freeman Publications, Inc., San Francisco, USA, pp. 106-124.

Costa, M.M., Colodette, J.L., 2007. The impact of kappa number composition on eucalyptus kraft pulp bleachability. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 24, 61-71.

Danielsson, S., Kisara, K., Lindstrom, M.E., 2006. Kinetic study of hexenuronic acid and methylglucuronic acid reactions in pulp and in dissolved xylan during kraft pulping of hardwood. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 45(8), 2174-2178.

de la Rosa, A., 2003. Utilización papelera de fibras no madereras (kenaf y *Miscanthus sinensis*) Estudio de les secuencias ECF y TCF. Tesis doctoral. UPC, Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera.

del Río, J.C., Gutiérrez, A., Martínez, M.J. i Martínez, Á.T., 2001. Py-GC/MS study of Eucalyptus globulus wood treated with different fungi. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 58-59, 441-452.

del Río, J.C., Gutiérrez, A., Hernando, M., Landin, P., Romero, J. i Martínez, Á.T., 2005. Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 74, 10-115.

Dence, C.W., 1996. Chemistry of chemical pulp bleaching, in: Dence, C.W. and Reeve, D. W. (Eds.), *Pulp bleaching - principles and practice*. TAPPI Press, Atlanta, USA, pp. 125-159.

Elsander, A., Ek, M. i Gellerstedt, G., 2000. Oxalic acid formation during ECF and TCF bleaching of kraft pulp. *Tappi Journal* 83, 73-77.

Eklund, D., Lindström, T., 1991. *Paper Chemistry, An Introduction*. DT Paper Science. 1st English edition.

FAO., 2009. Faostat-Forestry. www.faostat.fao.org. Consulta: setembre 2012.

Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D. y Eriksson, K.E.L., 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters* 391, 144-148.

Enguita, F.J., Matias, P.M., Martins, L.O., Placido, D., Henriques, A.O., Carrondo, M.A., 2002. Spore-coat laccase cotA from *Bacillus subtilis*: crystallization and preliminary X-ray characterization by the MAD method. *Acta Crystallographica Section D-biological Crystallography* 58, 1490-1493.

Fengel, D. i Wegener, G., 1989. "Lignin", in: Fengel, D. and Wegener, G. (Eds.), *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter and Co., Berlin, Germany, pp. 127-157.

Fillat, A., Roncero, M.B. i Vidal, T., 2011. Assessing the use of xylanase and laccases in biobleaching stages of a TCF sequence for flax pulp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 86, 1501-1507.

Fillat, A. 2011. Flax fibre modification using enzymatic systems to obtain high-value cellulose products. PhD Thesis, UPC, Department of Textile and Paper Engineering. <http://www.tdx.cat/handle/10803/38251>.

Fillat, U., Roncero, M. B., 2009a. Effect of process parameters in laccase-mediator system delignification of flax pulp: Part I. Pulp properties. *Chemical Engineering Journal*. 152, 322-329.

García, O., Camarero, S., Colom, J., Martínez, A. T., Martínez, M. J., Monje, R., Vidal, T., 2003. Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* 57, 513-519.

García Hortal, J.A., 2007a. *Fibras papereras: Características de las fibras naturales no madereras*. Edicions UPC, Barcelona, pp. 131-178.

Capítol 1

García Hortal, J.A., 2007b. Fibras papeleras : Composición química y estructura de la fibra. Propiedades fundamentales. Edicions UPC, Barcelona, pp. 52-84.

García Hortal, J.A., 2007c. Fibras papeleras: Introducción, Edicions UPC, Barcelona, pp. 13-50.

Gomez, F., Brito, J.O., 2008. Panorama de la industria de celulosa y papel en Iberoamérica. Area, M.C. (Ed.) Argentina, 61-102.

Gonzalez, J., 2012. <http://centrodeinvestigacionlaorden.gobex.es>. Consulta : Setembre 2012

Grönqvist, S., Rantanen, K., Alén, R., Mattinen, M. L. and Buchert, J., Viikari, L., 2006. Laccase-catalysed functionalization of TMP with tyramine. *Holzforschung* 60, 503-508.

Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto A., Martínez, M.J. i Martínez, A.T., 1994. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus. *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* 209,603-611.

Gutiérrez, A., Rencoret, J., Ibarra, D., Molina, S., Camarero, S., Romero, J., del Río, J.C., Martínez, A.T., 2007. Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environmental Science. Technology* 41, 4124–4129.

Hager A., Nellessen B., Puls J., 2002. On the applicability of laccases for deinking. In: *Proceeding of PTS-CTP deinking symposium* 34, 1-10.

Higuchi, T., 1985. *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. Academic Press. Orlando.USA

Hillis, W.E., Sumimoto, M., 1989. Effect of extractives on pulping. *Natural Products of Woody Plants II*; Ed. Rowe, J.W.Springer-Verlag, Berlin. pp. 880–920.

Hurter, R.W., 2001. Sisal Fibers: market opportunities in the pulp and paper industry, in: *FAO/CFC Seminary on Alternative Applications for Sisal and Henequen Proc.* pp. 61-64.

Jiang, Z., van, L., Barbara and Berry, R., 2000. Hexenuronic acid groups in pulping and bleaching chemistry. *Tappi Journal* 83, 167-175.

Johannes, C., Majcherczyk, A. 2000. Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 524-528.

Kaldor, A.F., Karigren, C., Herwest, H., 1999. Kenaf - a fast growing fiber source for papermaking. *Tappi Journal* 59-66.

Karhunen, P., Petteri, R., Sipila, J., Brunow, G., 1995. Dibenzodioxocins: A novel type of linkage in softwood lignin. *Tetrahedron Letters* 36, 166-170.

Kawai, S., Umezawa, T., Higuchi, T., 1987a. *p*-Benzoquinone monoketals, novel degradation products of β -O-4 lignin model compounds by *Coriolus versicolor* and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 210, 61-65.

Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M., Higuchi, T., Koide, K., Nishida, T., Morohoshi, N., Haraguchi, T., 1987b. C α -C β cleavage of phenolic b-1 lignin substructure model compound by laccase of *Coriolus versicolor*. *Mokuzai Gakkaishi* 33, 792-797.

K.E.F.I.: Kenaf Eco Fibers Italy S.p.A. www.kenaf.fiber.com. Consulta :
Desembre 2012

Kenealy, W. R., Jeffries, T.W., 2003. Enzyme processes for pulp and paper: A review of recent developments, in: *Wood derioration and preservation: advances in our changing world*. ACS Symposium Series. Volume 845. Oxford Press, Washington, USA, pp. 210-239.

Kirk, K., Kullen, D., 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi, in: Young, R. A. and Akhtar, M. (Eds.), *Environmentally friendly technologies for pulp and paper industry*. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA, pp. 273-308.

Kissinger, M., Fix, J., Rees, W.E., 2007. Wood and nonwood pulp production: Comparative ecological footprint on the Canadian prairies. *Ecological Economics* 62, 552-558.

Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. , Bohn, A., 2005. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie, International Edition* 44, 3358-3393.

Capítol 1

Leponiemi, A., 2008. Non-wood pulping possibilities- a challenge for the chemical pulping industry. *Appita Journal* 61, 234-243.

López, F., García, J.C., Pérez, A., García, M.M., Fera, M.J., Tapias, R., 2010. *Leucaena diversifolia* a new raw material for paper production by soda-ethanol pulping process. *Chemical Engineering Research and Design* 88, 1-9.

Madakadze, I.C., Radiotis, T., Li, J., Goel, K., Smith, D.L., 1999. Kraft pulping characteristics and pulp properties of warm season grasses. *Bioresource Technology* 69, 75-85.

Madakadze, I.C., Masamvu, T M., Radiotis, T., Li, J., Smith, D.L., 2010. Evaluation of pulp and paper making characteristics of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum) and switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *African Journal of Environmental Science and Technology* 4, 465-470.

Marques, G., 2010. Valoración de diferentes cultivos para la fabricación de pasta de papel: Caracterización química, modificaciones estructural de sus constituyentes orgánicos durante los procesos de cocción y blanqueo y aplicaciones biotecnológicas. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Marques, G., Rencoret, J., Gutierrez, A., del Rio, J.C., 2010. Evaluation of the chemical composition of different non-woody plant fibers used for pulp and paper manufacturing. *Open Agriculture Journal* 4, 93-101.

Martínez, M.J., Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T., 1994. Studies on homoveratric acid transformation by the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41, 500-504.

McGinnis, G.D., Shafizadeh, F., 1981. Cellulose and hemicellulose. Casey, J.P. (ED). *Pulp and Paper: Chemistry and Chemical Technology*. John Wiley and Sons, pp.1-38.

Mohanty, A.K., Misra, A., Drzal, L.T., 2005. Natural fibers, biopolymers, and biocomposites. CRC Press, Taylor and Francis Group.

Moldes, D., Vidal, T., 2008. Laccase–HBT bleaching of eucalyptus kraft pulp: Influence of the operating conditions. *Bioresource Technology* 99, 8565-8570.

Moore, G., 1996, Nonwood fibre applications in papermaking. Pira Internacional. Leatherhead. Surrey. UK.

Nelson, P.J., Chin, C.W.J., Viikari, L., Tenkanen, M., 1998. The use of a laccase mediator stage in bleaching eucalypt Kraft pulps. *Appita Journal* 51, 451-455.

Nousiainen, P., Maijala, P., Hatakka, A., Martínez, Á. T. and Sipila, J., 2009. Syringyl-type simple plant phenolics as mediating oxidants in laccase catalyzed degradation of lignocellulosic materials: model compound studies. *Holzforschung* 63, 699-704.

Ohtani, Y., Mazumber, B.B., Sameshima, K., 2001. Influence of the chemical composition of kenaf bast and core on the alkaline pulping response. *Journal Wood Science* 59(3), 30-35.

Page, D. H., 1989. The beating of chemical pulps - the action and the effects, in: Baker, C. F. and Punton, V. W. (Eds.), *Transactions of the 9th Fundamental Research Symposium. Volume 1: Fundamentals of Papermaking*. Mechanical Engineering Publications Ltd., London, England, pp. 1-38.

Paice, M. G., Bourbonnais, R., Reid, I. D., Archibald, F. S., Jurasek, L., 1995. Oxidative bleaching enzymes: A review. *Journal of Pulp and Paper Science* 21, J280-J284.

Pande, H., 1998. Non wood fibre and global fibre supply. *Unasylva* 193, 49, 44-50.

Parham, R. A., 1983. Ultrastructure and chemistry, in: Kocurek, M. J. and Stevens, C. F. B. (Eds.), *Pulp and paper manufacture. Volume 1: Properties of fibrous raw materials and their preparation for pulping*. Joint Textbook Committee of the Paper Industry, TAPPI Press, Atlanta, USA, pp. 35-43.

Roncero, M. B., 2001. Obtención de una secuencia "TCF" con la aplicación de ozono y enzimas para el blanqueo de pastas madereras y de origen agrícola. Optimización de la etapa Z. Análisis de los efectos en la fibra celulósica y sus componentes. Tesis Doctoral. UPC, Departament d' Enginyeria Tèxtil i Paperera.

Roncero, M. B., Torres, A.L., Colom, J. F., Vidal, T., 2005. The effects of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps. *Biorersource Technology* 96-1-21-30.

Schröder, M., Aicherning, N., Gübitz, G.M., Kokol, V., 2007. Enzymatic coating of lignocellulosic surfaces with polyphenols. *Biotechnological Journal* 2, 334-41.

Capítol 1

Sealey, J., Ragauskas, A.J. y Elder, T.J., 1999. Investigations into laccase-mediator delignification of kraft pulps. *Holzforschung* 53, 498-502.

Sears, K. D., Alexander, W. J., Goldschmid, O., Halmiton, J.K., 1978. Characterization of hemicelluloses. Studies of representative pulps from Quebec black spruce and balsam fir. *Tappi Journal* 21, 49-53.

Sjöström, E., 1981. "Lignin", in: Sjöström, E. (Ed.), *Wood chemistry: fundamentals and applications*. Academic Press, Orlando, USA, pp. 71-88.

Sjöström, E., 1993. *Wood chemistry. Fundamentals and applications*. Academic Press, San Diego.

Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19-26.

Tsutsumi, Y., Kondo, R. Sakai, K., Imamura, H., 1995. Difference in reactivity between syringyl and guaiacyl lignin in alkaline systems. *Holzforschung* 49, 423-428.

Turner, J. C., Skerker, P. S., Burns, B. J., Howard, J.C., Alonso, M A., Andres, J. L., 1992. Bleaching with enzymes instead of chlorine-mill trials. *Tappi Journal* 75, 83-89.

Valls, C., Colom, J F., Baffert, C., Gimbert, I., Roncero, M.B., Sigoillot, J., 2010. Comparing the efficiency of the laccase-NHA and laccase-HBT systems in eucalyptus pulp bleaching. *Biochemical Engineering Journal* 49, 401-407.

van Beek, T.A., Kuster, B., Claassen, F.W., Tienvieri T., Bertaud, F., Lenon G., 2007. Fungal bio-treatment of spruce wood with *Trametes versicolor* for pitch control: Influence on extractive contents, pulping process parameters, paper quality and effluent toxicity. *Bioresource Technology* 98, 302-311.

van Lierop, B., Skothos, A., Liebergott, N., 1996. Section iV. The Technology of Chemical Pulp Bleaching. Chapter 5. Ozone Delignification. *Pulp Bleaching*. Ed Dence i Reeve. Tappi Press. Atlanta. USA. 321-345.

Vuorinen, T., Fagerstrom, P., Buchert, J., Tenkanen, M., Teleman, A., 1999. Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps. *Journal of Pulp and Paper Science* 25, 155-162.

Widsten, P., Kandelbauer, A., 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 293-307.

Widsten, P., Nguyen, T., Laine, J.E., Malmqvist, A., Welander, Y., 2004. In-mill removal of TPM whitewater contaminants by biological treatment in an aerobic biokidney used in conjunction with microfiltration and laccase treatment. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 19,379-83.

Zaveri, M., 2004. Absorbency characteristics of kenaf core particle. Master of Science Department of Textile Engineering NORTH Carolina State University. USA.

Capítol 2

MATERIALS I MÈTODES

2.1 Matèria prima

L'estudi que es porta a terme en aquesta tesi es centra en el blanqueig d'una pasta no fustera, el kenaf (*Hibiscus cannabinus*), procedent de la Xina. L'obtenció de la pasta es va realitzar a la fàbrica de CELESA S.A. a Tortosa, a partir de l'escorça del vegetal utilitzant un procés de cocció amb hidròxid de sodi i antraquinona. Prèviament a la seva utilització, la pasta no blanquejada es va rentar amb àcid sulfúric fins pH 2. Les condicions aplicades en aquest rentat van ser: consistència (g.p.s. / g totals) del 3% , temperatura ambient i 30 minuts, temps durant el qual la pasta es barreja amb regularitat. Posteriorment al filtrat de l'efluent àcid, es realitzen tres rentats amb aigua desmineralitzada i un final amb aigua destil·lada. Aquest rentat elimina impureses, i redueix el contingut en ions metàl·lics.

La resposta d'una matèria prima en un procés de blanqueig depèn de diversos factors, un dels quals és la seva procedència. Aquesta procedència determina les característiques del vegetal, marcadament en el cas del kenaf, i condiciona les propietats de la pasta inicial no blanquejada. Aquestes consideracions fan necessari una descripció de la composició i característiques específiques del kenaf utilitzat en la tesi, les quals es presenten en l'apartat 2.10 del present capítol, immediatament després de la descripció dels paràmetres utilitzats per la caracterització de la pasta així com de les tècniques seguides per la determinació dels mateixos.

2.2 Enzims

2.2.1 Lacases

En els diferents tractaments enzimàtics portats a terme durant la investigació realitzada, s'han utilitzat dues lacases.

- Lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* (PcL), subministrada per l'INRA de Marseille, amb una activitat enzimàtica de 45 U/mL.

- Lacasa de *Trametes villosa* (TvL) (NS-51002), subministrada per Novozymes (Danmark) amb una activitat enzimàtica de 700 U/mL.

L'activitat enzimàtica de les lacases es va determinar mesurant l'oxidació de l'àcid 2,2, azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonat) (ABTS) de concentració 5mM, a 24°C i pH=5 (acètic / acetat de sodi). La formació del radical catiònic del ABTS es mesura a 436 nm ($\epsilon_{436} = 29300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Una unitat d'activitat enzimàtica es defineix com la quantitat d'enzim que transforma 1 μmol per minut de ABTS a 25°C. Les mesures es varen realitzar amb un espectrofotòmetre UV-1603 de Shimadzu.

2.2.1.1 Mediadors

Els compostos utilitzats com a mediadors naturals, tots ells compostos fenòlics que apareixen en la degradació de la lignina, varen ser els següents: acetosiringona (AS), siringaldehid (SA), acetovainillona (AV), vainillina (V), àcid p-cumàric (PC). El mediador sintètic utilitzat va ser el 1-hidroxibenzotriazol (HBT). Tots els compostos esmentats van ser adquirits a Sigma-Aldrich.

2.2.2 Xilanases

Es va utilitzar la xilanasa comercial, Pulpzyme[®] HC d'activitat 480 U·mL⁻¹ que va ser subministrada per Novozymes[®]. Una unitat enzimàtica es defineix com la quantitat d'enzim que transforma 1 μmol de sucre reductor (mesurat com a equivalents de xilosa) de xilà per minut a un pH de 7 i a 50°C.

2.3 Tractaments enzimàtics (Etapa L)

Els diferents tractaments enzimàtics realitzats durant l'experimentació es presenten a continuació. La nomenclatura utilitzada correspon a la següent descripció:

Tractament assaig / temps / Lacasa Mediador / quantitat de mediador

- **Tractament 1₂L_{M3}**: 2 grams de pasta seca al 1% de consistència, 20 unitats enzim (*PcL*)/g.p.s.) i un 3% mediador (g.p.s.). Les experiències es realitzen en un reactor obert col·locat en un bany termostàtic (30°C) amb agitació durant 2 hores, saturació d'O₂ i a pH=4 (dissolució amortidora d'àcid tartàric/tartrat de sodi).
- **Tractament 2₂L_{M3}** : 10 grams de pasta seca al 5% consistència, 20 unitats enzim (*PcL*)/g.p.s) i un 3% mediador (g.p.s.). Les experiències es realitzen en reactors tancats Easydye AHIBA de Datacolor durant 2 hores a 30°C, agitació de 50 rpm, aigua saturada d'O₂ i a pH=4 (dissolució amortidora d'àcid tartàric/tartrat de sodi).
- **Tractament 2₄L_{M3-(M1.5)}** : 10 grams de pasta seca al 5% consistència, 20 unitats enzim (*PcL*) /g.p.s. i un 3% mediador (g.p.s.). La duració del tractament va ser de 4 hores i la resta de les condicions idèntiques al tractament anterior.

* **2₄L_{M1.5}**: Pels mediadors AS i SA és va realitzar una experimentació complementaria amb les mateixes condicions operatives i un 1,5% mediador (g.p.s.).

- **Tractament 3₄L_{M1.5}** : 40 grams de pasta seca al 7% consistència, 17,5 unitats enzim (*TvL*)/g.p.s i un 1,5% mediador (g.p.s.) . L'experimentació és va realitzar en un reactor d'acer inoxidable a 6 bar de pressió d'oxigen amb agitació continua durant 4 hores, a 50°C i pH=4 (dissolució amortidora d'àcid tartàric/tartrat de sodi).
- **Tractament 4₄L_{M1.5}** : 60 grams de pasta seca al 10% consistència, 20 unitats enzim (*TvL*/g.p.s.) i un 1,5% mediador (g.p.s.) L'experimentació és va realitzar en les mateixes condicions que el tractament anterior.

Els resultats dels tractaments **1₂**, **2₂** i **2₄** estan descrits en el Capítol 3 de la memòria. En els Capítol 5 i 6 de la mateixa, es troben respectivament els resultats dels tractaments **3₄** i **4₄**.

A la figura següent es presenten els reactors on es van dur a terme els diferents tractaments enzimàtics (a excepció del 1_2L_{M3}).



Figura 2.1. Reactor Easydye AHIBA de Datacolor: Tractaments, 2_2 i 2_4 . Reactor a pressió: Tractaments 3_4 i 4_4 .

Finalitzada l'etapa enzimàtica es va realitzar la filtració de les diferents mescles de reacció. Per cada tractament, es va recollir una mostra dels efluents i la pasta tractada es va rentar tres vegades amb aigua desmineralitzada i finalment amb aigua destil·lada.

2.3.1 Tractament amb xilanasa (Etapa X)

El tractament amb xilanasa es va dur a terme en bosses de polietilè que es van col·locar en un bany termostàtic a 50°C . Les condicions d'aplicació del tractament van ser: 3U/g.p.s. al 5% de consistència durant 2 hores, a 50°C i $\text{pH}=7$ (dissolució amortidora Tris-HCl). Un cop finalitzat el tractament, es va filtrar la pasta i recollir els efluents. La pasta tractada es va rentar segons el procediment ja descrit en aquesta memòria

2.4 Extracció alcalina (Etapa E)

Aquesta etapa es va dur a terme després dels primers tractaments enzimàtics i completa els tractaments: $1_2L_{M3}E$ i $2_2L_{M3}E$. Les condicions operatives de l'extracció van ser: 5% consistència de pasta, 1,5% de NaOH durant 120 minuts a 90°C , i es va dur a terme en reactors Easydye AHIBA de Datacolor. El filtrat, rentat de la pasta i recollida d'efluents es realitza segons el procediment descrit en l'apartat 2.3.

2.5 Seqüències de blanqueig

A continuació es presenten les diferents seqüències de blanqueig assajades en el transcurs del treball experimental i els corresponents capítols de la memòria on es realitza la presentació i discussió de resultats.

Capítol 3. La seqüència descrita consta de dues etapes, $2_4L_{M3-(M1.5)}$ com etapa enzimàtica i una etapa final amb peròxid d'hidrogen (etapa P). La seqüència completa queda descrita com $2_4L_{M3-(M1.5)}P$.

Capítol 5. Presenta una nova seqüència, $3_4L_{M1.5}P$, també amb dues etapes. L'etapa enzimàtica comporta una menor dosi de mediador (1.5% g.p.s.) i es finalitza amb una etapa amb peròxid d'hidrogen.

Capítol 6. Es descriuen les dues últimes seqüències de blanqueig:

* Seqüència $4_4L_{M1.5}QPoWa$, en la qual s'aplica una etapa quelant (etapa Q) després de l'etapa enzimàtica ($4_4L_{M1.5}$) i una etapa amb peròxid d'hidrogen sota pressió (etapa Po) amb un rentat àcid final (Wa).

* Seqüència $4_4L_{M1.5}XP$, després de l'etapa enzimàtica ($4_4L_{M1.5}$) s'aplica un tractament amb xilanas (etapa X) per finalitzar amb una aplicació de peròxid d'hidrogen (etapa P).

2.5.1 Etapa quelant (Etapa Q)

Aquesta etapa implica la utilització d'un agent quelant per reduir el contingut d'ions metàl·lics presents a la pasta de kenaf (detallat a la taula 2.3). Aquests ions són responsables de la degradació de la cel·lulosa i de la reducció de l'efecte del peròxid d'hidrogen en el blanquejat de la pasta. Les condicions del tractament varen ser les detallades a continuació: 10% de consistència per la pasta, 0.3% sobre massa de pasta seca d'àcid dietil-enetriaminpentaàcetic, amb un pH 5-6 i a una temperatura de 85°C durant 1 hora.

2.5.2 Tractament amb peròxid d'hidrogen (Etapas P i Po)

Les condicions de les dues etapes són similars. En els capítols 3 i 5, l'etapa P és realitza en el reactor Easydye AHIBA de Datacolor; aquest equip permet realitzar tractaments simultanis amb petites quantitats de pasta. Els reactius es col·loquen juntament amb la pasta dintre dels petits reactors en les condicions predeterminades. En el tractament 4₄ descrit al capítol 6 es porta a terme l'etapa Po; per aquesta etapa es necessita una major quantitat de pasta (sobre uns 25 grams de massa seca), que es col·loca en el reactor pressuritzat (0.6 MPa) amb agitació. El tractament es realitza en tres etapes ($t_1=1h$; $t_2=1h$; $t_3=1h$), cadascuna inclou l'adició d'un 1% s.p.s d'aigua oxigenada. La taula 2.1 resumeix les principals condicions d'aplicació de les tres etapes de blanqueig descrites anteriorment.

	Q	P	Po
Consistència(%)	10	5	10
Temperatura(°C)	85	90	90
Temps (hores)	1	2	4
H₂O₂ (% s.p.s.)	-	3	1+1+1
NaOH (% s.p.s.)	-	1.5	1.5
DTPA (% s.p.s.)	0.3	1	1
MgSO₄ (% s.p.s.)	-	0.2	0.2

Taula 2.1. Condicions d'aplicació de les diferents etapes de blanqueig.

Al final de cadascuna d'aquestes etapes (P i Po), es segueix el procediment ja descrit per la recollida d'efluents i adequació de la pasta.

2.5.3 Rentat àcid (Wa)

Prèviament a la seva utilització, la pasta de kenaf no blanquejada es va sotmetre a un rentat àcid inicial. La pasta a temperatura ambient i amb una consistència del 3% és tracta amb àcid sulfúric fins a pH 2 durant 30 minuts; durant aquest temps la pasta es

barreja amb regularitat. A continuació s'elimina filtrant l'efluent àcid i es renta la pasta tractada tres vegades amb aigua desmineralitzada i finalment amb aigua destil·lada. El mateix rentat àcid es va dur a terme a la finalització del tractament **4₄**, en la seqüència **4₄L_{M1.5}QPoWa** assajada.

2.6 Extracció amb Soxhlet

Els compostos de baix pes molecular (els extractius) adherits a la superfície de la pasta s'eliminen amb una extracció utilitzant acetona com dissolvent en l'aparell d'extracció Soxhlet segons el procediment següent: 2 grams de pasta seca es col·loquen en el cartutx de cel·lulosa de l'aparell. L'extracció es fa amb 50 mL d'acetona que es deixa bullir durant 135 minuts. Al final del procediment es recupera l'acetona i la pasta després de l'evaporació del dissolvent.

2.7 Caracterització de la pasta

Per la caracterització de les pastes es va determinar el número kappa, blancor i viscositat segons les normes: ISO 302:2004, ISO 2470-1:2009 i ISO 5351:2010, respectivament. Les anàlisis es va realitzar per duplicat pel número kappa (amb un error inferior a 0.5 de desviació estàndard) i la viscositat. La determinació de la blancor és va dur a terme per quadruplicat amb una desviació estàndard no superior a 0.1.

A continuació es descriuen diferents propietats i les seves tècniques de determinació que s'han utilitzat per completar la caracterització de les mostres obtingudes després dels diferents tractaments assajats.

2.7.1 Propietats òptiques

El color no és una propietat de l'objecte, és conseqüència de la interacció de l'objecte amb la llum incident. La percepció del color ve determinada per tres factors: l'observador, la font de llum i l'objecte. Un objecte il·luminat amb fonts de llum diferents, mostra colors diferents. S'han d'especificar doncs les condicions en les quals es determinen les propietats òptiques (Popson, 1996; Pauler, 1990) i la "Comission Internationale l'Eclairige" fou la responsable de la normalització de les diferents fonts de llum, il·luminant i observadors. En aquesta investigació l'adquisició de les dades per

determinar les diferents propietats òptiques es va realitzar amb un espectrofotòmetre de reflectància difusa, Technidyne, Color Touch PC (Figura 2.1). La desviació estàndard en els valors determinats per totes les propietats òptiques no va ser superior a 0.1.

2.7.1.1 Corbes de reflectància

La visió d'un objecte és conseqüència de la llum reflectida per aquest i que és percebuda per l'ull humà (Lips, 1991). La relació entre la radiació reflectida per un conjunt de fulles superposades, suficientment opaques, i la radiació reflectida per un difusor perfecte en les mateixes condicions, s'anomena factor de reflectància intrínseca (R_{∞}). El color està determinat pels valors (expressats en percentatge) de R_{∞} en l'interval de longituds d'ona del visible (400 i 700 nm). La disminució de color produeix un augment dels valors de la reflectància. Els valors de R_{∞} es van mesurar seguint la norma ISO 11475 (font de llum D65 i un D65 /10° com il·luminant/observador).

La blancor es defineix com el valor de R_{∞} mesurat a la longitud d'ona de 457 nm. El blanqueig d'una pasta produeix un augment dels valors de R_{457} (Biermann, 1996; Lips, 1991; Pauler, 1990; Popson et al. 1996), i dona una idea de l'eficiència de l'etapa de blanqueig. La norma ISO 2470-1:2009 (apartat 2.7) estableix la mesura de R_{457} amb C(ISO) com a font de llum i C(ISO)/2° com il·luminant /observador.

2.7.1.2 Índex k/s, corbes k/s i percentatge de disminució d'àrea (PDA)

- **Índex k/s** : L'índex k/s és una manera d'avaluar la quantitat de grups cromòfors presents a la pasta, és per tant una eina útil per determinar la quantitat de color que s'elimina en una seqüència de blanqueig (Jordan, 1996). Es calcula a partir de la teoria de Kubelka-Munk, segons l'equació :

$$k/s = \frac{1 - R_{\infty}^2}{2R_{\infty}} \quad \text{Equació 2.1}$$

on “k” és el coeficient d'absorció de llum, el seu valor es proporcional a la quantitat de grups cromòfors; “s” és el coeficient específic de dispersió de llum i es pot considerar constant per un tipus determinat de pasta i R_{∞} és el factor de reflectància intrínseca.

Valors alts de l'índex **k/s** indiquen gran presència de grups cromòfors a la pasta. Una seqüència d'eliminació de color té com efecte la disminució dels valors de l'índex **k/s**.

- **Percentatge de disminució d'àrea (PDA)** : El percentatge de disminució d'àrea de la corba **k/s** permet quantificar i facilitar la interpretació de l'efecte d'una seqüència de blanqueig. Dona el % en la variació de l'àrea **k/s**, i expressa la reducció o augment de la quantitat de grups cromòfors conseqüència de la seqüència aplicada. Es calcula a partir de l'equació equació 2.2, on "A₀" és el valor de l'àrea de la corba **k/s** inicial (referència); "A₁" és el valor l'àrea després de la seqüència aplicada. Els valors de l'àrea **k/s** es van calcular amb el programa informàtic OriginPro 7.00.

$$\text{PDA}\% = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100 \quad \text{Equació 2.2}$$

2.7.1.3 Coordenades cromàtiques

El color de els mostres es descriu d'acord amb les coordenades CIE L*a*b* on L*, a* i b* són les coordenades en l'espai de color de la figura 2.4. El mètode de determinació d'aquestes coordenades va ser desenvolupat, com ja s'ha dit, per la "Comission Internationale l'Eclairige" en l'any 1976 i els valors per les formetes de les diferents pastes de kenaf van ser obtinguts utilitzant com font de llum D65 i un D65 /10° com il·luminant/observador amb l'aparell Technidyne Color Touch PC. Aquesta teoria descriu que el color es percep com: L*, la lluminositat, que varia des de 100 per un blanc perfecte a 0 per un negre absolut; a* varia del verd al vermell, i b* té una variació dels blaus als grocs, de valors negatius a positius (Hunt, 1998). El paràmetre òptic C* (Chroma), és la distància perpendicular a l'eix de lluminositat, es determina segons l'equació 2.3 i mesura la saturació del color.

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad \text{Equació 2.3}$$

La figura següent mostra l'aparell utilitzat per la determinació de la blancor i les altres propietats òptiques descrites, així com l'espai de color CIE L*a*b*.

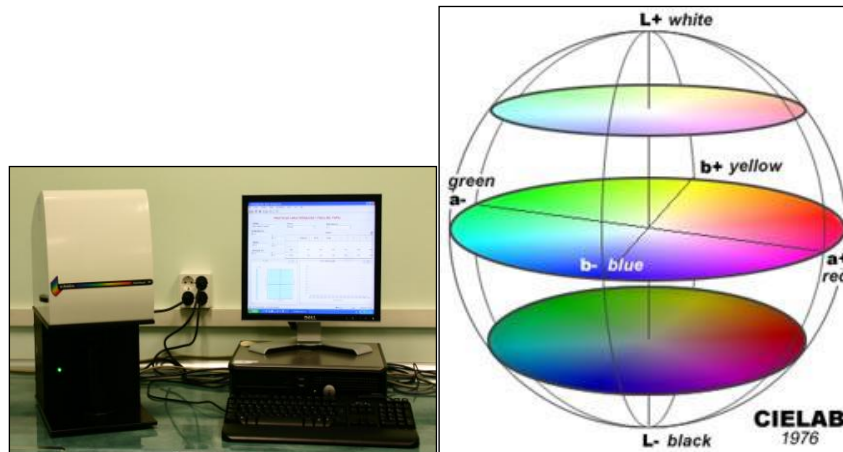


Figura 2.2. Technidyne, PC Color Touch i l'espai de color CIEL*a*b*.

2.7.2 Àcids hexenurònics (HexA)

El mètode utilitzat per la determinació quantitativa d'àcids hexenurònics (HexA) presents a la pasta es basa en la metodologia proposada per Li (Gellerstedt i Li, 1996; Chai et al. 2001) en la que es realitza l'anàlisi per espectroscòpia UV (Shimadzu model UV-1603) després de la hidròlisi dels HexA amb acetat de sodi i acetat de mercuri.

2.7.3 Anàlisi de sucres i lignina Klason

La composició de sucres provinents de la cel·lulosa i hemicel·lulosa de les mostres de pasta es va determinar per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) seguint el procediment descrit a continuació. Les mostres amb una grandària de partícula inferior a 0.5 mm, en alíquotes i per duplicat s'hidrolitzen amb àcid sulfúric en dues etapes anomenades : a) *pre-hidròlisi amb àcid sulfúric concentrat*, es situen els tubs d'assaig amb 5 mg de pasta seca i 5 mL d'àcid sulfúric del 72% en massa en un bany termostàtic a 30°C , amb agitació i durant 1 hora; i (b) *hidròlisi final amb àcid sulfúric diluït*, s'utilitza aigua destil·lada per recollir el contingut dels tubs i diluir les mostres fins una concentració final del 4% d'àcid. Els flascons amb les dissolucions recollides es col·loquen en un autoclau a 121°C durant 60 minuts. Després de la hidròlisi, per una banda es recull el residu sòlid no soluble en àcid sulfúric que

constitueix l'anomenada lignina de Klason (KL); i per una altra la dissolució dels diferents sucres de la qual es fa la determinació cromatogràfica. Aquesta es porta a terme en un cromatògraf HPLC Agilent 1100 equipat amb una columna d'intercanvi iònic Aminex HPX-87H i detector d'índex de refracció; i amb les condicions operatives de 0.006 mol/L d'àcid sulfúric per la fase mòbil, cabal de 0.6 mL/min i 60°C de temperatura de columna. Els valors obtinguts s'interpolen en les corbes de calibratge de glucosa, ramnosa, arabinosa i xilosa (reactius adquirits a Sigma-Aldrich) . La columna utilitzada no té resolució per determinar la xilosa, manosa i galactosa separatament, i tots tres sucres estan expressats com a xilosa en els resultats (Garrote et al. 2001).

2.7.4 Classificació de fibres

Es va portar a terme en un classificador de fibres Bauer McNett, segons la norma TAPPI T233-cm-06. El procediment de separació de les fibres en dues fraccions (les considerades llargues o curtes) va ser el següent: 10 grams de pasta es van desintegrar en 3 litres d'aigua i es van col·locar en la primera càmera que disposa d'un sedàs de 30 “mesh” retenint la fibra llarga. Amb flux continu d'aigua, la fibra curta es retinguda en la segona càmera amb el sedàs de 200 “mesh”. La petita quantitat de pasta que passa per aquest sedàs es consideren els fins. Després de 20 minuts d'operació, el flux d'aigua s'atura, es recullen les dues primeres fraccions de fibres per la seva quantificació i, en el nostre cas, degut a la seva ínfima quantitat es desestimen els fins.

2.7.5 Microscòpia electrònica d'escombrat (SEM)

Diferents formetes elaborades amb la pasta de kenaf, recobertes amb un film d'or i pal·ladi van ser examinades per microscòpia electrònica d'escombrat. Les imatges SEM, presentades en els capítols 2 i 6 d'aquesta memòria, es van obtenir amb un equip JEOL JSM-6400 Microscope del Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera de Terrassa.

2.8 Anàlisi per termogravimetria

Aquesta experimentació es va dur a terme al “*Departamento de Ingeniería Química, Físico Química y Química Orgánica*” de la Universitat de Huelva (UHU)”. Les corbes termogravimètriques (TG) es van obtenir en un aparell Mettler Toledo model TGA/SDTA851e/LF1600 amb mostres de pasta d’un pes aproximat de 5 mg. La piròlisi (en atmosfera de nitrogen) i la combustió (en aire sintètic, N₂/O₂:4/1) es va dur a terme amb tres velocitats d’escalfament (5,10 i 20°C/min) entre 25 i 900°C (García Barneto et al. 2011).

2.9 Caracterització d’efluents

Es va realitzar la caracterització dels efluents en termes de demanda química d’oxigen (DQO), color i toxicitat després dels tractaments enzimàtics descrits als capítols 3 i 6.

2.9.1 Demanda Química d’Oxigen i Color

La Demanda Química d’Oxigen i el color dels efluents es determinen segons les normes ASTM D1252-06 i ASTM D1209-05:2011 respectivament. Les lectures obtingudes en l’espectrofotòmetre UV (Shimadzu model UV-1603) van ser corregides amb el factor de dilució corresponent i la consistència utilitzada en l’etapa que genera els efluents analitzats.

2.9.2 Toxicitat

La toxicitat dels efluents es determina amb el mètode Microtox, utilitzant el bacteri luminescent marí *Vibrio fischeri* en un Microtox M500 Analyzer (Strategic Diagnostic Inc., Azur Environmental) d’acord amb la norma UNE-EN ISO 11348-3:2009. Un equitox/m³ es defineix com el recíproc d’una dissolució d’aigües residuals que redueix l’emissió de llum en un 50% després de 15 minuts. Els assajos de toxicitat es van dur a terme per duplicat.

2.10 Característiques del kenaf

En aquest apartat es detallen les propietats de la pasta de kenaf xinès utilitzat com a matèria prima en la realització de la tesi. Les primeres característiques descrites

corresponen a cites bibliogràfiques (de la Rosa, 2003) i a continuació es presenten les determinades durant la realització del treball experimental:

- Contingut de cations metàl·lics, cendres i diòxid de silici en la pasta de kenaf inicial (de la Rosa, 2003).

Cu (ppm)	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Ca (ppm)	Cendres (% g.p.s.)	SiO₂ (% g.p.s.)
3.7 ± 1.0	937.0 ± 20.0	96.5 ± 4.6	5111.0 ± 147.0	3.9 ± 0.4	1.8 ± 0.2

Taula 2.2. Contingut de cations metàl·lics (expressat en parts per milió), cendres i diòxid de silici (expressat en % sobre pasta seca) per la pasta de kenaf inicial.

- La cristal·linitat de la cel·lulosa de la pasta de kenaf és de l'ordre de un 84,4% (de la Rosa, 2003), molt elevada respecte a la presentada per la cel·lulosa d'altres pastes no fusteres (Roncero, 2001).
- La lignina de la pasta del kenaf utilitzat presenta un major percentatge en unitats siringil que guaiacil (S/G=3 : de la Rosa, 2003). Aquesta relació és comparable a la composició de la lignina de fusta de les frondoses.
- La pasta xinesa de kenaf presenta un cert contingut de partícules fosques, suposadament fragments de l'escorça exterior (de la Rosa, 2003).
- Distribució de longituds de fibres del kenaf (determinació amb el classificador de Bauer McNett). Utilitzant dues etapes consecutives de filtració, el 97.4% del pes sec de la pasta inicial va ser retingut per un sedàs de 30 “mesh”, són les considerades fibres llargues; el 2.5% del pes sec va ser retingut per un sedàs de 200 “mesh”, constitueixen les fibres curtes. Els fins, que passen pel sedàs de 200 “mesh”, no es consideren en aquest cas degut al seu percentatge pràcticament nul.
- Propietats inicials determinades per la pasta de kenaf no blanquejada:

Capítol 2

	Número kappa	Blancor % ISO	Viscositat (mL/g)	HexA*($\mu\text{mol/gps}$)
Kenaf inicial	12.9 ± 0.1	35.0	925.0 ± 23	55.6 ± 2.5

Taula 2.3. Propietats inicials de la pasta de kenaf utilitzada.*HexA: contingut en àcids hexenurònics de la pasta.

- Corbes de reflectància i índex k/s (determinació descrita en els apartats 2.7.1.1 i 2.7.1.2).

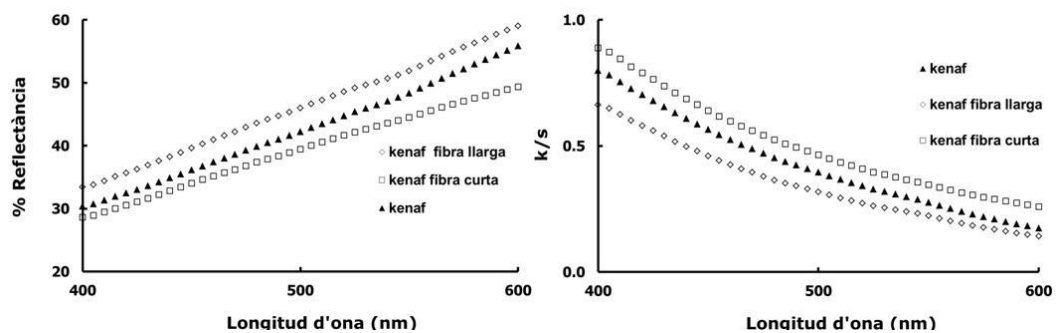


Figura 2.3. Corbes de reflectància i índex k/s de la pasta de kenaf i les respectives fraccions de fibra llarga i curta.

- Coordenades cromàtiques (determinació descrita en l'apartat 2.7.1.3).

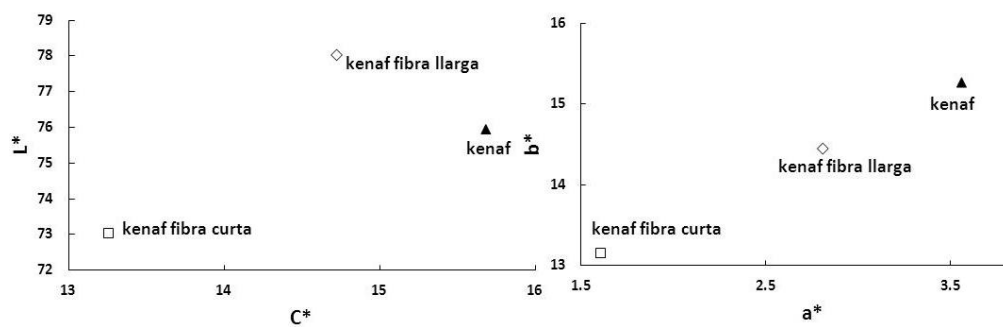


Figura 2.4. Paràmetres cromàtics i coordenades de la pasta de kenaf i les respectives fraccions de fibra llarga i curta.

- Imatges SEM de la superfície de les formetes de la pasta inicial de kenaf i de les respectives fraccions de fibra llarga i curta.

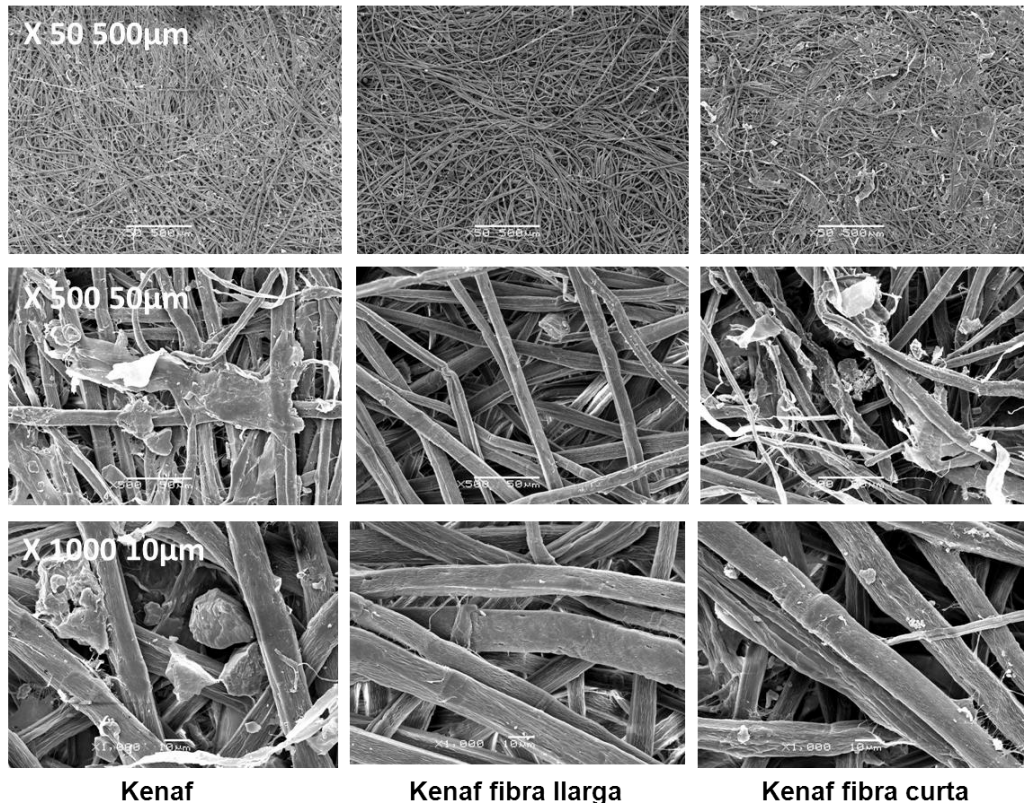


Figura 2.5. Imatges SEM de les superfícies de les formetes del kenaf i les fraccions corresponents a la fibra llarga i fibra curta.

Si ens fixem en les imatges corresponent a l'augment de 500, podem distingir la presència de gran quantitat de material no fibrós present en la pasta de kenaf inicial. Aquest dipòsit de material no cel·lulòsic pot ser un dipòsit afegit sobre la fibres, conseqüència del tractament de cocció al qual s'ha sotmès el vegetal. Per altra banda, com és veu en les imatges del mateix augment, aquest material no fibrós queda pràcticament en la fracció de la fibra curta un cop feta la separació de les mateixes.

• Contingut de monosacàrids (determinació per cromatografia líquida HPLC). El contingut de de glucosa, xilans i lignina de Klason (residu insoluble després de la hidròlisi àcida) és va determinar per la pasta de kenaf inicial així com per les fraccions de fibra curta i llarga. La taula 2.2. mostra aquests valors i les seves respectives blancors:

	Glucans (g/100g)	Xilans (g/100g)	Lignina Klason (g/100g)	Blancor %ISO
Kenaf	83.5 ± 0.2	14.3 ± 0.1	2.1 ± 0.1	35.0
Kenaf (fibres llargues)	84.3 ± 0.5	14.5 ± 0.2	1.2 ± 0.1	40.6
Kenaf (fibres curtes)	80.5 ± 0.3	15.6 ± 0.1	3.8 ± 0.4	34.8

Taula 2.4. Glucans, xilans i lignina de Klason continguda en les diferents pastes expressada en percentatge pes sec, així com el valor de la blancor per les mateixes.

Com resum final de les característiques del kenaf utilitzat en la present tesi es poden destacar les següents:

- ✓ Un elevat percentatge de cristal·linitat de la cel·lulosa que comporta una menor accessibilitat dels agents de blanqueig, i per tant a la pràctica el kenaf presenta una major dificultat per ser blanquejat, respecte a altres matèries primeres.
- ✓ Alt contingut d'hemicel·luloses i especialment de xilosa.
- ✓ Baix percentatge de lignina i una elevada proporció d'unitats siringil en la mateixa. Aquest fet presenta en principi avantatges tant en la deslignificació com en els processos de blanqueig, ja que les unitats siringil són més reactives que les unitats de guaiacil (Nishimura et al. 2002).
- ✓ Alt contingut de cations metàl·lics (especialment ferro) i un elevat percentatge de cendres. La presència de cations metàl·lics en un pasta interfereix negativament en les seqüències de blanqueig, ja que contribueixen a la descomposició del peròxid d'hidrogen.

- ✓ Alt contingut de material no cel·lulòsic associat a la fracció de fibra curta que s'ha d'eliminar durant el tractament enzimàtic i pot representar també una interferència negativa en la mateixa.

Finalment, fer especial esment de l'alt contingut d'àcids hexenurònics presents a la pasta, la influència dels quals en el procés de blanqueig ja ha estat referenciada en l'apartat 1.3 del Capítol 1 d'aquesta memòria.

2.10 Bibliografia

Biermann, C.J., 1996. Optical Properties of Paper. Ed. Biermann. Handbook of Pulping and Papermaking. 2^a ed. San Diego: Academic Press. 487-515.

Chai, X. S., Zhu, J. Y. and Li, J. 2001. A simple and rapid method to determine hexeneuronic acid groups in chemical pulps. Journal of Pulp and Paper Science. 27(5):165-170.

de la Rosa, A., 2003. Utilización papelera de fibras no madereras (kenaf y *Miscanthus sinensis*) Estudio de les secuencias ECF y TCF. Tesis doctoral. UPC, Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera.

García Barneto, A., Vila, C., Ariza, J., Vidal, T., 2011. Thermogravimetric measurement of amorphous cellulose content in flax fibre and flax pulp. Cellulose. 18:17-31.

Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J. C., 2001. Kinetic modelling of corncob autohydrolysis. Process Biochemistry. 36(6):571-578.

Gellerstedt, G., Li, J. B., 1996. An HPLC method for the quantitative determination of hexeneuronic acid groups in chemical pulps. Carbohydrate Research. 294:41-51.

Hunt, R.W.G., 1998. Measuring colour. 3rd Ed. Kingston-upon-Thames: Fountain Press.

Jordan, B., 1996. The Properties of Bleached Pulp - Brightness: Basic Principles and Measurement. Dence, C. W. and Reeve, D. W., (ed.). Pulp Bleaching - Principles and Practice. 1^a ed. Atlanta: Tappi Press. 695-716.

Lips, H. A., 1991. Pulpa y papel. Química y Tecnología Papelera. Casey, P. J. (ed.). 1ª ed. México: Noriega Limusa, vol. 3: 217-263.

Nishimura, N.; Izumi, A.; Kuroda, K., 2002. Structural characterization of kenaf lignin: differences among kenaf varieties. *Industrial Crops and Products*. 15(2):115-122.

Pauler, N., 1990. Propietes optiques du Papier AB Lorentzen & Wettre, Gábor, Ludwig, Mémeth, Hungrie.

Popson, S.J., Malthouse, D.D., Crawford, B.T., Popson, M.T., Crawford, P.M., 1996. Measurement and Control of the Optical Properties of Paper Technidyne Color Corporation.

Roncero, M.B., 2001. Obtención de una seqüència "TCF" con la aplicación de ozono y enzimas para el blanqueo de pastas madereras y de origen agrícola. Optimización de l'etapa Z. Análisis de los efectos en la fibra celulósica y sus componentes. Tesis doctoral. UPC, Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera..

Capítol 3

EFFECTES DE L'APLICACIÓ DEL SISTEMA LACASA-MEDIADOR NATURAL EN LA PASTA DE KENAF

RESUM

En aquest capítol es presenten els resultats obtinguts en les primeres aplicacions del sistema lacasa-mediador a la pasta de kenaf. Els cinc compostos fenòlics utilitzats com mediadors assistents de la lacasa en l'etapa enzimàtica varen ser: l'acetosiringona, el siringaldehid, l'acetovainillona, la vainillina i l'àcid p-cumàric. Un cop finalitzat el tractament enzimàtic, les mostres de pasta es van sotmetre a dos tractaments alcalins diferents (etapa E o etapa P). Els resultats obtinguts es comparen amb els proporcionats per la aplicació del sistema lacasa-1-hidroxibenzotriazol, a fi de determinar l'efecte dels mediadors naturals en la deslignificació de la pasta. Tots els mediadors naturals al final de l'etapa enzimàtica augmenten el número kappa, disminueixen la blancor i modifiquen els valors de les propietats òptiques; observant-se un diferent comportament en funció del tipus de mediador utilitzat, que reflecteix la complexitat en les reaccions que tenen lloc durant aquesta etapa. La major deslignificació i blancor, després de l'etapa P, s'obté per les mostres tractades amb els compostos fenòlics: siringaldehid i acetosiringona. Per tant, després d'aquestes primeres aplicacions del sistema lacasa-mediador, els dos compostos fenòlics citats anteriorment es postulen com els mediadors naturals més prometedors per la deslignificació de la pasta de kenaf.

Capítol 3

3.1 Introducció

La utilització de mediadors assistents de la lacasa per augmentar el seu poder oxidatiu (Bourbonnais et al., 1998; Shleev et al., 2006) ha suscitat un gran interès en els últims anys (Camarero et al. 2005, 2007). Aquest interès ha anat en augment en constatar-se els força bons resultats obtinguts amb la utilització dels anomenats mediadors sintètics tals com, el 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonat) (ABTS) i l'1-hidroxibenzotriazol (HBT) en la degradació de la lignina. La aplicació del sistema lacasa-HBT s'ha utilitzat amb èxit en diferents tipus de fibres, tan fusteres (eucaliptus - Valls i Roncero, 2009) com no fusteres (Ili - Fillat i Roncero, 2010), dintre del grup d'investigació en el marc del qual s'integra aquesta tesi. El nou repte en l'aplicació del sistema lacasa-mediador per diferents tipus de fibres constitueix en trobar mediadors efectius entre els compostos fenòlics que intervenen en la degradació de la lignina. Un dels avantatges en la utilització dels compostos fenòlics com a mediadors és que poden ser obtinguts tant a partir dels licors de cocció (Gutierrez et al., 2007) com a partir dels propis materials vegetals. El seu baix cost i la seva suposada baixa toxicitat prometen avantatges econòmics i mediambientals. En aquest estudi s'analitza per primera vegada l'efecte de l'aplicació del sistema lacasa-mediador amb diferents compostos fenòlics sobre la pasta de kenaf.

3.2 Materials i mètodes

Utilitzant com a matèria primera pasta de kenaf (*Hibiscus cannabinus*) obtinguda a Celesa S.A. a partir del vegetal de procedència xinesa, es van portar a terme els diferents tractaments enzimàtics amb lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* (proporcionada per l'INRA-Marseille-France). La pasta inicial no blanquejada tenia un número kappa de 12.9 i un 35.0% ISO de blancor. Altres característiques de la pasta de kenaf, així com de l'enzim utilitzat han estat detallades en el Capítol 2.

Els primers tractaments enzimàtics aplicats a la pasta de kenaf varen ser : 1_2L_{M3} , 2_2L_{M3} i $2_4L_{M3-(M1.5)}$ i es van realitzar en l'ordre indicat. Les condicions operatives per cadascun d'aquests tractaments es recorden a continuació:

- **Tractament 1₂L_{M3}**: 2 grams de pasta seca al 1% de consistència, 20 unitats enzim (PcL)/g.p.s. i un 3% mediador (g.p.s.). Les experiències es realitzen en un reactor obert col·locat en un bany termostàtic (a 30°C) amb agitació durant 2 hores, saturació d'O₂ i a pH=4 (dissolució amortidora d'àcid tartàric/tartrat de sodi).
- **Tractament 2₂L_{M3}** : 10 grams de pasta seca al 5% consistència, 20 unitats enzim (PcL) /g.p.s. i un 3% mediador (g.p.s.). Les experiències es realitzen en reactors tancats de Easydye (de Datacolor) durant 2 hores a 30° C , agitació de 50 rpm, aigua saturada d'O₂ i a pH=4 (dissolució amortidora d'àcid tartàric/tartrat de sodi).
- **Tractament 2₄L_{M3-(M1.5)}** : 10 grams de pasta seca al 5% consistència, 20 unitats enzim (PcL) /g.p.s. i un 3% mediador (g.p.s.). La duració del tractament va ser de 4 hores i la resta de les condicions idèntiques al tractament anterior.

* **2₄L_{M1.5}**: Pels mediadors AS i SA és va realitzar una experimentació complementària amb les mateixes condicions operatives i un 1,5% mediador (g.p.s.).

En tots els tractaments descrits es va realitzar un assaig de control: tractament amb la lacasa sense mediador.

Al finalitzar aquesta etapa és varen completar les següents seqüències de blanqueig: **1₂L_{M3}E**, **2₂L_{M3}P** i **2₄L_{M3-(M1.5)}P**, després de l'aplicació de les subseqüents etapes alcalines E o P a l'etapa enzimàtica (condicions d'aplicació descrites en el Capítol 2).

Les propietats determinades per la pasta i que serveixen de base per la discussió de resultats varen ser, el número kappa (ISO 302), la blancor (ISO 2470-1) i les propietats òptiques (ISO 11475). A partir d'aquestes últimes es determinen: i) la relació k/s (equació 2.1), ii) el percentatge de disminució d'àrea (equació 2.2) tal com s'ha descrit en el Capítol 2 de Materials i Mètodes.

La caracterització dels efluents obtinguts en l'etapa enzimàtica és porta a terme a partir dels valors obtinguts per la Demanda Química d'Oxigen i el color dels mateixos, determinats segons les normes ASTM D1252-06 i ASTM D1209-05 respectivament.

Capítol 3

3.3 Resultats i discussió

Els resultats de la primera seqüència completa de blanqueig assajada ($1_2L_{M3}E$) es discuteixen a continuació; a la Figura 3.1 es presenten els valors del número kappa i la blancor de les mostres de pasta obtingudes al final de la seqüència esmentada. Els tractaments amb lacasa-AS, lacasa-AV i lacasa (control) tenen similar eficiència en la reducció del número kappa, al voltant de 4 unitats menys respecte a la pasta de kenaf inicial. La mostra tractada només amb lacasa presenta la major blancor (11 punts més alta que la pasta inicial).

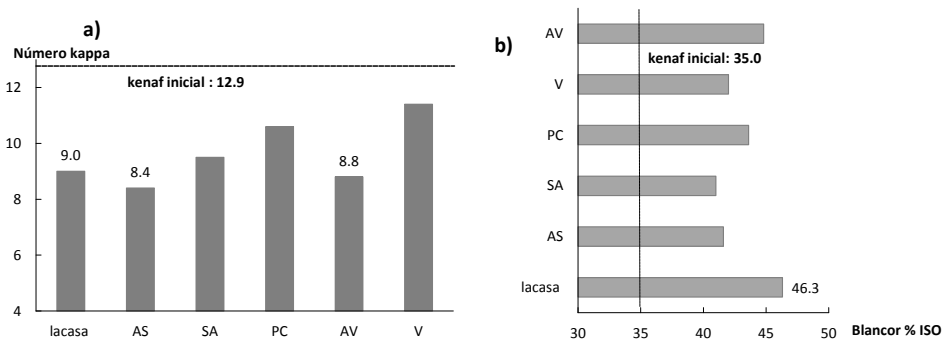


Figura 3.1. Tractament $1_2L_{M3}E$: Canvis en el número kappa (a) i blancor (b) de la pasta de kenaf tractada amb lacasa i els diferents mediadors naturals. La lacasa correspon al control (tractament sense mediador) i la línia de punts assenyala els valors corresponents a la pasta de kenaf inicial.

Per altra banda, les corbes de reflectància obtingudes pels diferents mediadors naturals assajats són indicatives de l'eliminació de color que ha tingut lloc com a conseqüència de l'aplicació del tractament. Una eliminació de color comporta un increment dels valors de reflectància per cada longitud d'ona (Holberg, 2000). Com es veu a la Figura 3.2, tots els mediadors augmenten els valors de la reflectància respecte a la pasta inicial.

El millor agent blanquejant va ser la lacasa (control) ja que la seva corba presenta els valors més alts de reflectància. Els mediadors naturals varen tenir un similar efecte en el blanqueig i les corbes obtingudes amb els mediadors V, AS i SA estan pràcticament superposades.

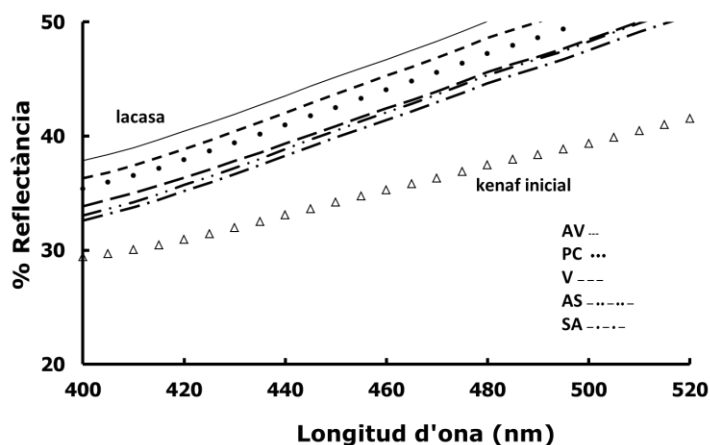


Figura 3.2. Corbes de reflectància de les mostres de kenaf després del tractament $I_2L_{M3}E$ amb els diferents sistemes lacasa-mediador.

La relació k/s és una mesura de la quantitat de grups cromòfors present en la pasta; així canvis en el valor de l'àrea sota la corba k/s són indicatius de variacions en la quantitat de cromòfors presents en la pasta (Jordan, 1996).

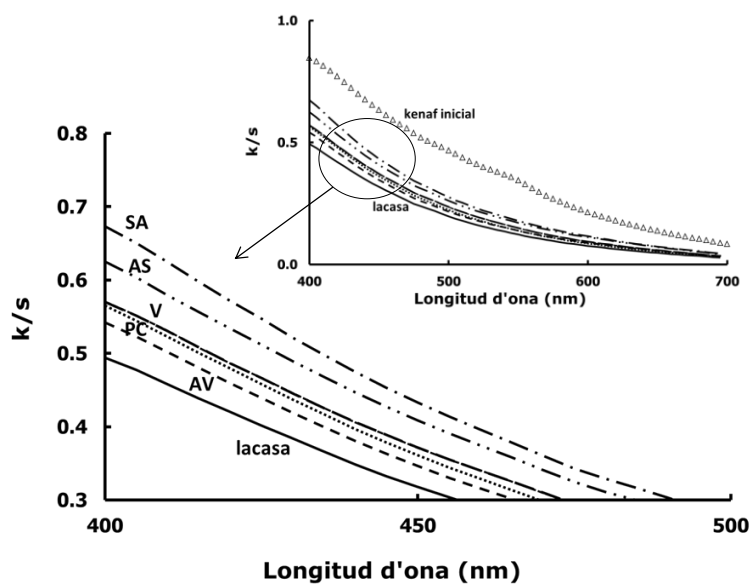


Figura 3.3. Canvis en les corbes k/s de les diferents mostres de pasta després del tractament $I_2L_{M3}E$ amb els diferents sistemes lacasa-mediador.

Capítol 3

Com es veu a la Figura 3.3 tots els mediadors naturals eliminen menys grups cromòfors que el control lacasa, que presenta el valor de l'àrea k/s més petit. L'eficiència dels mediadors en la eliminació de grups cromòfors segueix la següent seqüència: AV > PC > V > AS > SA.

3.3.1 Efectes de les etapes L i E

Un cop realitzada i avaluada aquesta primera seqüència de blanqueig, es va dur a terme una nova aplicació del sistema-lacasa mediador amb la seqüència $2_2L_{M3}E$ descrita. Aquesta experimentació va permetre determinar per separat l'efecte de cadascuna de les dues etapes realitzades (tractament enzimàtic i extracció alcalina) en la deslignificació, blancor i propietats òptiques de la pasta de kenaf tractada amb lacasa i els diferents mediadors. La seqüència es va dur a terme per dos dels mediadors naturals (AS i SA) i pel mediador sintètic (HBT). En la Figura 3.4 es presenten els valors obtinguts després de l'etapa enzimàtica (etapa L) i la subseqüent extracció alcalina (etapa E). La utilització de l'HBT en l'etapa L disminueix el número kappa en 1.7 unitats i s'obté una blancor similar a la de la pasta inicial. Oposadament, AS i SA pràcticament no redueixen el kappa en relació a la pasta inicial i si disminueixen la blancor.

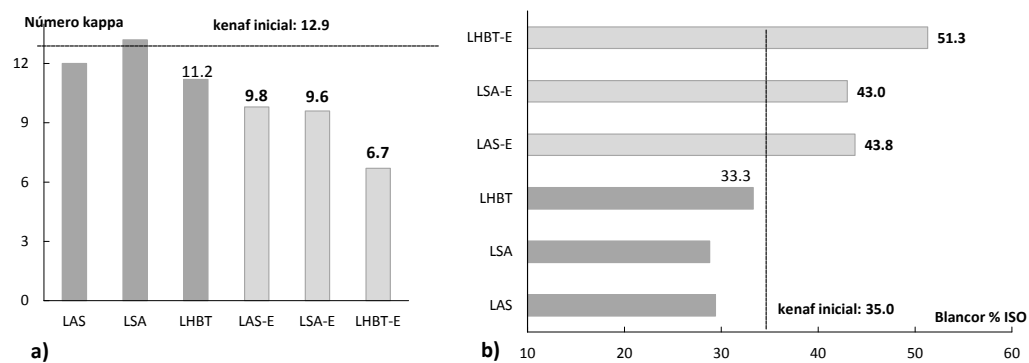


Figura 3.4. Tractament $2_2L_{M3}E$: Canvis en el número kappa (a) i blancor (b) de la pasta de kenaf tractada amb lacasa i els diferents sistemes lacasa-mediador. La línia de punts assenyala els valors corresponents a la pasta de kenaf inicial.

La disminució de la blancor està acompanyada d'un efecte negatiu en els valors de les propietats òptiques estudiades. Les corbes de reflectància per les mostres de pasta tractades amb els dos mediadors naturals en aquesta etapa estan per sota de la corba corresponent a la pasta inicial (Figura 3.5).

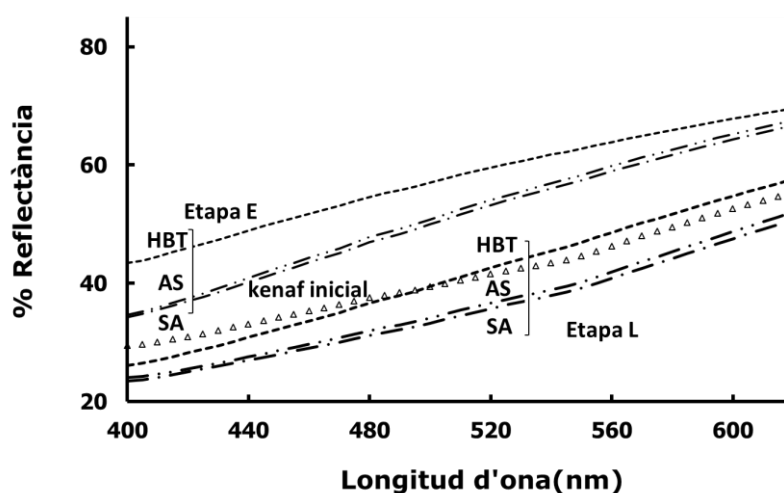


Figura 3.5. Corbes de reflectància de les mostres de kenaf després de les etapes L i E del tractament $2_2L_{M3}E$ amb els diferents sistemes lacasa-mediador (HBT, AS i SA) i la corba de reflectància de la pasta de kenaf inicial.

Aquest efecte negatiu s'observa també en els valors del percentatge de disminució d'àrea (PDA) en correspondència amb les àrees k/s determinades que es presenten a la següent taula (Taula 3.1):

	kenaf	L_{AS}	L_{SA}	L_{HBT}	$L_{AS}E$	$L_{SA}E$	$L_{HBT}E$
k/s area	112.43	151.2	159.2	115.7	61.6	64.6	41.9
PDA	-	-34.5	-41.6	-3.0	45.2	42.5	62.7

Taula 3.1. Tractament $2_2L_{M3}E$: àrea k/s i percentatge de disminució d'àrea (PDA) de la pasta de kenaf després del blanqueig amb lacasa assistida per diferents mediadores ; etapa L i seqüència LE.

Els valors negatius en el PDA donats pels mediadors AS (-34.5%) i SA (-41.6%) manifesten la formació de grups cromòfors durant el tractament enzimàtic. Un efecte similar ha sigut prèviament observat en els tractaments enzimàtics de pastes kraft

Capítol 3

d'eucaliptus (Moldes et al., 2008), sisal (Aracri et al., 2009) i lli (Fillat et al., 2010) amb diferents mediadors naturals.

Finalment, el pH bàsic de l'etapa E aplicada al final de la seqüència facilita la dissolució de la lignina modificada durant l'etapa enzimàtica; en conseqüència s'observa una efectiva deslignificació i un augment de blancor en totes les mostres de pasta tractades. La pasta tractada amb HBT va presentar una substancial deslignificació (el seu número kappa es va reduir 6.2 punts) i el major augment de blancor (16 punts més alta), en relació al kenaf inicial (Figura 3.4 : a i b). Aquest mediador també presenta la corba de reflectància amb els valors més alts (Figura 3.5) indicatiu d'una millor eliminació de color. Els mediadors naturals AS i SA donen valors similars pel número kappa i la blancor com queda palès en la Figura 3.4.

El favorable efecte de l'aplicació dels mediadors en el tractament es veu reflectit, també, en la disminució dels valors de l'àrea k/s i l'augment del PDA després de l'aplicació de l'etapa E (Taula 3.1). Aquests resultats evidencien que la modificació de la lignina durant la aplicació del sistema lacasa-mediador facilita la seva posterior solubilització en el medi bàsic de l'etapa aplicada.

3.3.2 Efecte dels mediadors naturals en l'etapa enzimàtica (Etapa L)

L'efecte del sistema lacasa-mediador per als cinc mediadors naturals va ser investigat en el tractament 2_4L_{M3} , a fi i efecte de determinar la influència concreta de cadascun d'ells en l'etapa enzimàtica. La Figura 3.6 presenta els resultats obtinguts pel número kappa i la blancor de les mostres tractades amb els diferents mediadors després de l'etapa L. Com es pot veure, de nou tots els mediadors naturals (especialment, PC, V i AV) augmenten el número kappa de la pasta (Figura 3.6 : a). L'HBT va ser l'únic que el va reduir (en 1.4 unitats) amb respecte al tractament amb el control lacasa. Aquest augment en els valors del número kappa com a resultat del tractament enzimàtic suggereix la condensació parcial dels mediadors amb les fibres del kenaf via els radicals fenoxi formats per oxidació dels diferents fenols utilitzats. Aquests radicals són les formes actives dels mediadors en les reaccions d'oxidació i d'empelt ("grafting") de la lignina (Chandra i Tagauskas, 2002). Una comparació de l'estructura

química dels mediadors utilitzats (Figura 1.8) revela la presència de dos grups metoxi (-OCH₃) al voltant del grup fenòlic en AS i SA, només un en V i AV, i cap en el cas del PC. El grup fenòlic en l'AS i SA està parcialment protegit (factors estèrics) en relació al V, AV i PC; com a resultat, les seves mostres respectives presenten un número kappa més petit després de l'etapa L.

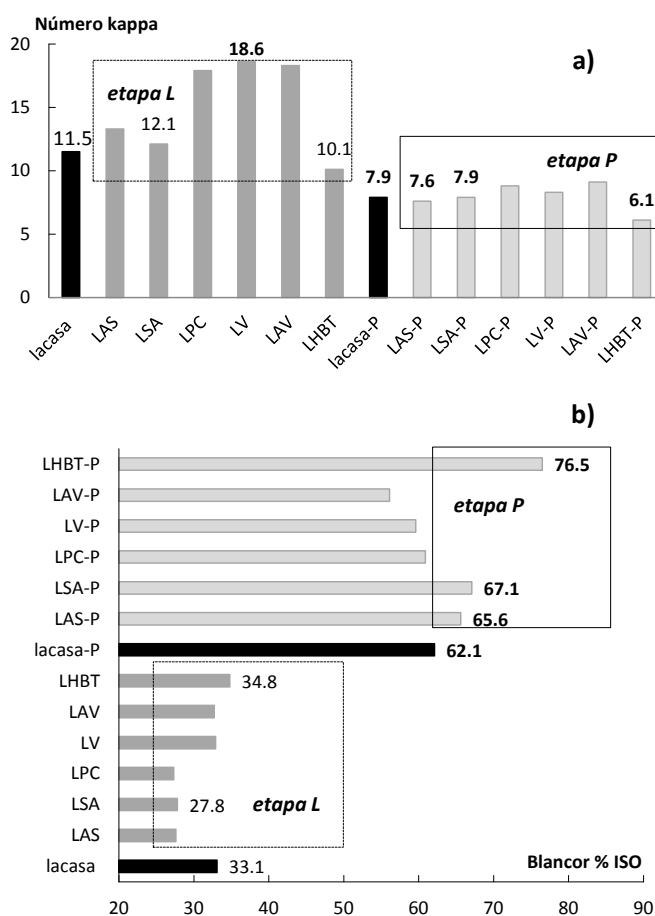


Figura 3.6. Tractament 2₄L_{M3}P: Canvis en el número kappa (a) i blancor (b) de la pasta de kenaf tractada amb lacasa i els diferents mediadors. El control lacasa correspon al tractament sense mediador.

Tots els mediadors naturals, però especialment AS, SA i PC, redueixen la blancor respecte al control després de l'etapa enzimàtica (Figura 3.6 : b); només l'HBT augmenta la blancor (1.7 punts després d'aquesta etapa).

Capítol 3

L'etapa enzimàtica va augmentar els grups cromòfors en les mostres de pasta tractades amb AS, SA i PC, a la vista dels valors obtinguts pel PDA: - 52.6% , -52.3% i -34.1% respectivament; de nou només la mostra tractada amb HBT va presentar una disminució en el valor d'aquest paràmetre (Taula 3.2.a).

	kenaf	lacasa	AS	SA	PC	V	AV	HBT
<i>(a) Etapa L</i>								
k/s area	112.43	122.1	171.6	171.3	150.8	124.4	123.8	104.5
PDA		-8.6	-52.6	-52.3	-34.1	-10.6	-10.1	7.0
<i>(b) Etapes L + P</i>								
k/s area	112.43	18.7	14.9	13.3	20.4	28.2	22.3	6.6
PDA		83.4	86.7	88.2	81.9	74.9	80.2	94.2

Taula 3.2. Tractament $2_4L_{M3}P$: àrea k/s i percentatge de disminució d'àrea (PDA) de la pasta de kenaf tractada amb els diferents sistemes lacasa-mediador després de la etapa enzimàtica (a) i al final del tractament (b).

A la llum d'aquests resultats, es pot constatar que l'efecte de l'aplicació del sistema lacasa-mediador depèn d'un balanç entre diferents reaccions que tenen lloc durant l'etapa enzimàtica : i) degradació oxidativa de la lignina, ii) reaccions d'empelt dels mediadors amb la lignina (Astolfi et al. 2005), iii) possibles condensacions entre els radicals fenoxi. Així, els valors finals del número kappa, la blancor i les propietats òptiques de la pasta de kenaf tractada depenen de l'estructura química del mediador utilitzat.

3.3.3 Influència del peròxid d'hidrogen (Etapa P)

Com es conegut, el peròxid d'hidrogen es un efectiu agent de blanqueig, al mateix temps que un eficient agent deslignificador utilitzat en les seqüències de blanqueig totalment lliures de clor (Leoperoni i Ulrich, 2002). El peròxid d'hidrogen acaba d'oxidar la lignina residual present a la pasta i el pH bàsic utilitzat en el tractament facilita la seva dissolució. D'altra banda, la tendència dels mediadors naturals d'enllaçar-se amb les fibres aconsella finalitzar el tractament enzimàtic amb una etapa P (Fillat i Roncero, 2010). El peròxid d'hidrogen també s'ha mostrat efectiu per

eliminar les partícules fosques no fibroses presents en la pasta de kenaf (Ström et al., 1998; de la Rosa, 2003).

Els valors obtinguts en el número kappa i blancor després de la aplicació de l'etapa P es presenten remarcats com dita etapa a la Figura 3.6. Les mostres tractades amb l'HBT presenten el número kappa més petit (1.8 punts més baix que el control lacasa). Els millors resultats pels mediadors naturals es van obtenir per l'AS i el SA; per aquests dos mediadors el valor del número kappa fou similar al del tractament de control. Els mediadors augmenten la blancor (% punts ISO) respecte al control lacasa: 14.4 punts per l'HBT, 5.0 punts el SA i 3.5 punts AS.

Per altra banda, l'etapa P té un important efecte en l'oxidació i dissolució de les espècies cromofòriques tal com queda reflectit amb els valors presentats en la Taula 3.2.b; i aquest efecte depèn en concret del mediador utilitzat. Els elevats valors positius en el PDA que es van obtenir pels mediadors naturals AS (86.7%), SA (88.2%), i el màxim de tots per l'HBT (94.2%) demostren l'eficiència de l'aplicació conjunta del sistema lacasa-mediador i la posterior addició de peròxid en el blanqueig de la pasta de kenaf.

Els valors de la reflectància de les mostres obtinguts després de l'etapa L és van restar dels obtinguts al finalitzar l'etapa P; la figura 3.7 representa aquesta diferència (ΔR) front a la longitud d'ona d'acord amb la proposta de Moldes et al., 2008.

Els resultats mostren un similar comportament pels mediadors naturals amb similar estructura: AS-SA, V-AV i PC. En els experiments amb els mediadors AS i SA, els màxims valors per les ΔR respectives es van detectar entre 510 nm i 530 nm. Aquest fet suggereix que el peròxid d'hidrogen durant l'etapa P es consumeix principalment en l'oxidació de grups cromòfors que no afecten al valor de la blancor. Un comportament especial s'observa pel mediador PC; el màxim del valor de la ΔR es detecta al voltant de 450 nm i és inferior que per la resta dels altres mediadors. Aquest comportament es perceptible en el color groc que presenten les formetes després del tractament enzimàtic amb aquest mediador.

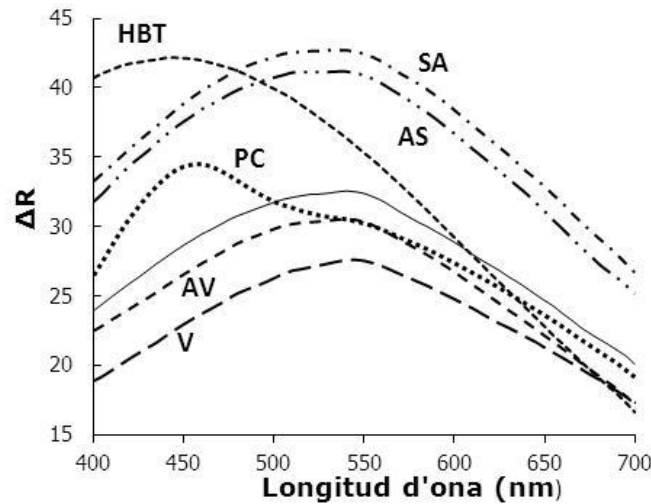


Figura 3.7. Diferència de les corbes de reflectància entre les etapes L i P del kenaf tractat amb els diferents sistemes lacasa-mediador. La línia contínua correspon al control lacasa.

A la mateixa figura s'observa el diferent comportament després del tractament realitzat amb l'HBT. Per aquest mediador, el màxim de ΔR s'observa entre 440 nm i 460 nm indicant que el peròxid durant l'etapa P oxida els grups cromòfors que afecten a la blancor (recordem que la blancor ISO és una mesura de la reflectància a 457 nm).

Aquests resultats posen de manifest el diferent grau de modificació de les propietats òptiques de la pasta durant el tractament enzimàtic i emfatitzen la influència del mediador utilitzat en el mateix.

3.3.4 Dosificació del mediador i caracterització d'efluents

Es va dur a terme un nou tractament enzimàtic amb menor quantitat de mediador per determinar la seva influència en les propietats finals de la pasta. Les condicions operatives varen ser idèntiques a les del tractament 2₄, excepte que la quantitat de mediador va ser 1.5% (g.p.s). La pasta va ser tractada amb els mediadors AS i SA; després de l'etapa enzimàtica es va realitzar la mateixa etapa P que en els tractaments anteriors. La Taula 3.3 resumeix els valors del número kappa, blancor i percentatge de disminució d'àrea obtinguts després de les etapes enzimàtica L i a la finalització del tractament (Etapes L + P) amb les dues diferents dosis de mediador.

Efectes del sistema lacasa-mediador natural en la pasta de kenaf

	<i>Etapa L</i>				<i>Etapas L + P</i>			
	<i>AS₃</i>	<i>AS_{1.5}</i>	<i>SA₃</i>	<i>SA_{1.5}</i>	<i>AS₃</i>	<i>AS_{1.5}</i>	<i>SA₃</i>	<i>SA_{1.5}</i>
Número kappa	13.3	11.9	12.1	13.3	7.6	7.1	7.9	7.6
Blancor (% ISO)	27.4	27.6	27.2	27.8	65.6	67.8	67.1	71.0
PDA	-52.6	-53.7	-52.3	-56.3	86.7	88.5	88.1	91.0

Taula 3.3. Número kappa, blancor i percentatge de disminució d'àrea (PDA) de la pasta de kenaf tractada amb els sistemes lacasa-AS i lacasa-SA i dues diferents dosis de mediador (3% i 1.5%).

Els millors valors obtinguts per aquestes propietats amb la menor dosi de mediador després de l'etapa P, porta a considerar fer extensiu per a tots els mediadors estudiats, un nou tractament enzimàtic amb una quantitat de 1.5% (g.p.s.) de mediador.

La caracterització d'efluents aporta també informació sobre el grau d'extensió del tractament enzimàtic durant l'aplicació del sistema lacasa-mediador. Els valors obtinguts en la Demanda Química d'Oxigen (DQO) i el color dels efluents estan resumits a la Taula 3.4.

Així, els valors més alts de DQO obtinguts en els efluents respecte al control és resultat de l'augment de concentració de les formes oxidades de les diferents espècies químiques dissoltes durant el tractament.

	lacasa	AS₃	AS_{1.5}	SA₃	SA_{1.5}
DQO (kg O₂/t_{pulp})	177±16	401±24	254±17	341±7	238±1
Color (kg Pt/t_{pulp})	16±1	120±18	63±3	76±20	50±4

Taula 3.4. Valors de la Demanda Química d'Oxigen i color dels efluents obtinguts per les pastes tractades en l'etapa L amb del sistemes lacasa-AS i lacasa-SA per diferents quantitats de mediador.

En els tractaments enzimàtics realitzats amb un 3.0% de mediador, l'excedent de mediador sembla contribuir significativament al valor de la DQO ja que és aproximadament dues vegades més alt que quan s'utilitza un 1.5% de mediador.

El color d'un efluent depèn també de la naturalesa i concentració de les espècies químiques presents. L'augment de color obtingut respecte del control, pot ser degut a la presència d'espècies cromòfores resultants de l'oxidació i/o degradació de la lignina i dels mediadors (Fillat i Roncero, 2009b, 2010; Aracri et al. 2009). Els valors més alts de color dels efluents, obtinguts en ambdós casos amb la quantitat de mediador més alta, suggereixen de nou la presència d'un excés de mediador en el tractament

Capítol 3

enzimàtic amb un 3% (g.p.s) de mediador. Aquests resultats reforcen la idea de la utilització de la menor quantitat de mediador 1.5% (g.p.s) en l'etapa enzimàtica.

3.4 Conclusions

Els resultats obtinguts en la seqüència de blanqueig $2_4L_{M3-(M1.5)}$ descrita en aquest capítol ens porta a considerar que:

- El mediador sintètic 1-hidroxibenzotriazol va ser el millor en termes d'eficiència en la deslignificació, blancor i propietats òptiques de la pasta i remarca el potencial d'aquest mediador pel bioblanqueig de la pasta de kenaf.
- L'acetosiringona i el siringaldehid van resultar ser els mediadors naturals més eficaços com agents deslignificadors. Els altres tres mediadors (acetovainollona, vainillina i àcid p-cumàric) demostren una menor eficiència que el control lacasa en la seqüència de blanqueig assajada.
- Les propietats finals de la pasta depenen de l'estructura química del mediador natural utilitzat ja que aquest condiciona les reaccions que poden tenir lloc durant el tractament enzimàtic.

Finalment, i basant-se en aquests resultats per la continuació del treball experimental es planteja una nova seqüència de blanqueig per la pasta de kenaf. Aquests nou tractament consta de dues etapes: i) una etapa enzimàtica amb un 1.5% (g.p.s.) de mediador; ii) i la subseqüent etapa amb peròxid d'hidrogen.

Els resultats obtinguts en l'aplicació d'aquest tractament, que es fa extensiu als cinc mediadors naturals: l'acetosiringona, el siringaldehid, l'acetovainillona, la vainillina i l'àcid p-cumàric així com a l'1-hidroxibenzotriazol, es presenten en el Capítol 5 de la memòria.

3.5 Bibliografia

Aracri, E., Colom, J.F., Vidal, T., 2009. Application of laccase-natural mediator systems to sisal pulp: an effective approach to biobleaching or functionalizing pulp fibres?. *Bioresource Technology* 100, 5911–5916.

Astolfi, P., Brandi, P., Galli, C., Gentili, P., Gerini, M.F., Greci, L., Lanzalunga, O., 2005. New mediators for the enzyme laccase: mechanistic features and selectivity in the oxidation of non-phenolic substrates. *New Journal Chemistry* 29, 1308–1317.

Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, M.G., 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *BBA General Subjects* 1379, 381-390.

Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J., Martínez, A.T., 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1775–1784.

Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, A.T., Romero, J., Gutiérrez, A., del Río, J.C., 2007. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1264–1271.

Chandra, R.P., Ragauskas, A.J., 2002. Evaluating laccase-facilitated coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology* 30, 855–861.

de la Rosa A., 2003. Utilización papelera de fibras no madereras (kenaf y *Miscanthus sinensis*). Estudio de les secuencias ECF y TCF. Tesis doctoral. UPC, Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera.

Fillat A., Colom, J.F., Vidal T., 2010. A new approach to the biobleaching of flax pulp with laccase using natural mediators. *Bioresource Technology* 101, 4104–4110.

Fillat, U., Roncero, M.B., 2009b. Effect of process parameters in laccase mediator system delignification of flax pulp. Part II: impact on effluents properties. *Biochemical Engineering Journal*. 152, 330–338.

Fillat, U., Roncero, M.B., 2010. Optimization of laccase mediator system in producing biobleached flax pulp. *Bioresource Technology* 101, 181–187.

Gutiérrez, A., Rencoret, J., Ibarra, D., Molina, S., Camarero, S., Romero, J., del Río, J.C., Martínez, A.T., 2007. Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environmental Science. Technology* 41, 4124–4129.

Capítol 3

Holberg, M., 2000. Dyes and fluorescent whitening agents. Neimo, L. (ed.). Papermaking Chemistry, Helsinki: Tappi Press, vol. 4.

Jordan, B. 1996. The Properties of Bleached Pulp. Brightness: Basic Principles and Measurement. Dence, C. W. and Reeve, D. W., (ed.). Pulp Bleaching - Principles and Practice. Atlanta: Tappi Press. 695-716

Moldes, D., Díaz, M., Tzanov, T., Vidal, T., 2008. Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Bioresource Technology* 99, 7959–7965.

Shleev, S., Persson, P., Shumakovich, G., Mazhugo, Y., Yaropolov, A., Ruzgas, T., Gorton, L., 2006. Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 841–847.

Ström, M., Bergnor-Gidnert, E., Mellender, P., 1998. Shave and knot elimination with TCF and ECF bleaching sequences. *Tappi Journal* 81(6), 163-169.

Valls, C., Roncero, M.B., 2009. Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. *Bioresource Technology* 100, 2032–2039.

Capítol 4

CAPACITAT OXIDATIVA DEL SISTEMA LACASA-MEDIADOR: PAPER DELS MEDIADORS

RESUM

Paral·lelament al primer tractament enzimàtic descrit en el capítol anterior, es va realitzar el seguiment de la capacitat oxidativa de les diferents dissolucions lacasa-mediador dels compostos fenòlics utilitzats com a mediadors en la present tesi. Les dissolucions de lacasa sense mediador (control) i 1-hidroxibenzotriazol van ser també objecte d'estudi per ser utilitzats com a referent del comportament de les dissolucions fenòliques. L'essència d'aquesta part del treball d'investigació està lligada a la possibilitat de determinar a priori un mediador eficient com ajudant de la lacasa en l'oxidació de la lignina (de kenaf). Es va determinar també la variació de la capacitat oxidativa de la mescla de reacció durant l'aplicació de l'etapa enzimàtica: kenaf / lacasa-mediador pels compostos fenòlics subjectes a estudi. La capacitat oxidativa fou determinada mesurant el potencial d'oxidació-reducció (ORP) durant un determinat temps d'experimentació en el cas de les dissolucions lacasa-mediador i al llarg del temps d'aplicació del tractament enzimàtic pels diferents sistemes kenaf/lacasa-mediador. Els resultats presentats en el capítol ajuden a discernir el paper que juguen els diferents mediador en l'etapa enzimàtica, en funció de la facilitat de formació i capacitat reactiva del particular radical fenoxi format; en definitiva en funció de l'estructura química del mediador utilitzat.

4.1 Introducció

La utilització de mediadors en un tractament enzimàtic està relacionada amb el relatiu baix potencial de reducció de les lacases, concretat en un interval de 0.5 i 0.8 Volts (Gianfreda et al., 1999). Les lacases poden catalitzar l'oxidació de diferents substrats fenòlics de la lignina però no així de les unitats no fenòliques de la mateixa, ja que aquestes presenten un potencial superior a 1.5 Volts (Galli i Gentili, 2004). Cal també considerar que la grandària molecular de les lacases (MW ~ 70.000 - Bourbonnais et al., 1997) els impedeix una bona penetració en les fibres: en el sistema lacasa-mediador, la lacasa oxida primerament al mediador, i és el radical format el que es difon per la paret cel·lular oxidant a la lignina més inaccessible.

La lacasa actua sobre els compostos fenòlics per catalitzar l'oxidació del grup fenòlic i formar el corresponent radical fenoxi mentre que l'oxigen molecular (O_2) es redueix a aigua d'acord amb la figura 4.1 (Riva, 2006). L'oxidació del compost fenòlic al seu corresponent radical es veu afavorida per la facilitat de formació de l'ió fenolat ($Ph-O^-$): Figura 4.1 **): la presència de substituents donadors d'electrons (grups metoxi) en l'anell benzènic facilita la pèrdua del protó.

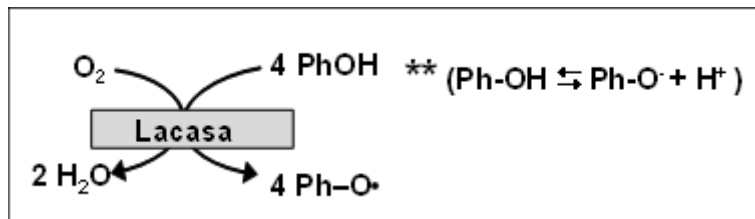


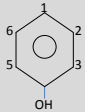
Figura 4.1. Formació de l'ió fenolat (**) i oxidació del compost fenòlic per l'acció de la lacasa.

Per altra banda, el valor del potencial d'oxidació-reducció és un paràmetre clau per valorar la capacitat oxidativa en un procés d'oxidació (Wareham et al., 1993); i el seu seguiment s'ha postulat com una bona tècnica per determinar l'eficiència oxidativa en diferents processos (Lin i Ma, 2000). L'aplicació d'aquesta tècnica podria ser utilitzada com a eina predictiva (elecció del mediador) si es trobés una bona correlació

entre la capacitat oxidativa de la mescla de reacció enzimàtica i les propietats finals de la pasta blanquejada.

4.2 Materials i mètodes

La lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* (*PcL*) (apartat 2.2.1) va ser utilitzada com catalitzador en l'oxidació dels cinc compostos fenòlics assajats en aquesta tesi i descrits a la Taula 4.1. El sistema *PcL*-mediador descrit s'aplica al bioblanqueig d'un kenaf (*Hibiscus cannabinus*) de procedència xinesa amb un 12.9 de número kappa i 35.0% de blancor determinats per la pasta inicial no blanquejada.

	AS	SA	AV	V	PC
Grup en posició 1	aldehid	cetona	aldehid	cetona	àcid
Grup en posició 3	metoxi	metoxi	metoxi	metoxi	---
Grup en posició 5	metoxi	metoxi	---	---	---

Taula 4.1. Compostos fenòlics utilitzats com mediadors i els seus diferents grups funcionals: acetosiringona (AS), sirungaldehid (SA), acetovainillona (AV), vainillina (V) i àcid p-cumàric (PC). El carboni 4 és el C_{fenòlic}

Un elèctrode de plata-clorur de plata (Ag / AgCl) de Metrohm va ser utilitzat com a elèctrode de referència per la mesura dels potencials d'oxidació-reducció. Aquests potencials es van enregistrar durant les dues hores de l'aplicació del tractament enzimàtic $I_{2L_{M3}}$, les condicions del qual són:

- **Tractament $I_{2L_{M3}}$:** 2 grams de pasta seca al 1% de consistència, 20 unitats enzim (*PcL*)/g.p.s. i un 3% mediador (g.p.s.). Les experiències es realitzen en un reactor obert col·locat en un bany termostàtic (30°C) amb agitació durant 2 hores, saturació d'O₂ i a pH=4 (dissolució amortidora d'àcid tartàric/tartrat de sodi).

Prèviament, es va monitoritzar amb el mateix procediment experimental els potencials corresponents a les dissolucions de lacasa, lacasa-compostos fenòlics i lacasa-HBT en absència de pasta de kenaf. La concentració de les dissolucions de mediadors va ser de 20 mmol·L⁻¹ i el seguiment es va dur a terme durant un temps de 3000 segons.

Després del tractament enzimàtic la pasta es va filtrar, rentar amb aigua desionitzada i finalment es va sotmetre a una extracció alcalina (Etapa E: apartat 2.4) completant la seqüència $1_2L_{M3}E$ descrita en l'apartat 3.2. de la memòria.

4.2.1 Càlcul de les energies dels orbitals moleculars (E_{HOMO})

La determinació dels valors d'energia de l'orbital molecular de major energia ocupat en els compostos fenòlics es va dur a terme mitjançant el mètode AM1 de l'aplicació MOPAC del programa Chem3D Ultra 11.0. Aquest càlcul es va dur a terme al "*Departamento de Ingeniería Química, Físico Química y Química Orgánica de la Universidad de Huelva*" com part de la col·laboració establerta amb aquest grup de recerca dintre del projecte BIOFIBRECELL(CTQ2010-20238-12904).

4.3 Resultats i discussió

4.3.1 Potencial d'oxidació-reducció de les dissolucions lacasa amb els compostos fenòlics

En aquest apartat es presenten els resultats obtinguts en el seguiment dels valors del potencial d'oxidació-reducció durant el procés experimental per les dissolucions de lacasa amb cada mediador natural, lacasa-HBT i la dissolució de lacasa (control). La seqüència operativa del procés va seguir el procediment següent: en un reactor obert (vas de precipitats) es va afegir O_2 (fins a saturació) / *PcL* / mediador, als 500/1000 i 1200 segons respectivament. La figura 4.2 mostra els resultats dels valors mesurats pel potencial d'oxidació-reducció durant el transcurs dels diferents processos.

L'augment en els valors del potencial d'oxidació-reducció (ORP) en afegir els mediadors naturals a la dissolució, s'explica per la generació del corresponent radical fenoxi, tal com s'ha descrit en la figura 4.1. D'altra banda l'ordre d'aquests augments (AS >SA>AV>V>PC) entre 1200 i 1500 segons després de l'addició del mediador està d'acord amb la presència en l'anell aromàtic de grups metoxi en posicions *orto*: dos metoxi en l'acetosiringona i el siringaldehid, un grup en l'acetovainillona i la vainillina, i cap en l'àcid p-cumàric.

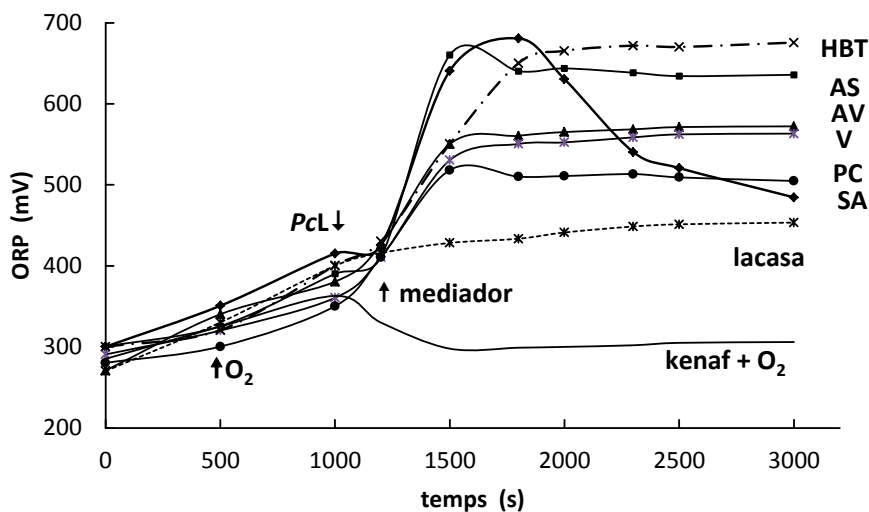


Figura 4.2. Valors del potencial d'oxidació-reducció en front al temps durant el procés oxidatiu per les diferents dissolucions: lacasa, compostos fenòlics i HBT.

Aquest augment és indicatiu de la facilitat de formació del corresponent radical fenoxi i està en concordança amb els valors determinats pels orbitals E_{HOMO} (taula 4.2):

	E_{HOMO} (eV)
AS	-10.99
SA	-11.02
AV	-11.50
V	-11.62
PC	-12.36
HBT	-7.78

Taula 4.2. Energies dels HOMO (orbitals moleculars) dels mediadors naturals i el HBT d'acord amb A.G. Barneto et al. 2012.

La formació del radical és tant més fàcil quant menor sigui el potencial d'ionització de l'electró que s'ha d'extreure i es correspon amb la presència de grups metoxi en les posicions orto de l'anell benzènic que faciliten la pèrdua del protó (H^+), pas previ per la formació del radical corresponent.

A la Figura 4.2 està també representada la variació del potencial d'oxidació-reducció de la dissolució de l'1-hidroxibenzotriazol. La lacasa catalitza també l'oxidació dels compostos N-OH segons: $N-OH \rightarrow N-O^{\bullet} + e^{-} + H^{+}$, mecanisme descrit per Astolfi et al. 2005. La formació del radical $N-O^{\bullet}$ comporta doncs un augment de la capacitat oxidativa de la dissolució d'aquest mediador, com es posa de manifest a la Figura 4.2.

A la taula 4.3 es presenta el valor mig del potencial d'oxidació-reducció (calculat entre 1200 i 3000 segons del procés) i el % d'increment d'aquest valor en relació a la lacasa per les dissolucions de cada mediador. Aquest resultats experimentals indiquen que les dissolucions dels mediadors AS i HBT són les que presenten una major capacitat oxidativa d'acord amb el tant per cent d'increment calculat.

	Valor mig ORP (mV)	% increment del ORP mig (en relació a la lacasa)
lacasa	438.9	-
AS	609.1	38.8
SA	560.5	27.7
AV	544.9	24.1
V	532.6	21.4
PC	505.7	15.2
HBT	616.3	40.4

Taula 4.3. Valor mig del potencial d'oxidació-reducció de les diferents dissolucions (calculat entre 1200 i 3000 segons) i el seu increment en relació a la dissolució de lacasa.

Un estudi de la variació de la relació ORP, pels diferents mediadors durant el procés oxidatiu de les seves dissolucions amb lacasa, és d'ajuda per interpretar el diferent comportament dels mediadors assajats. Aquesta relació es va calcular com:

$$\text{Relació ORP} = [(ORP)_t - (ORP)_{1200}] / (ORP)_{1200} \quad \text{Equació 4.1}$$

on $(ORP)_t$ és el valor mesurat a temps t, i $(ORP)_{1200}$ és el valor mesurat en el temps corresponent a l'addició de mediador.

La figura següent mostra la relació ORP per cadascuna de les dissolucions calculada als 1500, 1800, 2000, 2500 i 3000 segons (evolució del temps en vertical) del procés oxidatiu.

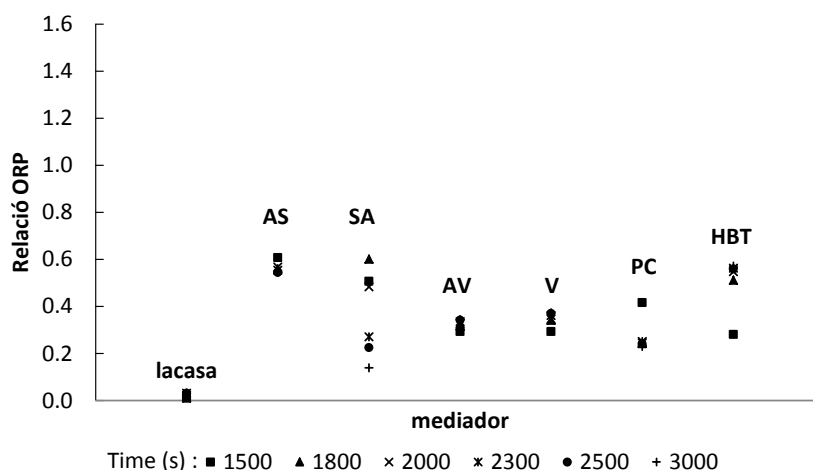


Figura 4.3. Variació de la relació ORP amb els temps assenyalats en el procés oxidatiu de la dissolució de lacasa i les dissolucions de lacasa amb els diferents mediadors.

Com es veu a la figura, la dissolució lacasa (control) va mantenir la relació ORP constant al llarg del temps; observant-se un diferent comportament per les dissolucions dels compostos fenòlics així com per la dissolució de l'HBT. La dissolució de SA presenta valors molts dispersos de la relació ORP durant el transcurs del procés; en contrast, els valors per la dissolució d'AS no tenen tanta variabilitat i són quantitativament més elevats. Les dissolucions d'AV i V tenen un comportament similar: els seus valors de la relació ORP són moderats i relativament constants durant el temps monitoritzat. La dissolució de PC presenta el valor més alt als 1500 segons (primera lectura) per disminuir posteriorment. Finalment, la dissolució d'HBT presenta els valors més alts de la relació ORP al final del procés. Aquesta variabilitat en el potencial d'oxidació-reducció durant el procés oxidatiu pot ser degut a la disminució de la concentració dels radicals fenoxi en la mescla reactiva durant el transcurs del mateix. Els radicals fenoxi formats poden presentar diferents reaccions de condensació; així en el cas dels mediadors AV i V la condensació dels seus

respectius radicals pot tenir lloc per la formació de enllaços intermoleculars $C_5-C'_5$ i $C_5-C'_2$ (C'_6) (Tanaka et al., 2010; Mikolasch i Schauer, 2009; i Kudanga et al., 2011); el mateix enllaç podria considerar-se en el cas dels radicals fenoxi de l'àcid p-cumàric. L'enllaç intermolecular format pels radicals fenoxi dels mediadors AS i SA està obligat a ser $C_{\text{fenòlic}}-O-C'_{\text{fenòlic}}$ ja que els dos compostos tenen les posicions orto de l'anell ocupades per grups metoxi (Bollag et al., 1992). D'acord amb aquest mateix autor el radical del SA pot enllaçar-se també com $C_{\text{fenòlic}}-O-C'_1$ prèvia oxidació del grup aldehid (C_1) a àcid; aquesta particularitat podria ser la causa de la gran variabilitat del valor de la relació ORP durant el procés oxidatiu. La formació d'aquests compostos condensats justificaria, doncs, les variacions de la capacitat oxidativa en funció del mediador utilitzat. A més a més, la diferent estabilitat presentada pels radicals fenoxi ha estat contrastada en diversos estudis electroquímics (Diaz et al., 2009). Per altra banda, el radical N-O \cdot està descrit a la bibliografia com menys actiu però més estable que els radicals fenoxi (Xu et al., 2000); com es veu a la Figura 4.2 el sostingut increment exponencial de la relació ORP i els seus valors més alts al final del procés semblen confirmar aquesta descripció.

4.3.2 Potencial d'oxidació-reducció del sistema lacasa-mediador en presència de la pasta de kenaf

El mateix procediment experimental es va realitzar pels sis sistemes lacasa-mediador, i lacasa sola en presència de pasta de kenaf. L'experimentació es va dur a terme en un reactor obert d'acord amb les condicions descrites en l'apartat de Materials i Mètodes d'aquest capítol. El tractament enzimàtic va iniciar-se amb la pasta i l'enzim en el reactor fins a saturació d'oxigen. El mediador es va afegir als 500 segons i es va fer el seguiment de la capacitat oxidativa durant les dues hores de tractament enzimàtic.

L'evolució del potencial redox pels diferents sistemes kenaf/lacasa-mediador assajats i pel kenaf/lacasa (sense cap mediador) es presenta a la Figura 4.4. Com mostra dita figura, en l'estadi final del tractament enzimàtic (6000-7200 segons) la capacitat oxidativa dels diferents sistema lacasa-mediador segueix el següent ordre : HBT > AS > AV > lacasa~ V~ SA > PC.

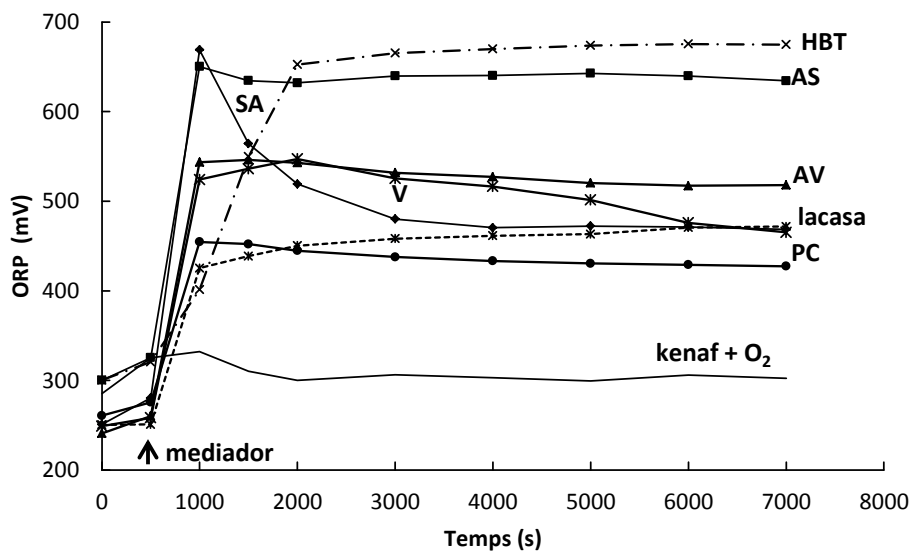


Figura 4.4. Valors del potencial d'oxidació-reducció en front al temps durant el procés oxidatiu del kenaf pels diferents sistemes lacasa-mediador i el control lacasa

La variació de la relació ORP ajuda en la interpretació del desenvolupament del procés enzimàtic en funció del mediador utilitzat. La figura 4.5 presenta la variació d'aquesta relació calculada a 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000 segons (evolució del temps a la figura en vertical) en el procés enzimàtic d'oxidació del kenaf per la lacasa i els diferents sistema lacasa-mediador.

Com primer fet important cal destacar l'augment del valor de la relació ORP per tots els mediadors naturals i el control tal com es veu a la figura esmentada en comparació als obtinguts en absència de kenaf (Figura 4.3), indicant aquest fet que la presència de la pasta augmenta la capacitat oxidativa de la mescla de reacció. El resultat suggereix que l'estructura química de la lignina de la matèria prima utilitzada juga també un paper important durant el tractament enzimàtic. En concret, la pasta del kenaf xinès utilitzat presenta una relació molar unitats siríngil/unitats guayacil de 3.3 (de la Rosa 2003); i per altra banda s'ha determinat que en fibres de kenaf similars a l'utilitzat les unitats H de la lignina derivades dels compostos p-hidroxifenil es troben en quantitat de traces (Gutiérrez et al., 2004).

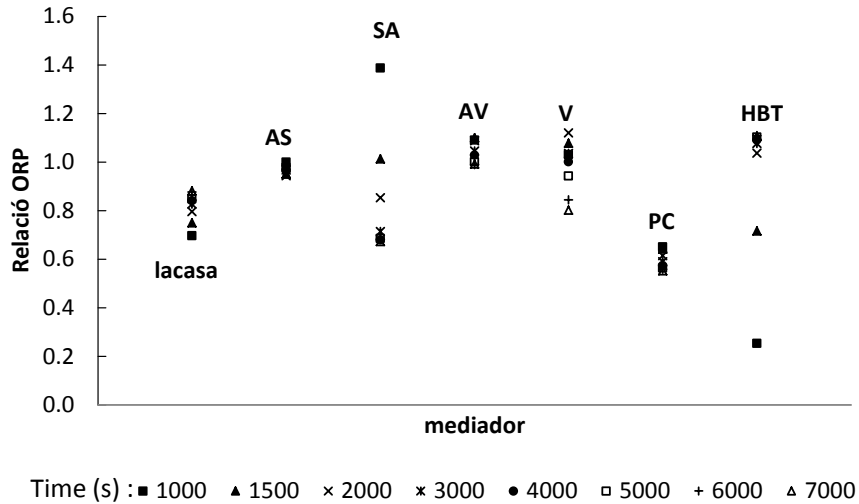


Figura 4.5. Variació de la relació ORP amb els temps assenyalats en el procés enzimàtic d'oxidació del kenaf per la lacasa i els diferents sistema lacasa-mediador.

Aquest increment observat en la capacitat oxidativa pot ser degut a l'augment en la mescla reactiva de la concentració d'unitats siringil procedents de la degradació de la pròpia lignina (Cañas i Camarero, 2010). La incorporació d'aquestes unitats a la dissolució (actuant com mediadors) podria ser la raó del considerable augment de la capacitat oxidativa de la lacasa (*PcL*) en presència de la pasta, que cal considerar i destacar com una característica específica del kenaf en el seu tractament enzimàtic.

D'acord amb els valors de la relació ORP obtinguts, el sistema kenaf/lacasa-àcid p-cumàric es el que presenta la menor capacitat oxidativa dels assajats. Aquest menor poder oxidatiu pot ser degut a la gran capacitat que presenta el radical PC-O' per unir-se a la lignina de diferents materials lignocel·lulòsics (reaccions d'empelt) amb ajuda de la lacasa (Widsten i Kandelbauer, 2008). Fillat, 2011 ha confirmat la funcionalització de fibres de lli utilitzant el sistema lacasa-PC.

Els sistemes kenaf/lacasa amb els mediadors SA i V (compostos fenòlics amb un grup aldehid en el C₁ de l'anell aromàtic) són els que van presentar un interval de valors de la relació ORP més ampli, que pot estar relacionat amb la possible oxidació del grup aldehid durant el procés enzimàtic. Finalment, el sistema kenaf/lacasa-HBT va

presentar una evolució de la capacitat oxidativa particular i diferent, presentant de nou els valors més alts per la relació ORP al final del procés enzimàtic.

Basant-nos en aquesta discussió de resultats es pot dir que la naturalesa i l'estabilitat de les espècies intermèdies formades durant l'etapa enzimàtica depenen del mediador utilitzat i condicionen la capacitat oxidativa del sistema lacasa-mediador. Les reaccions de condensació (descrites anteriorment en l'absència de pasta) i les d'empelt del mediador amb la lignina competeixen amb la degradació oxidativa afectant en funció de la seva extensió el resultat de l'aplicació del sistema enzimàtic.

4.3.3 Procés de biBlanqueig: Número kappa i blancor

A continuació es valoren els resultats obtinguts per al número kappa i la blancor al finalitzar la seqüència $1_2L_{M3}E$ en relació a la capacitat oxidativa determinada pels diferents sistema lacasa-mediador. La Figura 4.6 següent mostra els valors obtinguts per aquests dos paràmetres, després de la seqüència de blanqueig descrita, front el valor mig del potencial d'oxidació-reducció mesurat durant el tractament.

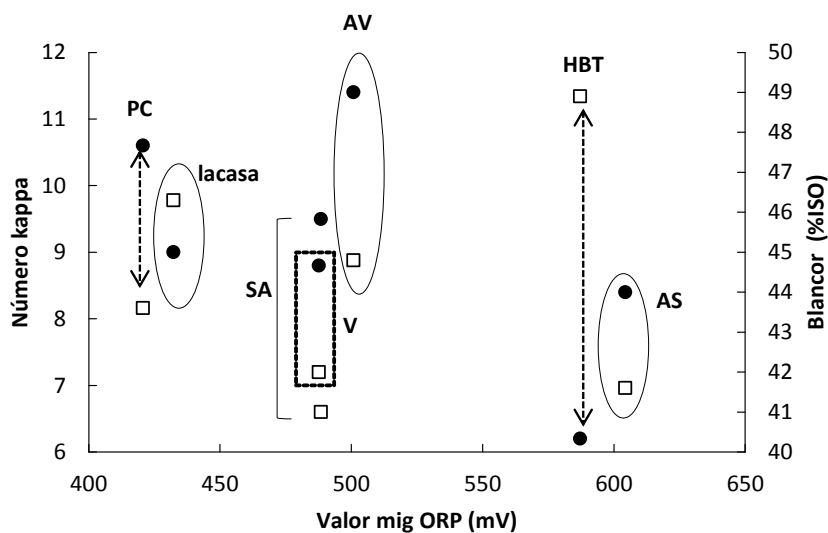


Figura 4.6. Número kappa i blancor (tractament $1_2L_{M3}E$) front al valor mig del potencial d'oxidació-reducció (interval 500-7200 segons). Els cercles plens representen els valors del número kappa i els quadrats buits els corresponents a la blancor.

En base als resultats mostrats a la figura anterior, el mediador 1-hidroxibenzotriazol destaca com el més eficient en el bioblanqueig del kenaf en concordança amb les característiques descrites pel radical N-O[•] format (menys actiu però més estable que els radicals fenoxi). La ja mencionada diferent tendència dels radicals fenoxi a realitzar reaccions de condensació i d'empelt en competència amb la degradació oxidativa de la lignina condiciona i justifica els resultats obtinguts amb els diferents mediadors naturals.

Aquestes reaccions adverses no tenen lloc durant el tractament enzimàtic només amb lacasa fet que queda reflectit en els relativament bons valors obtinguts per el número kappa i la blancor al final de la seqüència de bioblanqueig assajada.

4.4 Conclusions

L'estudi de la capacitat oxidativa del sistema lacasa-mediador realitzat permet concloure que:

- El seguiment dels potencials d'oxidació-reducció de les dissolucions dels compostos fenòlics detecta la formació de radicals fenoxi i la seva diferent capacitat reactiva posant de manifest la rellevància de la naturalesa química del mediador en l'etapa enzimàtica.
- L'aplicació del procediment : i) remarca el paper de l'estructura química de la lignina (kenaf en el treball) en el procés enzimàtic, ii) constata l'augment de la capacitat oxidativa de la lacasa en presència de pasta de kenaf.
- La utilització de la monitorització del potencial d'oxidació-reducció com eina d'elecció del mediador queda condicionada per les diferents reaccions competitives que tenen lloc durant l'etapa enzimàtica i que determinen el resultat final del tractament

Finalment considerar que la major eficiència de l'1-hidroxibenzotriazol en el tractament $1_2L_{M3}E$ pot ser deguda a que aquest mediador no presenta les reaccions adverses descrites pels mediadors naturals. Aquest millor comportament també ha sigut constatat en el tractament 2_2L_{M3} com ja s'ha ressaltat en les conclusions del Capítol 3.

4.5 Bibliografia

Astolfi, P., Brandi, P., Galli, C., Gentili, P., Gerini, M.F., Greci, L., Lanzalunga, O., 2005. New mediators for the enzyme laccase: mechanistic features and selectivity in the oxidation of non-phenolic substrates. *New Journal Chemistry* 29, 1308–1317.

Barneto, A.G., Aracri, E., Andreu, G. Vidal, T., 2012. Investigating the structure-effect relationships of various natural phenols used as laccase mediators in the biobleaching of kenaf and sisal pulps. *Bioresource Technology* 112, 327-335.

Bollag, J.-M., Myers, C.J., Minard, R.D., 1992. Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *The Science of the Total Environment* 123/124, 205-217.

Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E., Bornemans, S., 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63,4627-32.

Cañas, A.I., Camarero, S., 2010. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances* 28, 694-705.

de la Rosa, A., 2003. Utilización papelera de fibras no madereras (kenaf y *Miscanthus sinensis*) Estudio de les secuencias ECF y TCF. Tesis doctoral. UPC, Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera.

Diaz, M., Vidal, T., Tzanova, T., 2009. Electrochemical study of phenolic compounds as enhancers in laccase-catalyzed oxidative reactions. *Electroanalysis* 21 (20), 2249-2257.

Fillat, A., 2011. Flax fibre modification using enzymatic systems to obtain high-value cellulose products. PhD Thesis, UPC, Department of Textile and Paper Engineering. <http://www.tdx.cat/handle/10803/38251>

Galli, C., Gentili, P., 2004. Chemical messengers: mediated oxidations with the enzyme laccase. *Journal Physical Organic Chemistry* 17, 973-7.

Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J., 1999. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3, 1-25.

Gutiérrez, A. Rodríguez, Isabel M., del Río, J.C., 2004. Chemical characterization of lignin and lipid fractions in kenaf bast fibers used for manufacturing high-quality papers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4764-4773.

Kudanga, T., Nyanhongo, G.S., Guebitz, G.M., Burton, S., 2011. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 48, 195-208.

Lin, J-G., Ma, Y-S., 2000. Oxidation of 2-chlorophenol in water by ultrasound / Fenton method. *Journal of Environmental Engineering* 130-137.

Mikolasch, A., Schauer, F., 2009. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82, 605-624.

Riva, S., 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* 24, 219-226.

Tanaka, T., Takahashia, M., Hagino, H., Nudajimaa, S., Usuia, H., Fujiib, T., Taniguchia, M., 2010. Enzymatic oxidative polymerization of methoxyphenols. *Chemical Engineering Science* 65, 569-573.

Wareham, D.G., Hall, K.J., Mavinic, D.S., 1993. Real-time control of aerobic-anoxic sludge digestion using ORP. *Journal of Environmental Engineering, ASCE* 119(1), 120-136.

Widsten, P., Kandelbauer, A., 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 293-307.

Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K.C., Krikstopaitis, K., Deussen, H-J.W., Abbate, E., Galinyte, V., Schneider, P., 2000. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2052-2056.

Capítol 5

NOVA SEQÜÈNCIA DE BLANQUEIG: RELLEVÀNCIA DEL MEDIADOR I ANÀLISI TERMOGRAVIMÈTRICA.

RESUM

En el present capítol es presenta una nova seqüència de bioblanqueig aplicada a la pasta de kenaf, i amb la qual es pretén millorar els resultats obtinguts en la seqüència 2_4L_{M3} presentats en el Capítol 3. Tal com s'ha considerat al concloure l'esmentat capítol, el nou tractament que es proposa consta de dues etapes: i) una etapa enzimàtica en que la quantitat de 1.5% (g.p.s.) es fa extensiva a tots els mediadors; ii) una subseqüent etapa amb peròxid d'hidrogen en medi bàsic. Per altra banda, tal com s'ha discutit en el Capítol 4, les reaccions que tenen lloc durant l'etapa enzimàtica: oxidació de la lignina, condensació dels mediadors i empelt del mediador amb les fibres, estan relacionades amb el particular radical fenoxi format a expenses del mediador i condicionen el resultat final en un procés de bioblanqueig. Aquest diferent comportament dels mediadors es constata en aquest capítol amb la discussió dels resultats obtinguts al finalitzar l'etapa enzimàtica que marquen la rellevància del mediador utilitzat en la mateixa. Finalment, i després de l'etapa de blanqueig amb peròxid d'hidrogen, es comparen les propietats de les mostres tractades amb els diferents sistemes lacasa- mediador natural amb els obtinguts amb els sistemes lacasa-HBT i control lacasa (sense mediador); aquesta comparació ens ha de permetre determinar quin d'ells és el més eficient en la seqüència de bioblanqueig assajada.

Capítol 5

Complementàriament, es va realitzar l'estudi de la degradació tèrmica de la cel·lulosa de les mostres de kenaf tractades per anàlisi termogravimètrica. La degradació tèrmica de la cel·lulosa és molt sensible a les característiques de la superfície de la fibra estudiada i les corbes termogravimètriques estan condicionades per les característiques d'aquesta superfície. Com que el número kappa i la blancor es veuen afectades per les espècies oxidades i els grups cromòfors presents a la pasta, l'anàlisi termogravimètrica proporciona també informació sobre els mecanismes d'acció dels diferents sistemes lacasa-mediador en la fibra de cel·lulosa.

5.1 Introducció

En l'apartat 3.3.4 de la memòria es compara l'efecte de la quantitat de mediador (3% i 1.5% sobre massa de pasta seca) en el tractament enzimàtic 2₄ (apartat 2.3) pels compostos fenòlics, acetosiringona i siringaldehid. L'absència de diferències significatives en les propietats de la pasta determinades després de l'etapa enzimàtica acompanyada de la important reducció de la Demanda Química d'Oxigen i del color dels efluent en l'etapa, va fer proposar la quantitat de 1.5% de mediador com apropiada en l'aplicació del sistema lacasa-mediador. Així en el nou tractament aquesta quantitat es fa extensiva per tots els mediadors, constituint doncs una primera modificació en les condicions operatives del mateix. En el nou tractament, amb l'objectiu de millorar els resultats del bioblanqueig del kenaf, es van modificar també altres condicions d'operativitat de l'etapa enzimàtica. Les noves condicions estan d'acord amb les descrites per Moldes i Vidal, 2008, i assajades en el blanqueig de pasta kraft d'eucaliptus amb alguns dels compostos fenòlics utilitzats en aquesta tesi (siringaldehid i vainillina - Moldes et al, 2008). Destacar també que, a l'igual que en aquest últim treball referenciat, es va utilitzar lacasa de *Trametes Villosa* (TvL) les característiques de la qual s'han descrit en l'apartat 2.2.1 de la memòria.

Els efectes que un tractament enzimàtic produeix en la pasta s'estudien generalment en funció dels canvis observats en la seva composició química. Aquest estudi deixa al marge els canvis estructurals que tenen lloc en la superfície de les microfibril·les, encara que petits canvis en aquesta composició poden modificar l'ordre en les cadenes

superficials de la cel·lulosa. L'anàlisi termogravimètrica és una eina que permet detectar aquests canvis i determinar la quantitat de cel·lulosa amorfa, paracristal·lina i cristal·lina present a la pasta. Com a criteri general es pot indicar que la cel·lulosa cristal·lina es degrada tèrmicament a alta temperatura i en un interval petit de valors de la mateixa (Barneto et al., 2011). Un comportament diferent presenten la cel·lulosa amorfa i paracristal·lina que es troben entre les cadenes de cel·lulosa i també a la superfície de la microfibril·la. Aquesta cel·lulosa es degrada a menor temperatura i en un interval molt més ampli que la cristal·lina (Ieolovich et al., 2010). Qualsevol tractament (enzimàtic en el nostre cas) aplicat que modifiqui la superfície de la mostra comporta canvis en la degradació tèrmica de la mateixa, i aquests canvis són observables en el perfil de la seva corba termogravimètrica (TG). Així, una eliminació de substàncies dipositades sobre la superfície de la microfibril·la suposa un augment de l'ordre i la cristal·linitat superficial i, per tant, un increment de la cel·lulosa que es degrada a alta temperatura, observant-se un pic més agut en el perfil de la corba TG. Evidentment una deposició sobre la superfície té l'efecte contrari: hi ha un augment de la cel·lulosa que degrada a baixa temperatura (amorfa).

5.2 Materials i mètodes

La pasta de kenaf (*Hibiscus cannabinus*) després del rentat àcid inicial va ser tractada amb lacasa de *Trametes villosa* (TvL) (apartat 2.2.1). El tractament enzimàtic realitzat en aquesta seqüència de blanqueig respon a les condicions operatives **3₄L_{M1.5}**, descrites en la pàgina 2-6 de la memòria i es recorden de nou a continuació:

- **Tractament 3₄L_{M1.5}**: 40 grams de pasta seca al 7% consistència, 17,5 unitats enzim (TvL)/g.p.s. i un 1,5% mediador (g.p.s.) . L'experimentació es va realitzar en un reactor d'acer inoxidable a 6 bar de pressió d'oxigen amb agitació continua durant 4 hores, a 50°C i pH=4 (dissolució amortidora d'àcid tartàric/tartrat de sodi).

El tractament enzimàtic, es va finalitzar amb l'aplicació d'una etapa P (condicions descrites apartat 2.5.2) constituint la seqüència de blanqueig **3₄L_{M1.5}P**. L'experimentació es va dur a terme amb els cinc compostos fenòlics presentats a la Taula 4.1, l'hidroxibenzotriazol i amb la lacasa sense cap mediador.

Capítol 5

Després de l'etapa enzimàtica les mostres de pasta varen ser sotmeses a una extracció amb acetona (apartat 2.6). Amb aquesta etapa es pretén eliminar compostos adherits a la pasta (compostos fenòlics de baix pes molecular) que poden contribuir al valor del número kappa i la blancor (Aracri et al., 2010). Les mostres de pasta després d'aquesta extracció s'anomenen Lsox en el text.

Les corbes termogravimètriques es van obtenir al “Departamento de Ingenieria Química, Físico Química y Química Orgánica de la Universitat de Huelva” sota les condicions descrites en l'apartat 2.8 de la memòria.

Les propietats de les mostres de pasta determinades en aquest capítol es citen a continuació, juntament amb la referència de la seva norma corresponent : número kappa (ISO 302), la blancor (ISO 2470-1), propietats òptiques (ISO 11475) i viscositat (ISO 5351). El paràmetre % de deslignificació utilitzat en l'apartat de conclusions s'ha calculat com:

- $\% \text{ Deslignificació} = \frac{NK_i - NK_f}{NK_i} \times 100$ Equació 5.1

5.3 Resultats i discussió

5.3.1 Efectes de la naturalesa del mediador en l'etapa enzimàtica

Com en els tractaments precedents, els paràmetres sotmesos a control durant el tractament enzimàtic i les seqüències de blanqueig són la quantitat de lignina present a la pasta i la blancor. La Figura 5.1.a presenta els valors (blancor front a número kappa) determinats per les mostres de pasta tractades al finalitzar l'etapa L. El terme lacasa de la figura fa referència al control: la pasta va ser tractada només amb lacasa. Com es pot veure a la figura, totes les mostres tractades amb mediadors naturals presenten un augment en el valor del número kappa respecte al control lacasa; el PC l'augmenta en 3.7 punts i els altres mediadors incrementen el número kappa d'acord amb la seqüència $V > AV > SA > AS$. Els valors de la blancor van augmentar amb el PC i l'AV (2.7 i 1.7 punts ISO respectivament) en comparació amb la lacasa sola (32.8% ISO).

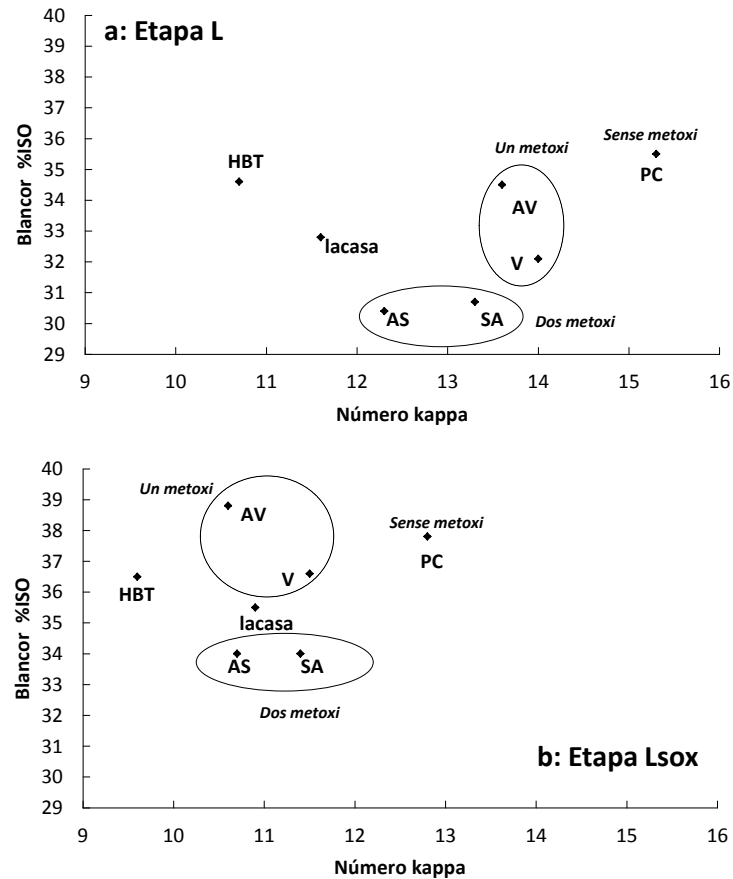


Figura 5.1. Número kappa i blancor de les mostres de pasta de kenaf : a) després del tractament enzimàtic i b) la posterior extracció amb acetona El terme lacasa representa el control: pasta tractada amb lacasa sense mediador.

Oposadament, s'observa que la blancor de la pasta tractada amb els mediadors AS i SA disminueix en 2.4 i 2.1 punts ISO respecte al control. En l'etapa enzimàtica, l'HBT va ser l'únic mediador que va disminuir el número kappa (0.9 punts), al mateix temps que augmenta la blancor (1.8 punts ISO) de la mostra de pasta respecte al control lacasa.

Aquesta nova etapa enzimàtica comporta, per les mostres tractades amb els mediadors naturals, un valor significativament menor del número kappa (excepte per AS i SA) i un augment de la blancor (excepte amb V) en relació al resultats obtinguts al finalitzar el tractament 2_4L_{M3} (Figura 3.6 . Etapa L: a i b). Les mostres tractades amb l'1-

Capítol 5

hidroxibenzotriazol són les que presenten un millor valor dels paràmetres mencionats al finalitzar aquesta nova etapa enzimàtica i quantitativament similars al tractament anterior.

Els valors obtinguts pel número kappa i blancor després de l'extracció amb acetona es presenten a la Figura 5.1.b. Aquests resultats confirmen que l'acetona elimina compostos adherits a la pasta (extractius presents en el kenaf no blanquejat i també compostos formats durant el tractament enzimàtic) que contribuïen negativament en les propietats de pasta descrites. No obstant això, la mostra tractada amb el mediador PC presenta encara un número kappa 1.9 punts superior al valor obtingut amb el control. Paral·lelament a aquesta disminució general dels valors del número kappa, les mostres tractades amb els mediadors AS i SA són les que presenten un menor valor per la blancor (34.0% ISO per ambdós) respecte al control (35.5% ISO). Per la pasta tractada amb els tres mediadors naturals restants : PC, V i AV, s'obtenen valors de blancor més alts que amb el tractament amb el control lacasa.

La Taula 5.2 presenta els valors de l'àrea k/s així com el percentatge de disminució d'àrea després del tractament enzimàtic.

	kenaf	lacasa	HBT	AS	SA	PC	V	AV
(a) Etapa L								
Àrea k/s	112.43	121.10	108.50	141.05	137.43	101.15	126.22	108.85
PDA		-7.72	3.49	-25.46	-22.24	-10.03	-12.27	3.18
(b) Etapa Lsox								
Àrea k/s	112.43	103.50	96.21	108.53	108.41	87.49	95.18	83.72
PDA		7.94	14.39	3.47	3.60	22.17	15.30	25.55

Taula 5.2. Àrea k/s i percentatge de disminució d'àrea (PDA) de la pasta de kenaf després del tractament enzimàtic (etapa L) i de l'extracció amb acetona.

Com es pot veure a la taula, després de l'etapa L (a), la utilització dels mediadors AS i SA va comportar un substancial augment de la quantitat de grups cromòfors presents a la pasta, a la llum dels valors (-25.5% i -22.2% respectivament) obtinguts per aquets dos mediadors; d'altra banda, només les mostres tractades amb els mediadors HBT i AV van tenir una reducció de color en aquesta etapa. El comportament dels mediadors naturals es similar al observat en el tractament 2₂LM₃ (Taula 3.2. Etapa L) ressaltant, però, la menor formació de grups cromòfors en el nou tractament enzimàtic aplicat i

que cal considerar com una millora de les noves condicions aplicades (relacionat amb la menor quantitat de mediador utilitzat). Les mostres tractades amb l'HBT van mostrar canvis poc significatius si es comparen els dos tractaments.

Aquests resultats constaten el diferent comportament dels mediadors en la etapa enzimàtica. Com s'ha presentat en el capítol 3, en aquesta etapa l'oxidació del compost N-OH (mediador sintètic) i dels diferents Ph-OH (mediadors fenòlics) assajats comporta primerament la pèrdua del H⁺ i la posterior transferència d'un electró; generant-se els radicals corresponents, N-O[•] i Ph-O[•] (Xu et al., 2000; Diaz-Gonzalez et al., 2011) responsables de l'oxidació de la lignina. El diferent comportament observat pels mediadors naturals es discuteix en funció de la reactivitat del radical Ph-O[•] format, i està condicionada com ja s'ha comentat per la naturalesa química del compost fenòlic del qual prové (Taula 4.1). D'acord amb la química dels fenols (Morrison i Boyd, 1998), la presència de grups donadors d'electrons (metoxi) en posicions orto de l'anell benzènic afavoreix la formació del radical fenoxi al mateix temps que efectes estèrics (posicions orto ocupades) prevenen al compost fenòlic de possibles reaccions d'empelt.

Els tractaments amb els mediadors AS i SA (les seves molècules tenen dos grups metoxi en posicions orto al carboni fenòlic) donen la menor blancor en les mostres de pasta indicant que durant l'etapa enzimàtica té lloc un procés de coloració; aquest augment de grups cromòfors (valors negatius del PDA) pot ser resultat de la formació de diferents compostos de condensació entre els propis radicals fenoxi via un enllaç intermolecular C_{fenòlic}-O[•] com s'ha descrit en el capítol anterior (Bollag et al., 1992). Aquests compostos poden ser oxidats en diferent extensió a quinones, i aquesta mescla complexa és responsable de la coloració observada en les mostres (Jeon et al., 2010). Els valors més baixos obtinguts per la blancor i els valors més negatius del PDA constaten aquest comportament pels radicals AS-O[•] i SA-O[•] durant l'etapa enzimàtica. Per altra banda, el menor valor en el percentatge de disminució d'àrea que també s'obté en les mostres tractades amb aquests dos mediadors després de l'extracció amb

Capítol 5

acetona (Taula 5.2.b), continua essent indicatiu del comportament dels radicals AS-O[•] i SA-O[•].

Aquest significatiu augment d'espècies acolorides en el cas de la utilització dels mediadors AS i SA confirma el paper de la lignina de la matèria prima utilitzada durant el tractament enzimàtic. En el cas del kenaf presenta com ja s'ha dit un valor de 3.3 per la relació unitats de siringil / unitats de guaiacil (de la Rosa, 2003); aquesta concentració extra de radicals fenoxi (conseqüència de la degradació de la lignina - Cañas i Camarero, 2010) en la mescla reactiva afavoreix la formació d'una major quantitat d'aquestes espècies.

Un comportament completament oposat al descrit pels mediadors AS i SA és el que presenta l'àcid p-cumàric (PC). L'estructura d'aquest mediador revela l'absència de grups metoxi en les posicions orto de l'anell benzènic, i tal com s'ha descrit en el capítol anterior el radical fenoxi format, PC-O[•], presenta reaccions d'empelt amb diferents tipus de fibres (sisal: Aracri et al. 2010; lli: Fillat, A., 2011). El major augment del valor del número kappa en les mostres de kenaf tractades amb aquest mediador després de les etapes L (3.7 punts) i Lsox (1.9 punts) respecte al control lacasa, sembla indicar també possibles reaccions d'empelt entre les fibres de kenaf i l'àcid p-cumàric.

Finalment, es van determinar alguns paràmetres òptics addicionals per les mostres de pasta tractades amb els diferents mediadors: C*(intensitat), L*(lluminositat) i les coordenades cromàtiques a*(verd-vermell) i b*(blau-groc), descrits en l'apartat 2.7.1.3 de la memòria. Els valors dels paràmetres òptics determinats confirmen el diferent comportament dels mediadors en l'etapa enzimàtica, així com la generació d'espècies acolorides (formació de quinones a partir dels compostos condensats) durant la mateixa. Així mateix, els majors valors de C* i de les coordenades a* i b* observats en les mostres tractades amb els mediadors AS i SA (Figura 5.2 : Etapes L i Lsox) indiquen la marcada tendència d'aquets dos mediadors a dur a terme reaccions de condensació entre els seus radicals fenoxi.

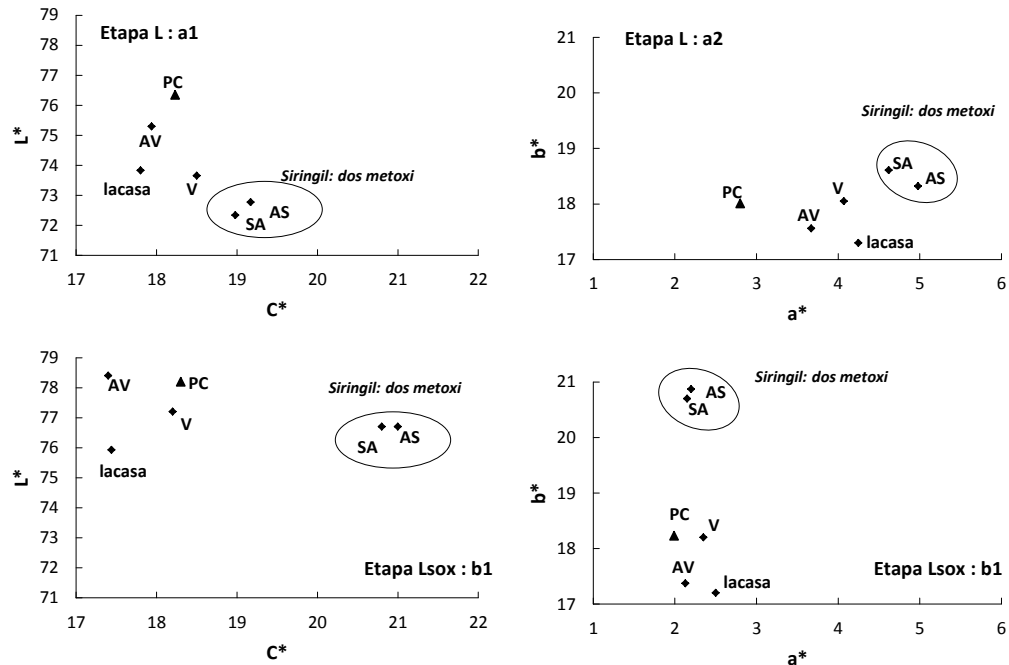


Figura 5.2. Paràmetres cromàtics i coordenades de color de la pasta de kenaf tractada amb els diferents mediadors després del tractament enzimàtic (etapa L: a1 i a2) i la posterior extracció amb acetona (etapa Lsox: a2 i b2).

En comparació amb els radicals fenoxi, el comportament del radical N-O[•] és més equilibrat; les mostres tractades amb l'1-hydroxybenzotriazole (HBT) disminueixen el número kappa, augmenten la blancor (Figura 5.1.a) i redueixen el color (Figura 5.2.a) respecte al control lacasa durant l'etapa enzimàtica. Aquest mediador es postula doncs com un assistent eficient de la lacasa en la deslignificació del kenaf.

Els resultats exposats i discutits confirmen que les propietats que presenta la pasta al finalitzar l'etapa enzimàtica depenen del mediador utilitzat i del grau d'extensió de les reaccions competitives: oxidació de la lignina, empelt mediador-fibres i condensació dels radicals fenoxi que tenen lloc durant l'aplicació de la mateixa.

5.3.2 Blanqueig amb peròxid d'hidrogen (Etapa P)

A continuació es presenten i es valoren els resultats obtinguts en la seqüència 3₄L_{M1.5}P. L'aplicació d'aquesta seqüència va comportar una efectiva deslignificació de

Capítol 5

la pasta acompanyada d'un considerable augment de la blancor respecte a la de kenaf no blanquejada per tots els sistema lacasa-mediador assajats. De manera global es pot considerar que millora el resultat obtingut amb la seqüència $2_2L_{M3}P$ per aquestes dues propietats (Figura 3.6 . Etapa P: a i b).

Com fa palès la Figura 5.3, seqüència LP (\diamond), el mediador HBT va ser més efectiu que els naturals en la reducció del número kappa, 6.4 punts respecte al kenaf no blanquejat, que representa un 49.6% de deslignificació (Equació 5.1) respecte al kenaf inicial .

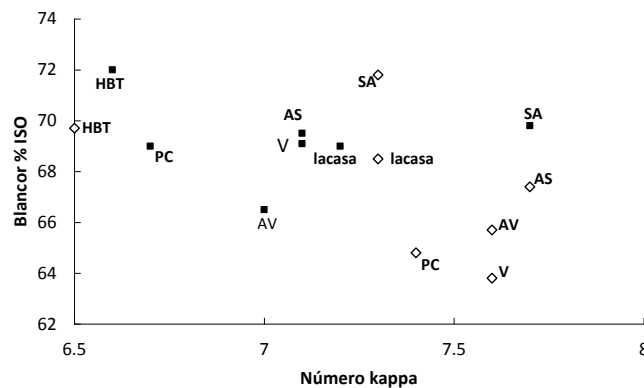


Figura 5.3. Blancor en front a número kappa després de les seqüències LP (\diamond) i LsoxP (■).

Dels mediadors naturals, el siringaldehid és el que va donar els millors resultats en les propietats de pasta determinades (Figura 5.3 : LP (\diamond)). Al final de la seqüència de blanqueig, la pasta tractada amb aquest mediador va presentar un número kappa de 7.3 i un 71.8% ISO de blancor. El % de deslignificació obtingut amb aquest mediador va ser d'un 43.4%, idèntic al obtingut amb el tractament control amb lacasa sola.

Els resultats obtinguts després de l'extracció amb acetona ($3_4L_{M1.5sox}P$) mostren la influència negativa dels compostos formats durant l'etapa enzimàtica en la posterior etapa P assajada. Com s'observa a la Figura 5.3: LsoxP (■), totes les mostres després de l'extracció amb acetona van augmentar la blancor (exceptuant la tractada amb siringaldehid) i van disminuir el número kappa respecte a la seqüència sense extracció. Aquest fet suggereix que una part del peròxid d'hidrogen es consumeix en l'oxidació

dels grups cromòfors aportats a la pasta durant el tractament enzimàtic, afectant a la blancor final de les mostres tal com es va discutir en l'apartat 3.3.3 de la memòria. Per tant, una optimització d'aquesta etapa és necessària per millorar els resultats en properes seqüències de biobioblanqueig del kenaf.

Finalment, l'anàlisi òptica ens proporciona una eina per l'estudi complet del procés de blanqueig. A la Taula 5.3 es presenten els valors dels paràmetres: L^* , C^* , a^* i b^* , obtinguts per les mostres tractades amb els diferents mediadors al finalitzar la seqüència. Com es pot veure, els valors de L^* augmenten al mateix temps que els de C^* es redueixen en comparació amb la pasta de kenaf sense blanquejar. Tots els mediadors i la lacasa redueixen el valor del paràmetre C^* indicatiu de l'eliminació efectiva de color en la seqüència de blanqueig.

Seqüència : LP	L^*	C^*	a^*	b^*	PDA
Kenaf inicial	<u>73.83</u>	<u>15.00</u>	<u>4.44</u>	<u>14.33</u>	<u>0.00</u>
Lacasa	92.42	11.02	-0.60	11.00	89.62
GBT	92.36	10.52	-0.56	10.51	89.84
AS	92.08	11.46	-0.65	11.45	88.61
SA	93.60	10.33	-0.96	10.28	92.09
PC	93.60	11.94	-0.36	11.94	86.06
V	93.60	12.53	-0.28	12.53	85.32
AV	93.60	11.52	-0.62	11.47	88.39

Taula 5.3. Paràmetres cromàtics (L^* i C^*), coordenades de color (a^* i b^*) i percentatge de disminució d'àrea (PDA) de les diferents mostres després de la seqüència de bioblanqueig.

Els valors negatius de la coordenada a^* ens indiquen l'eliminació completa de l'enrogiment en les mostres, al mateix temps que la disminució dels valors de la coordenada b^* indiquen una eliminació de la grogor de les mateixes. En conclusió es pot valorar que s'obté una bona correlació entre les propietats òptiques determinades amb el sistema CIE $L^*a^*b^*$ i els valors de la blancor i del número kappa que s'han obtingut.

5.3.3 Efecte de la seqüència en la viscositat de la pasta

Es va determinar la viscositat de les mostres de pasta amb la finalitat d'avaluar l'efecte del tractament enzimàtic i de la seqüència completa de blanqueig en la integritat de la

Capítol 5

cel·lulosa. Els resultats obtinguts en funció del mediador utilitzat es presenten a la següent figura:

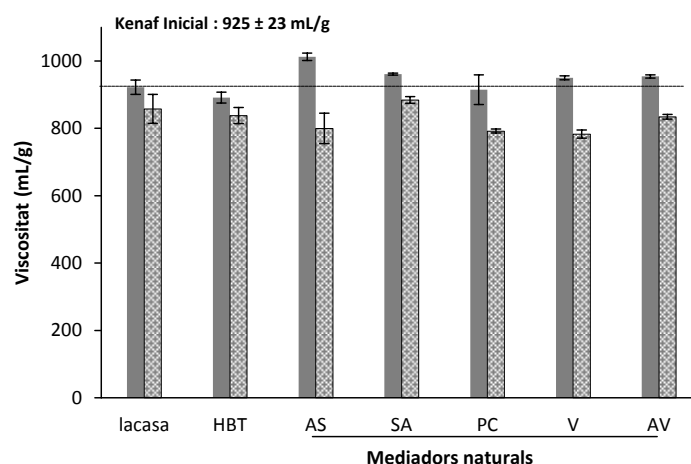


Figura 5.4. Viscositat de la pasta de kenaf tractada amb els diferents sistema lacasa-mediador (etapa L: columnes grises) i al finalitzar la seqüència de blanqueig LP (columnes puntejades). La línia discontinua correspon al kenaf inicial: 925 mL/g.

Els resultats obtinguts després de l'etapa L (Figura 5.4: columnes grises) són indicatius del diferent comportament observat pels mediadors naturals i l'HBT durant aquesta etapa. La millora de la blancor (respecte a la pasta no blanquejada) obtinguda amb aquest últim mediador, va anar acompanyada per un descens en la viscositat. Com es conegut, l'HBT causa la degradació i l'oxidació de cadenes de carbohidrats afectant a la viscositat de la pasta (García et al., 2003). En canvi, la viscositat de les mostres de pasta tractades amb els mediadors naturals es va mantenir o augmentar durant l'etapa enzimàtica. Després de l'etapa P, totes les mostres (excepte la pasta tractada amb el SA) van disminuir la viscositat respecte al control. Això pot ser degut a que els grups carbonil generats durant l'etapa L (Camarero et al., 2004) potencien la degradació de la pasta en el medi fortament bàsic de l'etapa de blanqueig assajada (Fillat i Roncero, 2009c). No obstant això, l'alta viscositat que es conserva en totes les mostres (especialment per a la pasta tractada amb el SA: $884 \pm 10 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$) és indicativa de que es pot obtenir una alta biodeslignificació sense una gran disminució de la viscositat tal com ha estat constatat per Oudia et al., 2008 i Martín-Sampedro et al., 2011.

5.3.4 Resultats i discussió de l'anàlisi termogravimètrica

A continuació es presenten els resultats obtinguts en l'aplicació (per primera vegada) de l'anàlisi termogravimètrica a una pasta de kenaf. L'estudi es va dur a terme a partir de les corbes termogravimètriques (TG) determinades per les mostres tractades amb els diferents mediadors, el control, la pasta inicial sense blanquejar i la biomassa (kenaf vegetal).

5.3.4.1 Efecte de l'aplicació del sistema lacasa i lacasa-HBT en la degradació tèrmica de la pasta de kenaf

La Figura 5.5.a, mostra l'evolució del perfil de la degradació tèrmica de les mostres In (pasta inicial), InP (inicial tractada amb peròxid d'hidrogen), L (control: lacasa sense mediador), LP (control blanquejat amb peròxid) i LsoxP (control amb extracció amb acetona i posterior aplicació de peròxid). A la Figura 5.5.b es comparen les corbes In i InP amb les corbes de les mostres obtingudes amb l'HBT. Com es veu a la figura presentada a la pagina següent, la degradació de la pasta de kenaf no blanquejada (corba In) mostra dues etapes separades a 310°C i 340°C que corresponen respectivament a la degradació de la cel·lulosa amorfa i cristal·lina. Aquesta corba termogravimètrica, amb dos pics, és indicativa de que les microfibril·les superficials de la cel·lulosa estan brutes; possiblement degut al dipòsit de xilans i lignina durant el procés de cocció de la biomassa del vegetal i que cal considerar com una especial característica del kenaf utilitzat. També a la mateixa figura es comprova que no hi ha una modificació substancial en la degradació tèrmica de la pasta després de l'aplicació del tractament enzimàtic amb lacasa (corba L: Fig 5.5.a) i lacasa-HBT (corba L(HBT): Fig.5.5.b); aquest fet és indicatiu que el tractament enzimàtic no pot treure els dipòsits superficials de la cel·lulosa. Per contra, l'aplicació del peròxid d'hidrogen (etapa P) té un efecte significatiu modificant la superfície de la pasta, les corbes InP, LP i L(HBT)P mostren un únic pic. L'extracció amb acetona comporta una molt bona eliminació d'aquests dipòsits ja que les corbes LsoxP i L(HBT)soxP presenten un pic agut similar al de la corba InP.

Capítol 5

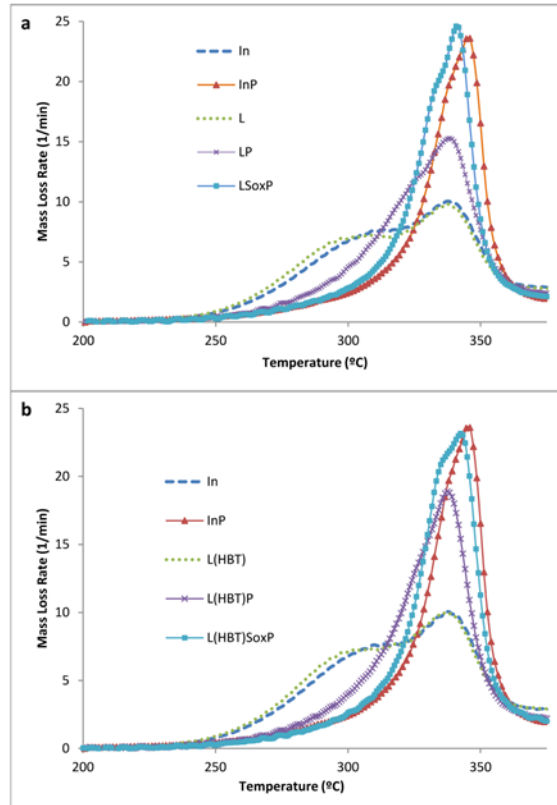


Figura 5.5. Corbes de degradació tèrmica de les mostres:(a): In, InP, L, LP i LsoxP i (b) In, InP, L(HBT), L(HBT)P i L(HBT)SoxP

L'absència de canvis significatius en el perfil de la degradació tèrmica de les mostres està d'acord amb els lleugers canvis observats en els valors del número kappa i la blancor de les mostres tractades amb els control i lacasa-HBT al finalitzar l'etapa L (Taula 5.4).

	In	InP	Lacasa	LacasaP	Lacasa _{Sox} P	L _{HBT}	L _{HBT} P	L _{HBT} SoxP
Número Kappa	12.9	7.5	11.6	7.3	7.2	10.7	6.5	6.6
Blancor %ISO	35.0	64.3	32.8	68.5	69.0	34.6	69.7	72.0

Taula 5.4. Propietats de la pasta tractada amb lacasa i lacasa- HBT. In representa la pasta sense blanquejar i InP després del tractament amb peròxid d'hidrogen.

Per altra banda, la formació de pics més aguts en el perfil de degradació tèrmica després de l'etapa P, va acompanyat d'un significatiu augment en la blancor i una

reducció del número kappa. Malgrat aquestes bàsiques concordances, s'observen algunes divergències entre els resultats de l'anàlisi tèrmica i els valors de les propietats papereres (número kappa i blancor) de la pasta determinades: i) després de l'aplicació de l'etapa P, la pasta inicial i les tractades amb l'enzim mostren diferent perfil de corbes TG però similars valors del número kappa, i ii) els significatius canvis en el perfil de les corbes després de l'extracció amb acetona i la subseqüent etapa P, comporten només petits canvis en el número kappa i la blancor en relació a la seqüència LP (sense extracció). En ambdós casos, petits canvis en les propietats papereres tenen efectes significatius sobre el perfil de la degradació tèrmica de les pastes.

Caldria esperar que al finalitzar la seqüència de blanqueig (LP) el significatiu augment de la blancor i reducció número kappa fora acompanyat d'un augment de la cristal·linitat en la superfície de la cel·lulosa. Aquest comportament, però, només es produeix per la pasta sense tractament enzimàtic previ a l'etapa P (InP), que com es veu presenta un únic i agut pic (Figura 5.5.a). Per altra banda, tal com es veu en aquesta mateixa figura, la superfície de la cel·lulosa de les mostres tractades amb l'enzim - corbes LP (Figura 5.5.a) i L(HBT)P (Figura 5.5.b) – presenta més dipòsits que la corresponent a la de la mostra InP.

5.3.4.2 Efecte de l'aplicació del sistema lacasa-mediador en la degradació tèrmica de la pasta de kenaf

La figura 5.6.a, que es presenta a la pàgina següent, recull les corbes de degradació tèrmica de les mostres de pasta tractades amb els diferents mediadors al final de la seqüència de blanqueig $3_4L_M P$ assajada. Com es pot veure, el diferent perfil de les corbes remarca la importància del mediador utilitzat en el tractament enzimàtic. D'una banda, les pastes tractades amb els mediadors V i HBT presenten la superfície de la cel·lulosa més cristal·lina que la de la pasta control (LP-sense mediador) ja que les seves corbes presenten pics més aguts que la corba corresponent al control; per altra, les tractades amb els mediadors SA, PC, AV i AS (i en aquest ordre) presenten una

Capítol 5

major dificultat en el blanqueig amb el peròxid ja que presenten les superfícies menys cristal·lines.

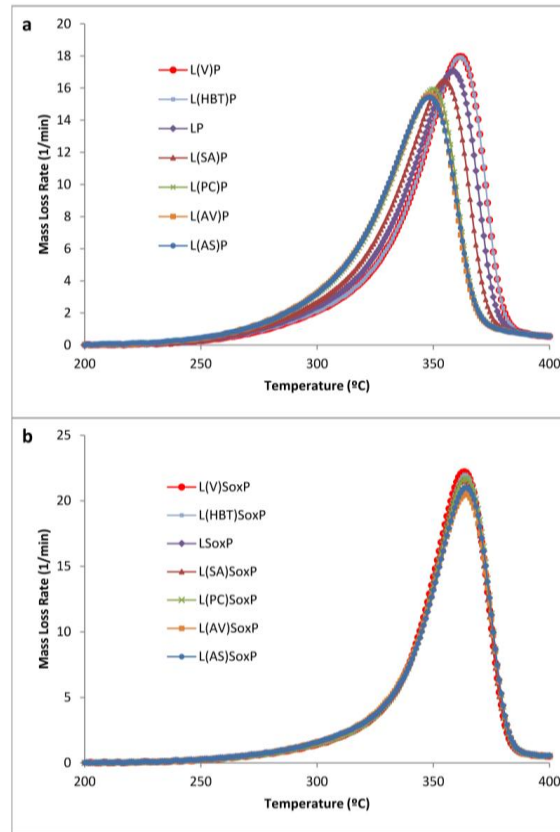


Fig. 5.6. Influència del mediador en el perfil de degradació tèrmica: a) després de l'etapa de blanqueig amb peròxid d'hidrogen; b) després d'extracció Soxhlet i aplicació de peròxid d'hidrogen.

Si considerem aquests resultats, sembla que les reaccions que tenen lloc durant l'etapa enzimàtica descrites en l'apartat 3.1: i) oxidació de la lignina; ii) empelt del mediador amb la lignina; iii) condensació dels mediadors; així com una possible adsorció de l'enzim en la superfície de la pasta, poden afavorir la formació de nous dipòsits en la superfície de les fibres que dificulten el posterior blanqueig. A la Figura 5.6.b estan representades les corbes de degradació tèrmica de les mostres de pasta tractades amb tots els mediadors al final de la seqüència $3_4L_{(M)}SOxP$. Com queda palès a la figura, després de l'extracció amb acetona la superfície de la cel·lulosa de les mostres és més

crystal·lina i semblant a la de la pasta inicial InP (Figura 5.3.a), independentment del mediador utilitzat. No obstant això, aquests significatius canvis en els perfils de les corbes TG de les pastes, s'acompanyen amb petites variacions en la blancor i el número kappa. Aquest fet podria ser degut a que l'acetona eliminés xilans enllaçats amb els mediadors (Cadena et al., 2011) augmentant la cristal·linitat en la superfície de la cel·lulosa (els pics de les corbes són més aguts); aquesta eliminació, però, sembla no influir en el contingut de grups cromòfors.

5.4 Conclusions

La nova seqüència de blanqueig assajada (**3₄L_{M1.5}P**) constata que l'eficiència dels mediadors naturals com assistents de la lacasa en la deslignificació del kenaf depèn de la naturalesa química del mediador utilitzat.

Les reaccions d'empelt (mediador-lignina) i la condensació dels mediadors fenòlics que competeixen amb l'oxidació de la lignina durant l'etapa enzimàtica condicionen, com s'ha posat de manifest, les propietats de la pasta al finalitzar la seqüència de blanqueig.

Dels resultats experimentals obtinguts al finalitzar tractament cal destacar que:

- Les mostres de pasta de kenaf tractades amb el sistema lacasa-SA presenten similar deslignificació que les tractades només amb lacasa, un 43.4% de reducció de la quantitat de lignina respecte a la pasta kenaf no blanquejat.
- El significatiu resultat obtingut només amb l'aplicació de lacasa sola sembla confirmar que fragments fenòlics generats a partir de la degradació oxidativa de la lignina actuen com mediadors, oxidant els substrats no fenòlics i augmentant la capacitat oxidativa de l'enzim.
- La pasta tractada amb els sistema lacasa-HBT va ser la que va presentar una major deslignificació (49.6%).
- Les blancors més altes (expressades en % ISO) és van obtenir en les mostres tractades amb els sistemes lacasa-SA (71.8), lacasa-HBT (69.0) i lacasa (68.5).

Capítol 5

- És necessària una optimització de l'etapa de blanqueig químic per assolir una millora en les propietats de la pasta al final del tractament.
- Les propietats òptiques estudiades: L^* , C^* , a^* i b^* així com el percentatge de disminució d'àrea, s'han mostrat com una eina complementària per determinar l'eficiència en una seqüència de bioblanqueig.

Finalment, l'anàlisi termogravimètrica ha permès obtenir una visió complementària sobre els efectes de l'aplicació del sistema lacasa-mediador en la pasta de kenaf. Segons les corbes termogravimètriques, l'aplicació de la lacasa i els diferents mediadors aporta cert tipus de dipòsit sobre la superfície de les fibres que sembla dificultar el posterior blanqueig amb peròxid d'hidrogen.

5.5 Bibliografia

Aracri, E., Fillat A., Colom, J.F., Gutiérrez A., del Rio, Jose C., Martinez, Angel T. Vidal, T., 2010. Enzymatic grafting of simple phenols on flax and sisal pulp fibres using laccases. *Bioresource Technology* 101, 8211-8216.

Barneto, A. G., Valls, C., Ariza, J. and Roncero, M. B., 2011. Thermogravimetry study of xylanase- and laccase/mediator-treated eucalyptus pulp fibres. *Bioresource Technology* 102, 9033-9039.

Bollag, J-M., Myers, C.J., Minard, R.D., 1992. Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *The Science of the Total Environment* 123/124, 205-217.

Cadena, E.M., Du X., Gellerstedt, G., Li, J., Fillat, A., García-Ubasart, J., Vidal, T., Colom, J.F., 2011. On hexenuronic acid (HexA) removal and mediator coupling to pulp fiber in the laccase/mediator treatment. *Bioresource Technology* 102, 3911-3917.

Camarero, S., Garcia, O., Vidal T., Colom, J., del Rio, J.C., Gutiérrez, A., Gras J.M., Monje R., Martínez, M.J., Martínez, A.T., 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 113-120.

Cañas, A. I.; Camarero, S., 2010. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances* 28, 694-705.

de la Rosa A., 2003. Utilización papelera de fibras no madereras (kenaf y *Miscanthus sinensis*) Estudio de las secuencias ECF y TCF. Tesis doctoral. UPC, Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera.

Díaz-Gonzalez, M., Tzanov, T., Vidal, T., 2011. Phenolic compounds as enhancers in enzymatic and electrochemical oxidation of veratryl alcohol and lignins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 1693-1700.

Fillat, A. 2011. Flax fibre modification using enzymatic systems to obtain high-value cellulose products. PhD Thesis, UPC, Department of Textile and Paper Engineering. <http://www.tdx.cat/handle/10803/38251>.

Fillat, U., Roncero, M.B., 2009c. Biobleaching of high quality with laccase mediator system: influence of treatment time and oxygen supply. *Biochemical Engineering Journal* 44, 193-198.

García, O., Camarero, S., Colom, J. F., Martínez, Á. T., Martínez, M. J., Monje, R. and Vidal, T., 2003. Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* 57, 513-519.

Ioelovich, M., Leykin, A., Figovsky, O., 2010. Study of cellulose paracrystallinity. *BioResources* 5, 1393-1407.

Jeon, J.R., Kim, E.J., Murugesan, K., Park, H.K., Kim, Y.M., Kwon, J.H., Kim, W.G., Lee, J.Y., Chang, Y.S., 2010. Laccase-catalysed polymeric dye synthesis from plant-derived phenols for potential application in hair dyeing: Enzymatic colorations driven by homo- or hetero-polymer synthesis. *Microbial Biotechnology* 3 (3), 324-335.

Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Villar, J.C., 2011. Biobleaching of *Eucalyptus globulus* kraft pulps: Comparison between pulps obtained from exploded and non-exploded chips. *Bioresource Technology* 102, 4530-4535.

Moldes, D., Vidal, T., 2008. Laccase-HBT bleaching of eucalyptus kraft pulp: Influence of the operating conditions. *Bioresource Technology* 99, 8565-8570.

Capítol 5

Moldes, D., Díaz, M., Tzanov, T., Vidal, T., 2008. Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Bioresource Technology* 99, 7959-7965.

Morrison, R.T., Boyd, R.N., 1998. *Organic Chemistry*. Allyn and Bacon, Inc., Boston. Massachusetts.

Oudia, A., Queiroz, J., Simoes, R., 2008. Potencial and limitation of *Trametes versicolor* laccase on biodegradation of *Eucalyptus globulus* and *Pinus pinaster* kraft pulp. *Enzyme Microbial Technology* 43, 144-148.

Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H-J.W., Abbate, E., Galinyte, V., Schneider, P., 2000. Redox Chemistry in Laccase-Catalyzed of N-Hydroxy Compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5), 2052-2056.

Capítol 6

MILLORA DE L'ETAPA DE BLANQUEIG QUÍMIC: SEQÜÈNCIA LQP_OW_A.

INFLUÈNCIA DELS ÀCIDS HEXENURÒNICS: SEQÜÈNCIA LXP

RESUM

En aquest darrer capítol es presenten i discuteixen els resultats de dues noves seqüències de blanqueig plantejades en funció dels resultats obtinguts en els capítols anteriors. El tractament enzimàtic es porta a terme amb els mediadors naturals acetosiringona i acetovainillona així com amb l'1-hidroxibenzotriazol. Es realitza també el tractament amb lacasa sola. L'etapa de blanqueig (etapa P) descrita al Capítol 5, es substitueix en aquest nou tractament per tres etapes successives: i) una primera etapa quelant (Q), ii) una segona amb oxigen pressuritzat (Po), iii) i un rentat àcid final (Wa). Els resultats obtinguts confirmen que aquest nou tractament assajat - **4₄LQP_OW_A** - representa una important millora en relació al tractament **3₄LP** descrit en el capítol anterior. Fet destacat continua essent els bons resultats que s'obtenen amb el tractament amb lacasa en comparació amb els obtinguts amb els sistemes lacasa-acetosiringona i lacasa-acetovainillona.

Els millors resultats obtinguts en la blancor queden matisats per uns valors relativament alts del número kappa de totes les mostres de pasta tractades. Aquest fet porta a plantejar una nova seqüència, **4₄LXP**; amb l'aplicació de xilanasa (etapa X), es pretén disminuir el contingut d'àcids hexenurònics present en la pasta de kenaf. L'aplicació de xilanasas en els processos de blanqueig, tant a nivell de laboratori com a nivell industrial, s'ha dut a terme fins ara com a pretractament de la pasta a

Capítol 6

blanquejar. En l'experimentació que es presenta, la xilanasa es va aplicar a mostres de kenaf prèviament tractades amb el sistema lacasa-mediador o lacasa. A partir dels resultats obtinguts en les propietats de pasta determinades, s'avalua la efectivitat de la aplicació de xilanasa en aquest punt (com segona etapa enzimàtica) de la seqüència proposada.

6.1 Introducció

En el Capítol 4 de la memòria s'ha presentat l'evolució del potencial redox pels diferents sistemes kenaf/lacasa-mediador assajats i pel kenaf/lacasa (sense mediador). Com mostra la Figura 4.4, en l'estadi final del tractament enzimàtic (6000-7200 segons), la capacitat oxidativa dels diferents sistema lacasa-mediador segueix el següent ordre : HBT > AS > AV > lacasa~ V~ SA > PC. Per altra banda, la relació ORP dels mediadors AS i AV és la que presenta un valor més constant durant el transcurs del tractament enzimàtic (Figura 4.5). Aquest dos fets porten a escollir l'acetosiringona i l'acetovainillona per l'aplicació del sistema lacasa-mediador en el nou tractament enzimàtic del kenaf descrit en aquest capítol. El sistema kenaf/lacasa s'ha assajat com a control i el sistema kenaf/lacasa-1-hidroxibenzotriazol com referent comparatiu amb els dos mediadors naturals.

Com s'ha posat de manifest en els apartats 3.3.3 i 5.3.2 de la memòria, la presència de diferents grups cromòfors en les mostres de pasta en funció del mediador utilitzat condiciona l'eficiència de l'etapa de blanqueig amb peròxid d'hidrogen. La seqüència de blanqueig **QPoWa** (posterior a l'etapa enzimàtica), es proposa com una millora de l'etapa P assajada en el tractament anterior. La nova seqüència de blanqueig s'inicia amb una etapa quelant (Q). Aquesta etapa implica la utilització d'agents quelants per reduir el contingut de cations metàl·lics (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}) que contribueixen a la descomposició del peròxid d'hidrogen i a la degradació de la cel·lulosa durant el tractament de blanqueig (Heijnesson et al., 1995). L'alt contingut de cations metàl·lics (especialment Fe^{2+}) presents en el kenaf xinès (Taula 2.2) recomana, doncs, la realització d'aquesta etapa. L'aplicació d'una etapa de blanqueig amb peròxid d'hidrogen reforçada amb oxigen (etapa Po), amb les condicions aplicades en aquesta

seqüència (Taula 2.1), han sigut descrites com un protocol eficient en el bioblanqueig de pasta kraft d'eucaliptus (Moldes et al., 2010). Finalment, l'aplicació d'un rentat àcid final (Wa), descrit en l'apartat 2.5.3, pretén la disminució del pH de la pasta per evitar l'envelliment de la mateixa (Roncero, 2001). Aquesta disminució del pH pot ser també efectiva per solubilitzar metalls encara presents en llocs accessibles de la pasta, que poden ser eliminats posteriorment per filtració en l'últim estadi del procés. Els resultats obtinguts en aquest tractament, **4₄LQPoWa**, en termes de deslignificació i augment de la blancor, es compararan amb els obtinguts en el tractament **3₄LP**, a fi i efecte de comprovar la millora en el bioblanqueig de la pasta de kenaf amb la nova seqüència assajada.

Com es veurà més endavant en la discussió dels resultats, al finalitzar el tractament, les mostres tractades amb lacasa, lacasa-AS, lacasa-AV i lacasa-HBT presenten valors del número kappa relativament alts. Tal com s'ha presentat en la introducció general de la memòria, la presència d'àcids hexenurònics en una pasta condiona el procés de blanqueig i les propietats finals de la mateixa. L'alt contingut d'aquests àcids en la pasta de kenaf no blanquejada ($55.6 \pm 2.5 \mu\text{mol/g.p.s.}$) i la no eliminació dels mateixos durant el tractament de bioblanqueig poden ser la causa d'aquests elevats valors del número kappa.

La quantitat d'àcids hexenurònics present en una pasta pot determinar-se seguint la mètrica proposada per Li (Gellerstedt i Li, 1996) com ja s'ha referenciat en l'apartat 2.7.2 de la memòria. Per altra banda, aquest mètode de quantificació d'àcids hexenurònics d'una pasta els elimina i permet determinar el número kappa degut només a la lignina present en la mateixa (NK_{lig}); i d'acord amb Valls et al. (2009) també la contribució dels àcids hexenurònics al número kappa (NK_{HexA}). Els valors obtinguts per els NK_{lig} de les diferents mostres són indicatius del grau de deslignificació "real" obtingut en la seqüència de bioblanqueig plantejada.

Per altra banda, la utilització de xilanases ha constituït una millora tecnològica important respecte a l'efectivitat dels reactius químics en l'etapa de blanqueig (Roncero et al., 2005; Amin, 2006). L'efecte positiu de les xilanases en una seqüència

Capítol 6

de blanqueig és conseqüència de la seva acció en la hidròlisi de xilans. Un tractament enzimàtic amb xilanases comporta tant: i) l'eliminació de las cadenes curtes de xilans dipositades sobre la superfície de la cel·lulosa en els processos de cocció alcalina de la pasta, com ii) l'eliminació dels xilans que formen part de les hemicel·luloses presents a les fibres cel·lulòsiques (situades entre la cel·lulosa cristal·lina i la lignina amorfa). L'eliminació dels xilans afavoreix doncs: i) la eliminació d'àcids hexenurònics (els xilans els contenen), ii) la millor penetració dels reactius, iii) una major eliminació de la lignina (no està unida a la cel·lulosa) en les etapes posterior de blanqueig (Roncero et al., 2003; Shatalov i Pereira, 2007). D'acord amb això, recents estudis han demostrat l'eficiència de la utilització de xilanases en l'eliminació d'àcids hexenurònics en diferents tipus de pastes: *Eucalyptus globulus* i lli (Cadena et al., 2010; Cadena et al., 2011).

Amb la seqüència **4₄LXP**, que inclou l'aplicació de xilanases després del tractament amb lacasa o lacasa-mediador, es pretén determinar l'eficiència d'aquests enzims en l'eliminació d'àcids hexenurònics en la pasta de kenaf i el seu efecte en les propietats finals de la pasta blanquejada.

6.2 Materials i mètodes

El tractament lacasa-mediador realitzat en les dues seqüències de blanqueig descrites en el present capítol va ser el següent:

- **Tractament 4₄L_{M1.5}**: 60 grams de pasta seca al 10% consistència, 20 unitats enzim (TvL)/g.p.s. i 1.5% mediador (g.p.s.). L'experimentació és va realitzar en un reactor d'acer inoxidable a 6 bar de pressió d'oxigen amb agitació continua durant 4 hores, a 50°C i pH=4 (dissolució amortidora d'àcid tartàric/tartrat de sodi).

Així, les dues seqüències completes de blanqueig és descriuen com:

- Seqüència **4₄L_{M1.5}QPoWa**, en la qual després de l'etapa enzimàtica s'aplica una etapa quelant (etapa Q) i una etapa amb peròxid d'hidrogen sota pressió (0.6 MPa) amb agitació (etapa Po). El tractament es realitza en tres etapes

($t_1=1h$; $t_2=1h$; $t_3=1h$), cadascuna inclou l'adició d'un 1% g.p.s. d'aigua oxigenada. La seqüència es conclou amb un rentat àcid final (Wa).

- Seqüència **4₄L_{M1.5}XP**, després de l'etapa enzimàtica s'aplica un tractament amb xilanasa (etapa X) per finalitzar amb una aplicació de peròxid d'hidrogen (etapa P).

Les condicions de les etapes Q, Po i Wa s'han presentat a la Taula 2.1 del capítol de Materials i Mètodes. El tractament corresponent a l'aplicació de xilanases està també descrit en el mateix capítol, apartat 2.3.1.

6.2.1 Determinació del contingut en àcids hexenurònics

Tal com s'ha presentat en l'apartat 2.7.2 de la memòria, s'ha determinat la quantitat d'àcids hexenurònics (HexA) presents en la pasta de kenaf, utilitzant el mètode proposat per Li i Gellerdest (1997) amb la incorporació de modificacions posteriors. Aquest mètode es basa en la degradació química dels àcids hexenurònics amb una primera hidròlisi amb acetat de mercuri i una posterior oxidació amb periodat de sodi. Finalment la quantitat de HexA es determina detectant els productes de la seva degradació (Figura 1.6) per espectroscòpia UV (Chai et al., 2001). El protocol complet del mètode està descrit per Valls, 2008.

Cal, però, tenir en consideració que no existeix un mètode exacte per la determinació dels àcids hexenurònics. Així, alguns autors (Costa i Colodette, 2007) suggereixen que no tots els hexenurònics estan units al polímer del xilà, i que una petita part poden estar units a la lignina (complexes lignina- carbohidrat). Aquesta part no s'eliminarà amb la hidròlisi àcida i el valor determinat no seria del tot correcte.

6.2.2 Determinació de l'actuació de les xilanases

El tractament d'una pasta amb xilanasa allibera xilans (Roncero et al., 2005), àcids i també lignina en alguns casos. Aquest productes es recullen en els efluents i la caracterització dels mateixos representa un mètode ràpid d'anàlisi d'actuació de les xilanases.

Capítol 6

L'estudi dels efluent després de l'etapa enzimàtica amb xilanases es va realitzar a partir de la següent tècnica analítica.

6.2.2.1 Cromatografia de capa fina

Una manera d'avaluar aquesta actuació és realitzant la cromatografia de capa fina dels efluent en una placa de sílice gel com a fase sòlida. La diferent separació dels efluent en la fase mòbil en comparació amb el patró de glucoses (G1-glucosa i G2- cel·lobiosa) i de xiloses (X1-xilosa, X2-xilobiosa, X3-xilotriosa i X4-xilotetraosa) permet identificar els diferents compostos dissolts en els mateixos. El mètode operatiu complet es troba descrit també per Valls, 2008.

6.2.3 Propietats de la pasta

Las mostres tractades de kenaf es caracteritzen en termes de número kappa (ISO 302), blancor (ISO 2470-1), viscositat (ISO 5351) i propietats òptiques (ISO 11475).

A continuació es presenten les equacions corresponents al càlcul de diferents paràmetres que es faran servir per la discussió de resultats en aquest capítol:

$$\bullet \quad \% \text{ Deslignificació} = \frac{NK_i - NK_f}{NK_i} \times 100 \quad \text{Equació 6.1}$$

$$\bullet \quad \text{Augment \% Blancor} = B(\%ISO)_f - B \%ISO_i \quad \text{Equació 6.2}$$

$$\bullet \quad \text{HexA extrets \%} = \frac{HexA_i - HexA_f}{HexA_i} \times 100 \quad \text{Equació 6.3}$$

$$\bullet \quad NK = NK_{lig} + NK_{HexA} + NK_{nolig} \quad \text{Equació 6.4}$$

On els subíndexs i i f indiquen inicial i final, respectivament. NK_{lig} representa la contribució de la lignina al número kappa, NK_{HexA} la dels àcids hexenurònics i NK_{nolig} és una petita fracció del número kappa deguda a estructures insaturades derivades dels carbohidrats i dels extractius presents a la pasta (Costa i Colodette, 2007).

6.3 Resultats de l'aplicació de la seqüència LQPoWa

6.3.1 Efecte en el número kappa i la blancor

A continuació es presenten els resultats obtinguts en el número kappa i la blancor de les mostres tractades amb els tres mediadors escollits: l'acetosiringona, l'acetovainillona i l'1-hidroxibenzotriazol, així com el tractament amb lacasa sense mediador. La discussió de resultats es planteja en comparació amb els resultats obtinguts per aquests dos paràmetres després del tractament 3₄LP descrit en el capítol anterior.

La Taula 6.1 compara els valors del número kappa i la blancor després de l'etapa enzimàtica dels tractaments 3₄ i 4₄. Les petites variacions introduïdes en les condicions de l'etapa L (consistència i unitats d'enzim/g.p.s.) semblen no influir significativament en els resultats finals en funció dels resultats obtinguts.

	3 ₄ L		4 ₄ L	
	NK	B%ISO	NK	B%ISO
lacasa	11.6	32.8	11.6	35.1
AS	12.3	30.4	11.7	30.8
AV	13.6	34.5	14.1	34.3
HBT	10.7	34.6	10.5	34.7

Taula 6.1. Número kappa i blancor de les mostres de kenaf després de la etapa L dels tractaments enzimàtics 3₄ i 4₄.

La Taula 6.2 presenta desglossats els valors del número kappa i la blancor després de les successives etapes realitzades durant la seqüència de blanqueig 4₄LQPoWa.

	4 ₄ L		4 ₄ LQPo						4 ₄ LQPoWa	
	NK	B%ISO	P ₁		P ₂		P ₃		NK	B%ISO
			NK	B%ISO	NK	B%ISO	NK	B%ISO		
lacasa	11.6	35.1	8.5	59.4	8.0	68.4	6.6	74.4	6.3	75.7
AS	11.7	30.8	8.1	58.4	7.4	65.4	6.9	70.4	7.1	73.3
AV	14.1	34.3	8.5	60.0	7.2	67.8	7.1	72.6	6.9	74.0
HBT	10.5	34.7	6.6	64.5	6.0	71.6	5.8	74.0	5.8	77.2

Taula 6.2. Variació del número kappa i blancor durant les successives etapes de la seqüència 4₄LQPoWa.

Les noves etapes introduïdes després del tractament enzimàtic s'han mostrat efectives tant en la deslignificació (expressada en %) com en l'augment de la blancor. Els valors d'aquest paràmetres s'han calculat a partir de les equacions 6.1 i 6.2, on NK_i i B%ISO_i són respectivament 12.5 i 35.0 (corresponents al kenaf inicial no blanquejat). Els paràmetres NK_f i B%ISO_f corresponen als valors exposats en la Taula 6.2 per la lacasa

Capítol 6

i el sistema lacasa-mediador després de cadascuna de les etapes. A les Figures 6.1 i 6.2 es mostren els valors d'aquests paràmetres en la seqüència intermèdia (4₄LQPo) i final del tractament (4₄LQPoWa) en comparació amb el tractament 3₄LP; els resultats obtinguts fan palès que l'aplicació de la nova seqüència ha comportat una major deslignificació de les mostres de kenaf.

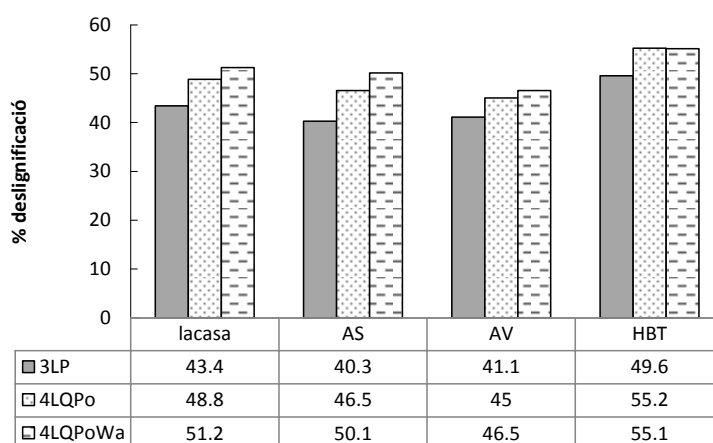


Figura 6.1. Efecte de les seqüències de blanqueig aplicades (3₄LP i 4₄LPQPo/4₄LQPoWa) en la deslignificació expressada en tant per cent.

Finalment, la disminució del pH de la pasta degut al rentat àcid final incrementa de nou el % de deslignificació, amb un major percentatge després de l'aplicació de la lacasa (2.4 punts) i el sistema lacasa-AS (3.6 punts). Aquests resultats mostren que l'aplicació d'aquesta etapa és un eficient final en la seqüència de bioblanqueig.

Aquesta major deslignificació porta aparellada un augment de la blancor de les mostres. Com es pot veure a la Figura 6.2, després de l'aplicació de les etapes Q i Po s'obtenen uns augments de blancor que van des de 3%ISO (lacasa-AS) al 6.9%ISO (lacasa-AV) respecte a les blancors obtingudes en la seqüència 3₄LP. Amb el rentat àcid final s'obté un nou increment en la blancor quantificat entre 1.3 % ISO per la lacasa a 3.2% ISO pel sistema lacasa-HBT.

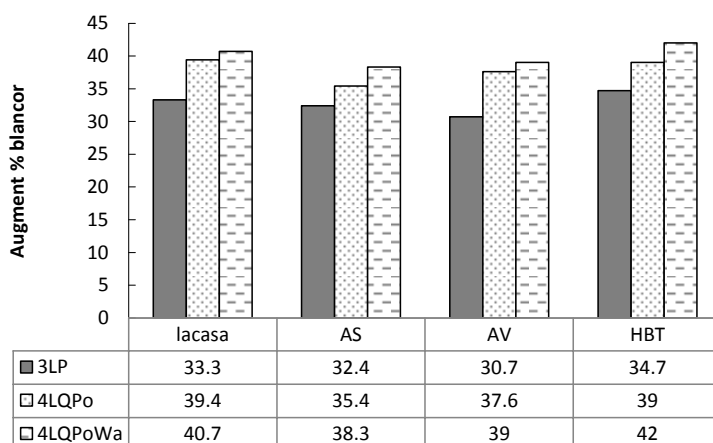


Figura 6.2. Efecte de les seqüències de blanqueig aplicades (3_4 LP i 4_4 LPQPo/ 4_4 LQPoWa) en l'augment de la blancor expressada en tant per cent ISO.

L'aplicació d'aquesta nova seqüència en el bioblanqueig ha comportat un augment tant en el grau de deslignificació com en la blancor de les diferents mostres de kenaf, constituint doncs una substancial millora respecte al anterior tractaments 3_4 LP.

6.3.2 Efecte en les propietats òptiques de la pasta

Com s'ha plantejat en el Capítol 5, l'estudi de la variació en els valors de les propietats òptiques durant una seqüència de blanqueig és una eina complementaria i eficaç per determinar la seva l'eficiència. Per completar l'estudi del tractament 4_4 LQPoWa es van determinar les propietats òptiques de les diferents mostres de kenaf tractades.

La Figura 6.3 presenta les corbes de reflectància per les mostres després del tractament amb lacasa i els sistemes lacasa-AS, lacasa-AV i lacasa-HBT a la finalització del tractament, 4_4 LQPoWa. L'aplicació del tractament comporta una disminució del color d'acord amb el significatiu augment dels valors de la reflectància en tot l'interval de longituds d'ona en comparació amb la corba de kenaf no blanquejat.

Capítol 6

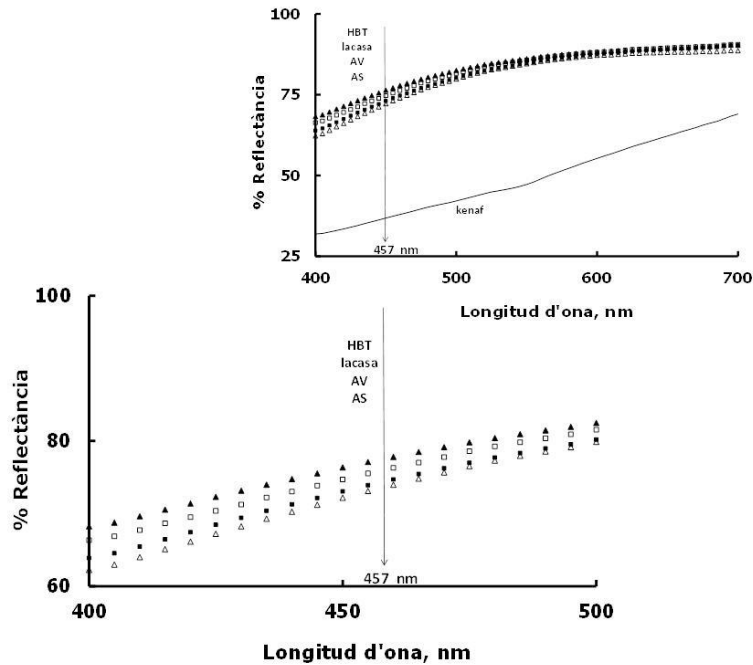


Figura 6.3. Corbes de reflectància de les mostres de kenaf després del tractament 4_4 LQPoWa amb lacasa i els diferents sistemes lacasa-mediador. La corba de línia contínua correspon al kenaf no blanquejat.

El valor de R_{∞} mesurat a la longitud d'ona de 457 nm defineix el valor de la blancor; els valors per HBT (77.2% ISO), lacasa (75.7% ISO), AV (74.0% ISO) i AS (73.3% ISO) s'han presentat a la Taula 6.2 i a la figura es constata l'ordre de la seva disminució.

Per altra banda, la quantitat de grups cromòfors presents en una pasta es pot avaluar a partir de l'índex k/s tal com descrit en l'apartat 2.7.1.2 i el seu valor es calcula a partir de l'Equació 2.1 del Capítol 2. Com ja s'ha comentat en els capítols anteriors el seguiment de la variació d'aquest índex i la determinació de l'àrea de les corbes k/s és una eina de gran utilitat per determinar la quantitat de color que s'elimina en la seqüència de blanqueig. El càlcul del percentatge de disminució d'àrea (Equació 2.2), a partir de l'àrea de les corbes k/s permet quantificar l'efecte de la seqüència de blanqueig. Finalment, els paràmetres òptics L^* (Iluminositat) i C^* (intensitat) i les coordenades cromàtiques de la pasta (a^* i b^*) basades en el sistema CIE $L^*a^*b^*$ s'han mostrat de nou útils en l'estudi de seqüència de bioblanqueig plantejada.

A la Taula 6.3 es presenten els valors de l'àrea k/s, percentatge de disminució d'àrea (PDA), els paràmetres òptics (L^* i C^*) i les coordenades cromàtiques (a^* i b^*) de les mostres tractades tant després de l'etapa enzimàtica (4_4L) com al final del tractament (4_4LQPoW_A).

		Àrea k/s	PDA	L^*	C^*	a^*	b^*
	Kenaf inicial	112.43	0.00	73.83	15.00	4.44	14.33
4_4L							
	Lacasa	106.30	5.48	75.35	17.19	3.44	16.85
	AS	138.15	-22.88	72.68	18.96	4.64	18.39
	AV	111.28	1.02	74.95	17.66	3.83	17.24
	HBT	110.35	1.85	74.97	16.87	2.37	16.71
4_4LQPoW_A							
	Lacasa	6.88	93.88	94.15	8.07	-1.09	7.99
	AS	8.40	91.91	93.62	9.22	-1.43	9.10
	AV	7.88	92.29	93.72	8.67	-1.02	8.67
	HBT	6.20	94.50	94.33	7.15	-1.03	7.15

Taula 6.3. Valors de l'àrea k/s, percentatge de disminució d'àrea (PDA), L^* , C^* , a^* i b^* de les mostres de pasta després de l'aplicació de l'etapa enzimàtica (4_4L) i al final del tractament (4_4LQPoW_A).

Cal, primerament, destacar el comportament del sistema lacasa-AS durant l'etapa enzimàtica. El percentatge d'àrea negatiu, l'augment de C^* , a^* i b^* respecte als valors de la pasta de kenaf no blanquejada són indicatius de la formació de quinones a partir dels compostos formats per la condensació dels radicals $AS-O^\bullet$ durant l'etapa enzimàtica tal com es va discutir al Capítol 4.

La valoració dels resultats obtinguts per aquestes propietats òptiques i el percentatge de disminució d'àrea, al finalitzar el tractament de blanqueig assajat porta a destacar que en totes les mostres: i) es redueix el paràmetre C^* indicatiu de l'eliminació efectiva de color, ii) hi ha una significativa disminució de la grogor (disminució dels valors de b^*) acompanyada d'una completa eliminació de l'enrogiment (valors negatius d' a^*) en les mateixes, iii) hi ha una molt bona eliminació dels grups cromòfors presents en la pasta (valors molts alts del PDA).

L'aplicació d'aquesta nova seqüència de bioblanqueig ha comportat també unes millors propietats òptiques i una major eliminació de grups cromòfors de les mostres en relació a les tractades seguint les condicions 3_4LP (resultats exposats a la Taula

Capítol 6

5.3), constatant de nou la major eficiència blanquejadora de la seqüència plantejada en aquest tractament.

6.3.3 Efecte en la viscositat de la pasta

Els resultats de viscositat obtinguts per les mostres després d'aquesta nova seqüència de bioblanqueig posen de manifest el manteniment de la integritat de la cel·lulosa durant la mateixa.

Kenaf inicial : 925 ± 23	Viscositat (mL·g ⁻¹)	
	4 ₄ L	4 ₄ LQPoWa
Lacasa	1046 ± 66	861 ± 59
AS	942 ± 36	922 ± 31
AV	1105 ± 50	941 ± 7
HBT	981 ± 40	890 ± 16

Taula 6.4. Viscositat de pasta de kenaf després de l'aplicació de l'etapa enzimàtica (4₄L) i del tractament 4₄LQPoWa.

Tal com es veu a la Taula 6.4, les mostres tractades amb la lacasa i amb el sistema lacasa-mediador presenten valors elevats de la viscositat tant al final de l'etapa enzimàtica com al final de la seqüència. A l'igual que al finalitzar el tractament 3₄L (Figura 5.4), la viscositat de les mostres ha augmentat (excepte per l'HBT) després de l'etapa enzimàtica en relació al kenaf inicial. Aquest fet podria ser degut a l'augment de longitud mitjana de les cadenes de polisacàrids com conseqüència de l'eliminació de polisacàrids de cadena curta (hemicel·luloses) en les fibres (Martin-Sampedro et al., 2011).

Per altra banda, la disminució de la viscositat després de l'aplicació de l'etapa Po és conseqüent amb una certa degradació de les cadenes de cel·lulosa deguda als grups carbonils generats en l'etapa enzimàtica i degradats en aquesta etapa de blanqueig químic (Fillat i Roncero, 2009c). Continua essent un fet positiu a destacar el manteniment d'una alta viscositat compatible amb una bona deslignificació al finalitzar el tractament 4₄LQPoWa, a l'igual que es va constatar en el tractament 3₄LP.

6.3.4 Efecte del tractament en la morfologia de les fibres

La tècnica de microscòpia electrònica d'escombrat (SEM) és pot utilitzar per observar els canvis produïts en la superfície d'una fibra com a conseqüència de l'aplicació de tractaments de blanqueig. Els canvis en la morfologia superficial de les fibres poden ser una referència tan del comportament de la pasta com de l'efecte dels enzims i els agents de blanqueig en el tractament.

La figura 6.8 presenta les diferents imatges SEM de les superfícies de les formetes després del tractament enzimàtic amb els diferents mediadors i amb la lacasa.

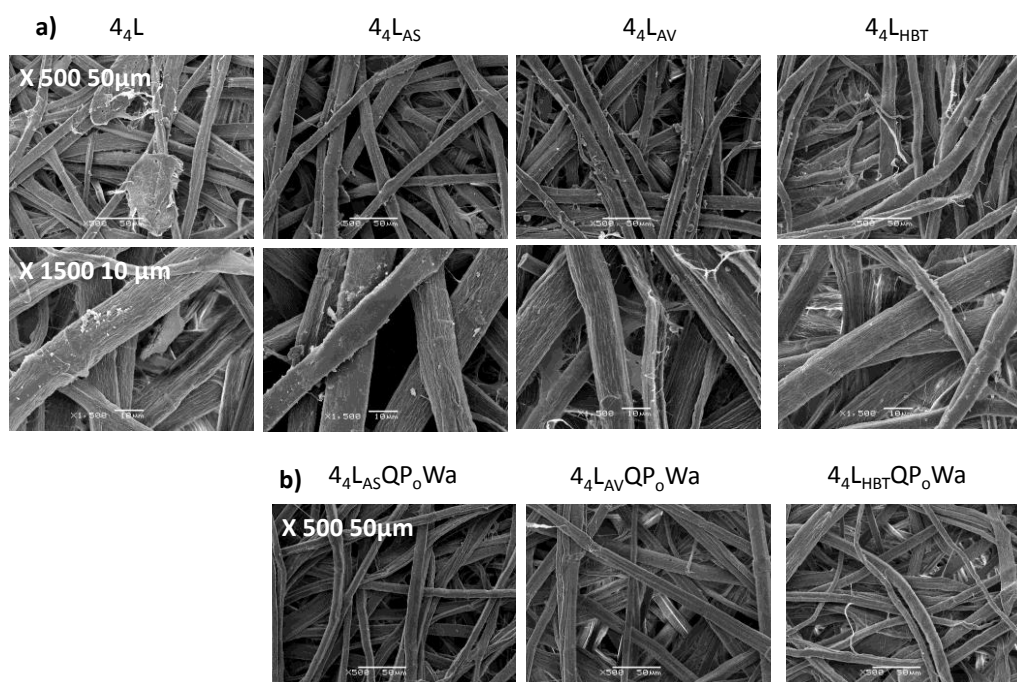


Figura 6.4. Imatges de les superfícies de les formetes després de l'etapa enzimàtica (a) i a la finalització del tractament (b) obtingudes per microscòpia electrònica d'escombrat.

Si ens fixem en les imatges corresponents a l'augment de 500 , es pot distingir encara material no cel·lulòsic sobre la superfície de les fibres. Aquest fet estaria d'acord amb les corbes termogravimètriques determinades per les mostres presentat en el capítol anterior (Apartat 5.3.4.1) i que indicaven que el tractament enzimàtic no acaba de

Capítol 6

treure tot el material no cel·lulòsic de la superfície de les fibres. En la imatge corresponent al tractament enzimàtic amb el mediador AV (augment 1500) s'observa una certa adhesió entre fibres. Les imatges presentades en b) posen de manifest les modificacions en la superfície de les fibres a la finalització del tractament.

6.3.5 Caracterització dels efluentes

La Taula 6.5 presenta els valors determinats per la Demanda Química d'Oxigen (DQO), color i toxicitat dels efluentes, tant al finalitzar l'etapa enzimàtica com al final del tractament, d'acord amb les normes referenciades en l'apartat 2.9 de la memòria.

	4 ₄ L				4 ₄ LQPoWa			
	lacasa	AS	AV	HBT	lacasa	AS	AV	HBT
DQO (kg O ₂ /t _{pulp})	51±9	151±24	81±13	40±7	23±3	16±2	17±3	21±1
Color (kg Pt /t _{pulp})	11±1	74±14	27±6	105±20	3±4	3±4	3±4	3±4
Toxicitat (T.U.)	36±3	396±91	5±1	59±6	4±0	1±0	3±1	3±1

Taula 6.5. Demanda Química d'Oxigen, color i toxicitat dels efluentes després de l'etapa enzimàtica (4₄L) i del tractament 4₄LQPoWa.

Dels valors obtinguts per aquests paràmetres després de l'etapa enzimàtica cal destacar: i) l'augment de la DQO en tots els casos és deguda a la dissolució amortidora d'àcid tartàric/tartrat de sodi en que és realitza l'etapa enzimàtica. Els mediadors naturals (AS i AV) són els que contribueixen més significativament a l'augment de la DQO, ii) els efluentes corresponents als sistemes lacasa-AS i lacasa-HBT són els que presenten una major coloració que pot ser deguda tant a la presència de compostos calorejats com a la presència de lignina degradada en els efluentes, iii) toxicitat per sobre dels límits d'emissió permès (excepte AV) de 25 equitox/m³ (Decret 130/2003) de la Generalitat de Catalunya i, destacant, l'elevat valor de toxicitat que presenten els efluentes del sistema lacasa-AS.

Cal considerar que les dissolucions dels mediadors (no oxidats) assajats (AS i HBT) presenten valors de toxicitat molt per sota del límit permès (Fillat, 2011). Aquest fet portar a determinar que l'augment de toxicitat observat després de l'etapa enzimàtica podria ser degut a la generació d'espècies intermèdies (oxidades o radicals) i de productes de modificació dels mediadors durant el procés enzimàtic.

6.3.6 Millora de l'etapa de blanqueig

La comparació dels resultats obtinguts en el tant per cent de deslignificació (Equació 6.1) i la blancor en les mostres de kenaf després dels tractaments 3₄LP i 4₄LQPoWa manifesten la major eficiència de l'etapa de blanqueig químic assajada en el segon tractament. La Taula 6.6 presenta els valors comparats per aquests dos paràmetres.

	3 ₄ LP		4 ₄ LQPoWa	
	% deslignificació	B%ISO	% deslignificació	B%ISO
lacasa	43.4	68.5	51.2	75.7
AS	40.3	67.4	50.1	73.3
AV	41.1	65.7	46.6	74.0
HBT	49.6	69.7	55.1	77.2

Taula 6.6. Deslignificació i blancor de les mostres de kenaf després dels tractaments enzimàtics 3₄LP i 4₄LQPoWa.

Així doncs, la nova seqüència assajada va comportar un augment significatiu tant en el grau de deslignificació com en l'augment de la blancor en totes les mostres. Destacar així mateix, que el millor resultat es va obtenir novament amb l'aplicació del sistema lacasa-HBT i que el tractament amb lacasa comporta també uns millors resultats que els obtinguts amb els sistemes lacasa- AS i lacasa-AV.

6.4. Influència dels àcids hexenurònics

La seqüència de blanqueig 4₄LQPoWa que s'ha dut a terme comporta l'obtenció d'una pasta amb un important reducció dels paràmetres de color, una bona blancor, una alta viscositat però un valor relativament elevat del número kappa, que es correspon amb deslignificacions com a màxim del 55% (Taula 6.6) .

L'alt valor del número kappa que presenten les mostres al finalitzar el tractament de bioblanqueig es pot relacionar amb l'alt contingut d'àcids hexenurònics en la pasta de kenaf inicial ($55.6 \pm 2.5 \mu\text{mol/g.p.s.}$) i la reducció moderada del seu contingut durant el tractament enzimàtic. Aquest alt contingut d'àcids hexenurònics en la pasta inicial és conseqüència de la morfologia del kenaf vegetal; en l'apartat 1.1.1. de la memòria s'ha descrit que les hemicel·luloses de les plantes no fusteres tenen una composició molt variable i que en el cas del kenaf, el sucre predominant de cinc carbonis és la xilosa. La

Capítol 6

presència d'hemicel·luloses amb cadenes de xilans retenint àcids hexenurònics (formats durant la cocció amb hidròxid de sodi i antroquinona) justifiquen aquest elevat contingut de HexA en les fibres de la pasta de kenaf. Per determinar la quantitat d'àcids hexenurònics presents en les diferents mostres de pasta tractades es va procedir segons la descripció exposada en l'apartat 6.2.1.

La figura 6.5 presenta la quantitat de HexA presents a les diferents mostres de pasta al finalitzar l'etapa enzimàtica i al final de la seqüència de blanqueig. Al finalitzar l'etapa L, la quantitat ($\mu\text{mol/g.p.s}$) d'àcids hexenurònics extrets de les mostres, calculada a partir de l'Equació 6.3, presenta l'ordre descendent següent: HBT (14.3) > lacasa (12.6) > AS (10.2) > AV (8.1) pels diferents mediadors i la lacasa. La disminució de la quantitat d'HexA observada al finalitzar aquesta etapa pot ser deguda a l'oxidació dels dobles enllaços dels àcids hexenurònics per radicals formats durant l'aplicació de la lacasa i el sistema lacasa-mediador (Valls i Roncero, 2012).

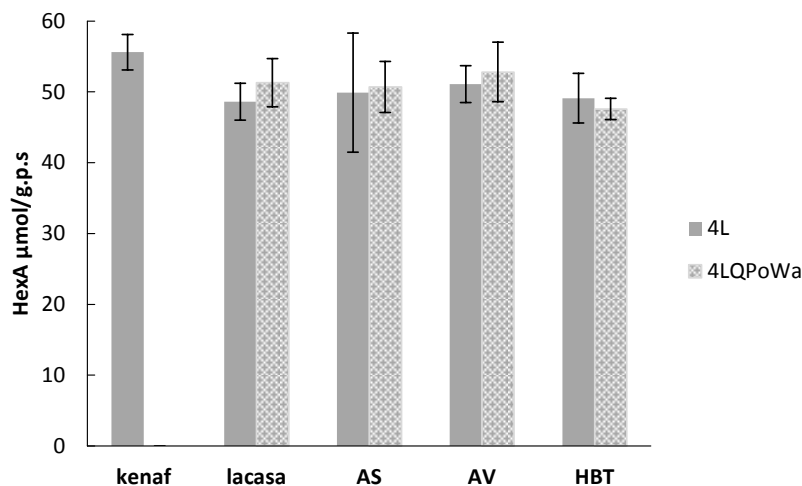


Figura 6.5. Contingut d'àcids hexenurònics en la pasta de kenaf inicial i en les mostres tractades després de l'etapa enzimàtica (4₄L) i al finalitzar el tractament (4₄LQPoWa).

Per altra banda, si es tenen en compte les desviacions estàndard dels valors determinats pel contingut dels àcids en les diferents mostres, després d'aquesta etapa enzimàtica i al finalitzar el tractament, es pot assumir que l'aplicació de l'etapa amb peròxid

d'hidrogen no té cap efecte apreciable en la eliminació d'àcids hexenurònics (Toven, 2003; Valls i Roncero, 2012).

Així mateix, tal com s'ha descrit en el Capítol 1, la presència d'àcids hexenurònics en una pasta dona una mesura errònia del contingut de lignina en la mateixa. En la determinació estàndard del número kappa, els àcids hexenurònics consumeixen també permanganat degut als dobles enllaços carboni-carboni presents en els mateixos. El número kappa determinat un cop extrets aquests àcids de les mostres, correspon a la contribució de la lignina (NK_{lig}) al número kappa de la mostra. A partir de l'Equació 6.4, es pot determinar la contribució dels àcids hexenurònics (NK_{HexA}). El valor de NK_{nolig} de l'equació és relativament petit i queda inclòs en el valor de NK_{lig} en la discussió de resultats.

Les Figures 6.6 i 6.7 presenten la contribució de la lignina i dels àcids hexenurònics al número kappa les mostres de kenaf, després de l'etapa enzimàtica i al final del tractament respectivament.

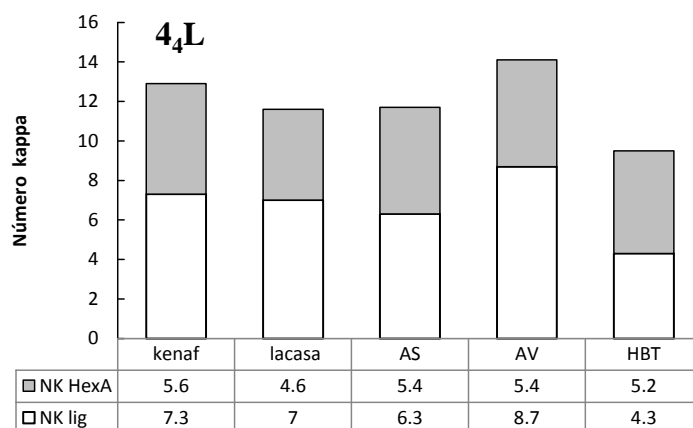


Figura 6.6. Contribució de la lignina i dels àcids hexenurònics al número kappa del kenaf i de les mostres tractades després de l'etapa enzimàtica 4_4L .

L'aplicació de l'etapa enzimàtica tal com es veu a la Figura 6.6 comporta una reducció del NK_{lig} en les mostres tractades degut a l'oxidació de la lignina conseqüència de l'aplicació dels sistemes lacasa-HBT, lacasa-AS i la lacasa sola. L'augment del número

Capítol 6

kappa després de l'aplicació del sistema lacasa-AV és el resultat de possibles reaccions d'empelt entre el radical AV-O[·] i les fibres discutit en els Capítols 4 i 5.

Al final de la seqüència de blanqueig tal com mostra la Figura 6.7, hi ha hagut una important reducció número kappa degut a la lignina de les mostres tractades tant amb la lacasa com amb els diferents sistemes lacasa-mediador; obtenint-se el menor valor per NK_{lig} (0.7) després de l'aplicació del sistema lacasa-HBT. El peròxid d'hidrogen oxida lignina residual present en la pasta al mateix temps que el pH bàsic utilitzat en el tractament facilita la seva dissolució, posant-se de manifest el bon comportament del peròxid d'hidrogen com agent deslignificador.

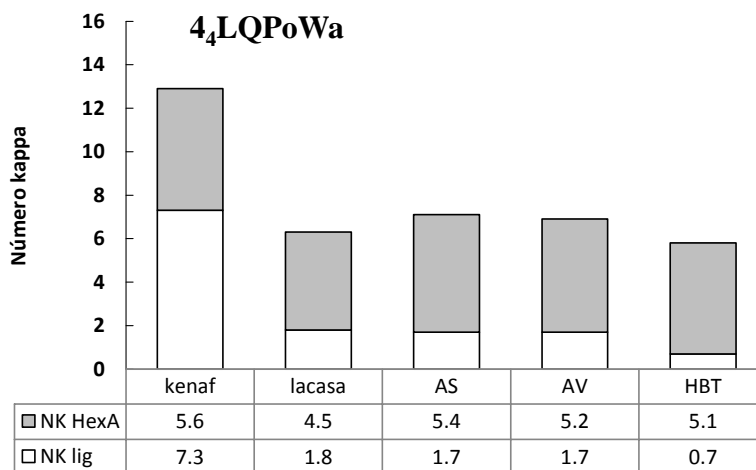


Figura 6.7. Contribució de la lignina i dels àcids hexenurònics al número kappa del kenaf i de les diferents mostres tractades al finalitzar el tractament 4₄LQPoWa.

Fent el seguiment de la contribució dels àcids hexenurònics al número kappa s'observa que després de l'etapa enzimàtica (Figura 6.6), i d'acord amb la reducció d'aquests àcids durant la mateixa (Figura 6.5), el valor del mateix va disminuir lleugerament per totes les mostres (exceptuant la tractada amb lacasa). Per altra banda un cop finalitzat el tractament, es mantenen els valors de NK_{HexA} (Figura 6.7) en relació a l'etapa

enzimàtica, d'acord amb l'efecte pràcticament nul sobre els HexA continguts en la pasta de kenaf d'una etapa de blanqueig amb oxigen pressuritzat (de la Rosa, 2003).

La determinació dels valors del número kappa de les mostres degut a la lignina permet calcular el tant per cent de deslignificació "real" del kenaf obtingut en l'aplicació del tractament de bioblanqueig. A la Figura 6.7 es presenten els valors del % de deslignificació obtinguts a partir de l'equació 6.1, essent NK_i el valor del número kappa degut a la lignina en el kenaf inicial no blanquejat (7.3), i NK_f els valors del número kappa NK_{lig} (Figura 6.7), per cadascuna de les mostres al final del tractament.

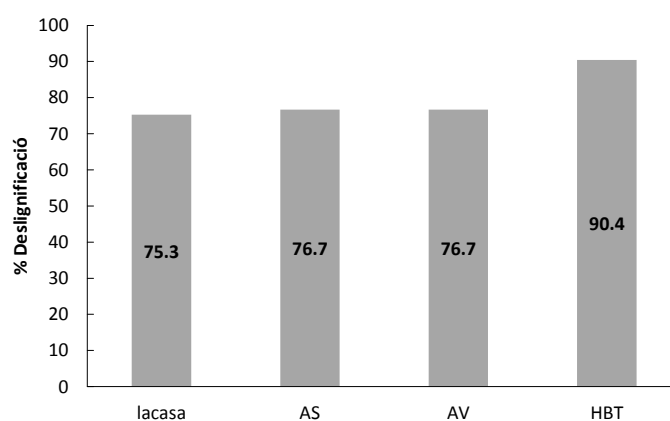


Figura 6.8. Deslignificació (%) de les mostres de kenaf al finalitzar el tractament 4₄LQPoWa.

La seqüència de blanqueig assajada dona doncs un elevat percentatge de deslignificació en el cas de l'aplicació del sistema lacasa-HBT (90%) i no hi ha diferències substancials entre l'aplicació de la lacasa i els sistema lacasa-mediador natural, al voltant del 75% en els tres casos.

Per altra banda, la presència d'elevada quantitat d'àcids hexenurònics al finalitzar el tractament condiciona els valors de blancor final obtingut en les mostres. Així, si es representen els valors de les blancors de les diferents mostres tractades en front del seu número kappa al finalitzar la seqüència de blanqueig (Taula 6.2) s'obté per aquests dos paràmetres la dependència lineal representada en la Figura 6.9.

Capítol 6

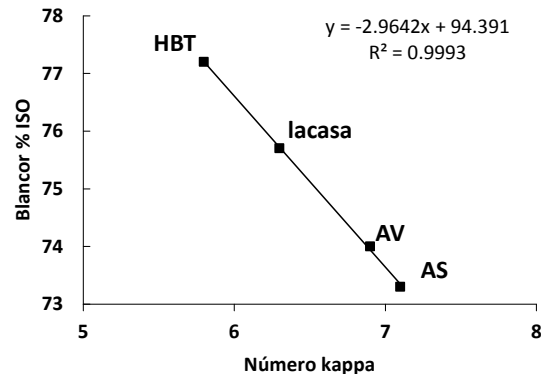


Figura 6.9. Blancor % ISO versus número kappa de les mostres kenaf al finalitzar el tractament $4_4LQPoWa$

A partir d'aquesta relació es pot calcular la blancor teòrica que correspondria a cada mostra en funció del número kappa degut a la lignina, NK_{lig} . Aquestes teòriques blancors tindrien els següents valors: lacasa (89.1%ISO), AS (89.5%ISO), AV (89.5%ISO) i HBT (92.32%ISO), representant un augment dels punts ISO de blancor en les mostres tal com es cita a continuació: lacasa (13.4), AS (16.2), AV(16.2) i HBT (15.1).

Per tant la presència dels àcids hexenurònics en la pasta de kenaf limita el grau de blancor, presentant-se un sostre en quant als valors que es poden assolir a la finalització del tractament. Aquesta limitació pot estar relacionada amb la capacitat quelant que presenten els àcids hexenurònics que contribueix a la retenció de cations metàl·lics en els llocs més interns de les fibres, amb un conseqüent efecte negatiu en l'eficiència de l'etapa de blanqueig aplicada ja que, com és sabut, aquests cations catalitzen la descomposició del peròxid d'hidrogen (Vuorinen et al., 1996; Devenyns et al., 1998).

6.5 Aplicació de la seqüència LXP

Com s'ha presentat en l'apartat anterior, els àcids hexenurònics presents en la pasta de kenaf condicionen el resultat final del tractament de blanqueig. Amb l'aplicació de la seqüència 4_4LXP , es pretén determinar l'eficiència de les xilanases (etapa X) en l'eliminació d'aquests àcids en la pasta de kenaf i l'efecte de la seva eliminació en les

propietats finals de la pasta blanquejada. En el tractament es va utilitzar la xilanasa comercial Pulpzyme[®] HC d'activitat 480 U/mL subministrada per Novozymes[®]. Les condicions d'aplicació del tractament van ser: 3 U/g.p.s. al 5% de consistència durant 2 hores, a 50°C i pH=7 (dissolució amortidora Tris-HCl). Les condicions de la posterior etapa de blanqueig amb peròxid d'hidrogen (Etapa P) varen ser les utilitzades en el tractament (3₄LP) descrit en el capítol 5 i referenciades en l'apartat 2.5.2.1 de la memòria.

6.5.1 Resultats i discussió

A continuació es presenten els resultats obtinguts per al número kappa i la blancor de les mostres de kenaf tractades tant després de l'etapa d'aplicació de la xilanasa (4₄LX) com a la finalització tractament (4₄LXP).

	4 ₄ LX		4 ₄ LXP	
	NK	B%ISO	NK	B%ISO
lacasa	10.8	36.5	6.8	62.3
AS	11.0	33.9	6.2	67.4
AV	12.1	37.7	6.7	65.7
HBT	9.3	37.4	5.8	69.7

Taula 6.7. Número kappa i blancor de les mostres de kenaf després de la doble etapa enzimàtica 4₄LX i al finalitzar el tractament 4₄LXP.

En base a aquests resultats es discuteix l'eficiència de l'etapa amb xilanasa en l'eliminació dels àcids hexenurònics i el seu efecte en les propietats de les mostres de kenaf un cop finalitzat el tractament de blanqueig.

6.5.1.1 Efecte del tractament amb xilanasa en el contingut d' HexA de la pasta de kenaf

La figura 6.10 presenta la quantitat d'àcids hexenurònics de les mostres després de l'aplicació de la xilanasa (4₄LX) i al finalitzar el tractament (4₄LXP). Els percentatges de disminució dels àcids després de l'aplicació de la xilanasa (4₄LX), calculats a partir de l'Equació 6.3 respecte al kenaf inicial, varen ser després de l'aplicació de la xilanasa els següents: lacasa (13%), AS (11%), AV (16%) i HBT (19%).

Capítol 6

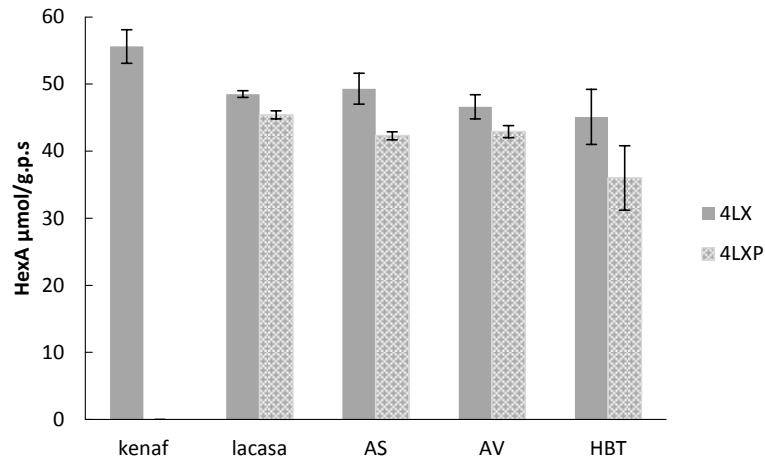


Figura 6.10. Contingut d'àcids hexenurònics en la pasta de kenaf inicial i en les mostres tractades després de l'aplicació de la xilanasa (4₄LX) i al finalitzar el tractament (4₄LXP).

Aquesta disminució pot ser conseqüència de la hidròlisi dels xilans situats en la superfície de les fibres (Valls et al. 2010). La presència d'aquests dipòsits deguda al procés de cocció de la biomassa del vegetal, ha estat destacada com una característica del kenaf en l'apartat 5.3.4.1 de la memòria (anàlisis termogravimètriques).

Els productes de la hidròlisi del polímer del xilà poden ser detectats realitzant una cromatografia de capa fina dels efluent recollits al finalitzar l'aplicació de la xilanasa. La Figura 6.11 mostra la cromatografia corresponent als efluent de l'etapa 4₄LX. Les línies G i X corresponen als patrons de glucosa i xilosa respectivament. La línia K correspon al efluent de la pasta de kenaf tractada durant 2 hores, a 50°C i pH=7 (dissolució amortidora Tris-HCl). La línia següent KX correspon als efluent de la pasta de kenaf tractada amb la xilanasa (3 U/g.p.s. al 5% de consistència) amb les condicions de tractament descrites anteriorment. Per últim les línies restants corresponen als efluent resultants de l'aplicació de la xilanasa amb posterioritat a l'etapa 4₄L per les diferents mostres.

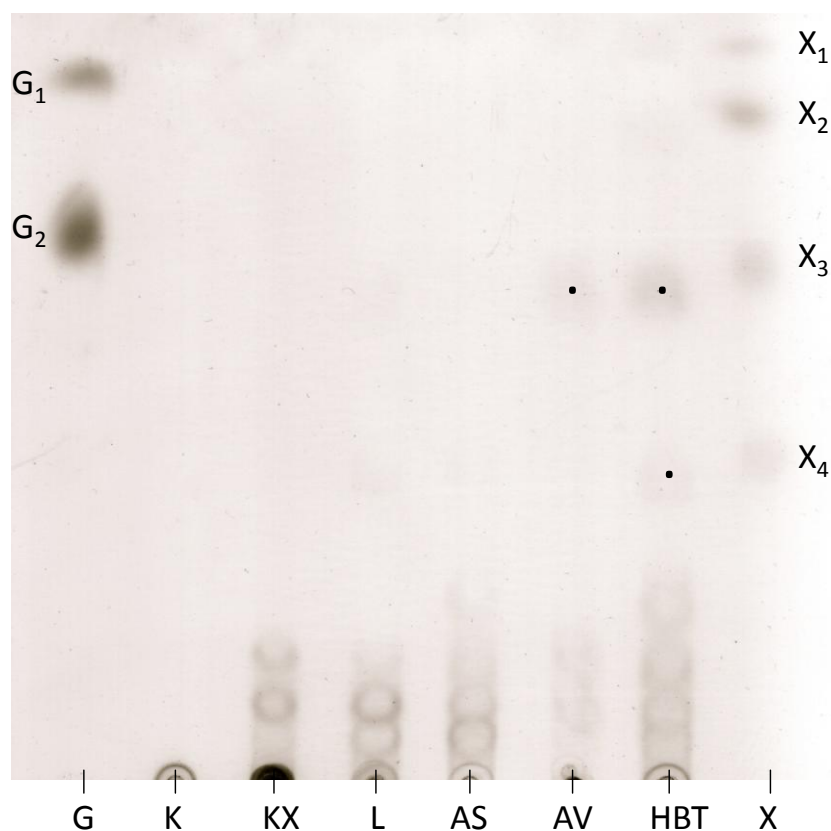


Figura 6.11 Cromatografia de capa fina dels efluents de l'etapa 4₄LX.

Com mostra la figura, en els efluents del kenaf sense cap tractament (K) no s'observa la presència de xilans. Les altres línies de la cromatografia posen de manifest que la xilanasa ha hidrolitzat el polímer del xilà: en els efluents hi ha presents compostos d'alta massa molecular. En el cas dels efluents de la mostra tractada amb el sistema lacasa-HBT, s'observa també l'eliminació de xilotriosa (X₃) i xilotetraosa (X₄) d'acord amb el patró de xiloses utilitzat. Aquesta disminució del contingut en HexA de les mostres al finalitzar l'etapa 4₄LX pot ser conseqüència de la dissolució de xilans ja que segons Shatalov i Pereira (2007) els àcids hexenurònics estan units als oligòmers de 5 a 8 xiloses.

D'altra banda a la finalització del tractament (4₄LXP) el percentatge d'àcids hexenurònics extrets respecte al kenaf inicial va ser: lacasa (18%), AS (24%), AV

Capítol 6

(23%) i HBT (35%). Aquest augment del percentatge observat podria ser degut a l'eliminació de complexos xilà (HexA units)-lignina en les condicions alcalines de l'etapa P (Valls i Roncero, 2012). Els agents químics utilitzats en la mateixa tenen major accessibilitat als HexA (situats en l'interior de les fibres) degut a l'eliminació prèvia de xilans depositats sobre la superfície de la fibra en la cocció alcalina del vegetal. D'acord amb els resultats exposats, podem concloure que la xilanasa s'ha mostrat efectiva en l'eliminació d'àcids hexanurònics en la pasta de kenaf prèviament tractada amb la lacasa i els diferents sistemes lacasa-mediador.

6.5.1.2 Efecte de la xilanasa en la morfologia de les fibres

La imatge de microscòpia electrònica d'escombrat després de l'aplicació de la xilanasa ens permet visualitzar els canvis produïts en la superfície de les fibres com a conseqüència de la seva aplicació. La figura 6.8 presenta les imatges corresponents a les diferents mostres a dos augments diferents.

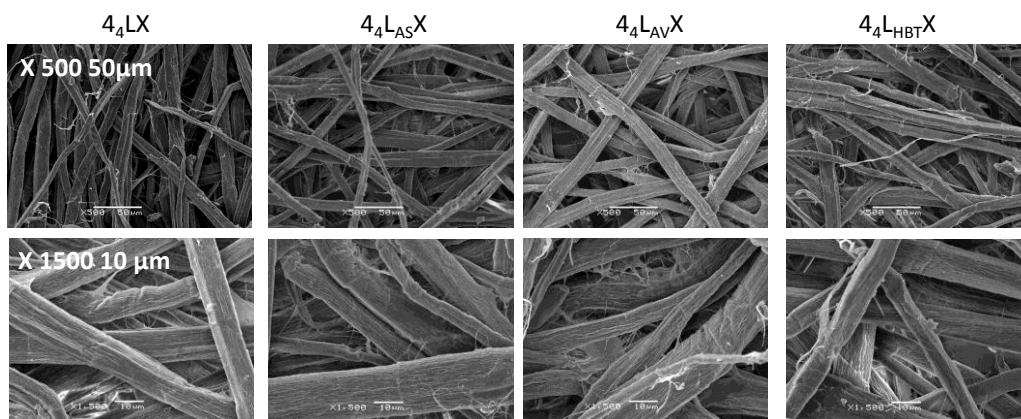


Figura 6.12. Imatges SEM de les superfícies de les formetes després de l'aplicació de xilanasa.

Tal com es veu a les imatges d'augment 500, després del tractament amb xilanasa, la superfície de les fibres està molt més neta i amb major fibril·lació exterior (unió entre fibres) en comparació amb el tractament 4₄L (Figura 6.4). En les imatges d'augment 1500 es distingeixen alteracions (solcs) en la superfície de les fibres. Pot ser per

aquests accidents que l'agent bàsic (NaOH) de l'etapa P pugui penetrar més fàcilment a l'interior de la fibres : i) continuant l'oxidació de lignina, ii) eliminant lignina residual ja oxidada, iii) facilitant l'eliminació dels complexos xilans-lignina. Aquest últim fet justificaria la disminució de la quantitat d'àcids hexenurònics presents a les mostres després de l'aplicació de l'etapa P.

6.5.1.3 Comparació dels tractaments 4₄LQPoWa i 4₄LXP

La Figura 6.13 presenta els valors del número kappa determinat per les mostres a la finalització de les etapes enzimàtiques (4₄L i 4₄LX) i a la finalització dels tractaments respectius (4₄LQPoWa i 4₄LXP). Els valors del número kappa (NK) estan desglossats en funció de la contribució de la lignina, NK_{lig} (blanc) i dels àcids hexenurònics, NK_{HexA} (gris).

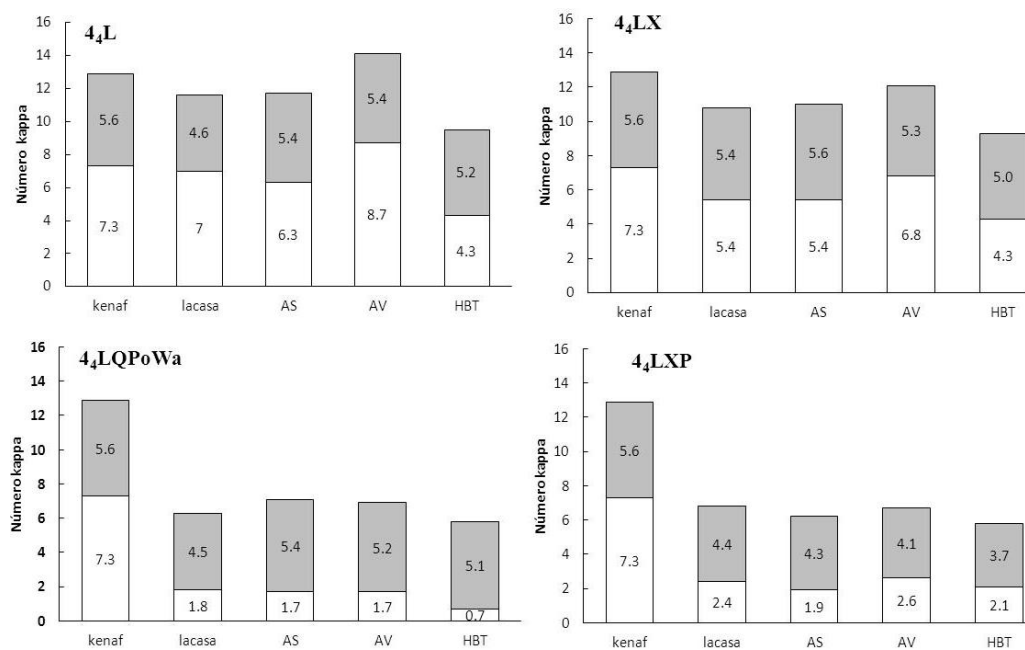


Figura 6.13. Número kappa de les mostres de kenaf, desglossats en funció de la contribució de la lignina: NK_{lig} (blanc) i dels àcids hexenurònics : NK_{HexA} (gris)

Capítol 6

D'acord amb els valors presentats a la figura, l'aplicació de xilanasa va comportar una disminució del número kappa (NK) de totes les mostres. La disminució més significativa s'obté després de l'aplicació de xilanasa a la mostra tractada amb el sistema lacasa-AV (2 punts). Amb la mateixa figura es posa de manifest que aquesta disminució es deu a una menor contribució de la lignina (els valors de NK_{lig} són més baixos) al número kappa. En aquest punt del tractament, l'aplicació de xilanasa comporta un augment de deslignificació en les mostres de kenaf prèviament tractades amb la lacasa i els diferents sistemes lacasa-mediador. Aquesta major eliminació de lignina es veu corresposta per l'augment de la blancor de les mostres, tal com és veu a la Figura 6.14. Exceptuant la mostra tractada amb lacasa, la resta presenten valors de blancor més alts després del tractament amb xilanasa. L'enzim, en eliminar els xilans superficials, modifica les superfícies de les fibres com ja s'ha comentat, aquest fet podria afavorir l'eliminació de lignina prèviament oxidada en la anterior etapa enzimàtica amb lacasa.

D'altra banda, el NK_{HexA} no ha variat significativament respecte a l'etapa 4₄L; únicament la mostra tractada amb lacasa va augmentar en 0.8 (Figura 6.6). Els HexA eliminats (units als xilans superficials) en l'etapa amb xilanasa semblen no contribuir al número kappa de les fibres.

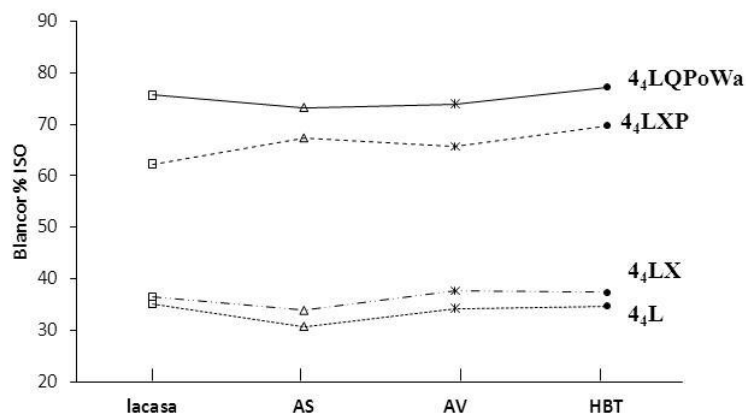


Figura 6.14. Blancors % ISO de les diferents mostres de kenaf, després de les etapes 4₄L i 4₄LX i a la finalització dels tractaments 4₄LPoWa i 4₄LXP.

Finalment es passa a comparar els resultats obtinguts un cop completats els dos tractaments 4₄LQPoWa i 4₄LXP: el valor del número kappa (NK) ha disminuït per les mostres tractades amb els sistemes lacasa-AS (0.9 punts) i lacasa-AV (0.2 punts), després del tractament amb la xilanasa, tal com mostra a la Figura 6.13. Per altra banda, totes les mostres (a excepció de la tractada amb lacasa) presenten una menor contribució del NK_{HexA} al NK total, amb una disminució del valor d'aquest paràmetre de 1.1 pels sistemes lacasa-AS i lacasa-AV i 1.4 pel sistema lacasa-HBT respecte a les mateixes mostres en el tractament 4₄LQPoWa. L'aplicació de la xilanasa pot facilitar, com ja s'ha comentat, l'eliminació de complexos xilans (HexA)-lignina durant l'aplicació de l'etapa P; aquesta eliminació comporta una disminució en el terme NK_{HexA}.

Les blancors determinades a la finalització dels dos tractaments estan també representades a la Figura 6.14. Com és pot observar, es van assolir valors més alts de la blancor a la finalització del tractament 4₄LQPoWa. Aquest fet pot ser degut a la menor eficiència de l'etapa P (posada de manifest en el tractament 3₄LP); així la menor eliminació de lignina (valors de NK_{lig} més alts: Figura 6.13) al finalitzar el tractament 4₄LP justificaria els menors graus de blancor obtingut en les mostres.

Finalment, l'estudi de l'efecte de la xilanasa sobre les propietats de les mostres es va completar amb la determinació de les viscositats.

Kenaf inicial : 925 ± 23	Viscositat (mL·g ⁻¹)	
	4 ₄ LX	4 ₄ LXP
Lacasa	968 ± 15	863 ± 27
AS	983 ± 17	866 ± 36
AV	1021 ± 28	892 ± 11
HBT	902 ± 12	863 ± 14

Taula 6.8. Viscositat de pasta de kenaf després de l'aplicació de la doble etapa enzimàtica (4₄LX) i al finalitzar el tractament 4₄LXP.

La taula 6.8 presenta els valors de viscositat de les mostres de kenaf tractades amb els diferents sistemes lacasa-mediador i lacasa. Els resultats mostren que la xilanasa no hidrolitza la cel·lulosa ja que es continua mantenint (o augmentant) la viscositat, excepte amb el tractament amb HBT, després de la seva aplicació (4₄LX). Aquest fet

Capítol 6

ha estat observat també en pastes d'*Ecalyptus globulus* per Valls et al. 2010. A la finalització del tractament, 4₄LXP, l'aplicació de xilanasa no ha disminuït significativament la viscositat, al voltant del 6.5% per les mostres tractades amb lacasa, AS i HBT i un 3.5% per la tractada amb AV. Es continua mantenint, doncs, una alta viscositat en les mostres de kenaf després del tractament amb xilanasa.

Els resultats obtinguts en la seqüència 4₄LXP donen base a pensar que l'aplicació de xilanasa combinada amb una eficient etapa de blanqueig químic podria comportar una via de millora de la seqüència de bioblanqueig. En aquesta nova seqüència un punt important a considerar seria en quin moment de la mateixa, abans o després de l'etapa enzimàtica (lacasa o sistema lacasa-mediador), s'hauria d'aplicar la xilanasa.

La Figura 6.15 (morfologia de les fibres) i Taula 6.9 (número kappa i blancor) presenten alguns resultats de l'acció del tractament amb lacasa (4₄L), xilanasa (X) i lacasa- xilanasa (4₄LX) sobre el kenaf no blanquejat. Tal com es veu a la figura, l'aplicació de xilanasa neteja la fibra eliminant els dipòsits superficials que s'observen en el kenaf i que es mantenen després de l'aplicació de lacasa.

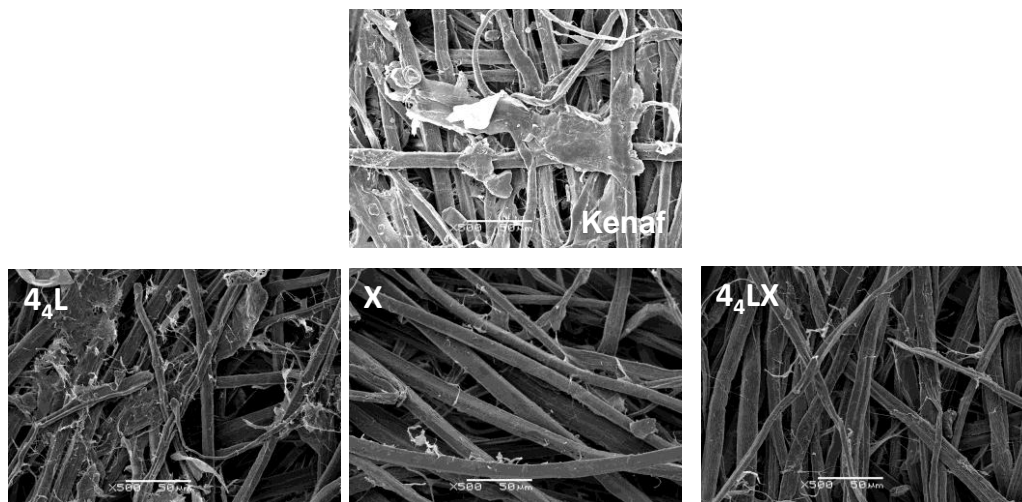


Figura 6.15. Imatges SEM (x500 50 μm) de les superfícies de les formetes després de l'aplicació de lacasa, xilanasa i lacasa-xilanasa i del kenaf inicial.

Així mateix, al final de l'aplicació del tractament lacasa-xilanasa, han sigut eliminats també els dipòsits superficials i ha hagut un major alteració en les superfícies de les fibres en comparació amb la fibra tractada només amb xilanasa.

A la Taula 6.9, s'observa que els resultats obtinguts en les propietats de pasta presentades són millors després del tractament amb xilanasa que amb lacasa i no s'observa un efecte sinèrgic després del tractament amb lacasa-xilanasa.

	NK	NK _{lig}	NK _{HexA}	%Blancor ISO
Kenaf	12.9	7.3	5.6	35.5
4₄L	11.6	7.0	4.6	35.1
X	10.9	5.5	5.4	38.3
4₄LX	10.8	5.4	5.4	36.5

Taula 6.9. Número kappa i blancor i després de l'aplicació de lacasa, xilanasa i lacasa-xilanasa a mostres de kenaf no blanquejat.

Prenent en consideració aquests resultats tot semblar indicar que una millor opció per l'aplicació de la xilanasa seria abans del tractament amb el sistema lacasa-mediador o lacasa sola.

6.6 Conclusions

La seqüència de blanqueig químic proposada en el tractament **4₄LQPoWa** ha suposat una considerable millora en les propietats de pasta determinades respecte al tractament **4₄LP**.

A partir dels resultats experimentals obtinguts es poden ressaltar els següents punts:

- El millor resultat de blancor (77.2% ISO) es va obtenir amb l'aplicació del sistema lacasa-HBT.
- La blancor obtinguda amb l'aplicació dels dos sistemes lacasa-mediador natural (AS i AV) va ser menor que l'obtinguda amb el tractament amb lacasa sola, essent significatiu el bon comportament d'aquest tractament en el blanqueig del kenaf.
- Els àcids hexanurònics presents en el kenaf condicionen el procés de blanqueig, limitant el grau de blancor que es pot assolir en el tractament.

Capítol 6

- La no consideració de la contribució dels àcids hexenurònics al número kappa permet determinar el tant per cent de deslignificació “real”, amb el tractament lacasa-HBT s’arriba a un 90% de deslignificació.

Al considerar el resultat obtingut al aplicar la xilanasa després del tractament amb la lacasa o el sistema lacasa-mediadores es poden destacar els següents punts :

- La xilanasa s’ha mostrat efectiva en l’eliminació d’àcids hexenurònics presents en la pasta de kenaf. Aquesta disminució s’ha fet palesa tant després de l’aplicació de la xilanasa (**4₄LX**) com al final del tractament (**4₄LXP**).
- L’eliminació d’aquests àcids després de l’aplicació de la xilanasa (**4₄LX**) millora la blancor de les mostres tractades amb els sistemes lacasa-mediador.

Finalment, considerar que cap dels dos tractaments assajats (**4₄LQPoWa** i **4₄LXP**) ha comportat una degradació important de les cadenes cel·lulòsiques en el kenaf, mantenint les fibres blanquejades una alta viscositat.

6.7 Bibliografia

Amin, H.M., 2006. Extended usage of xylanase enzyme to enhance the biobleaching of softwood kraft pulp. *Tappi Journal* 5(1), 23-26.

Cadena, E.M., Vidal, T., Torres, A.L., 2010. Influence of the hexenuronic acid content on refining and ageing in eucalyptus TCF pulp. *Bioresource Technology* 101, 3554-3560.

Cadena, E.M., Du X., Gellerstedt, G., Li, J., Fillat, A., García-Ubasart, J., Vidal, T., Colom, J.F., 2011. On hexenuronic acid (HexA) removal and mediator coupling to pulp fiber in the laccase/mediator treatment. *Bioresource Technology* 102, 3911-3917.

Chai, X.S., Zhu, J.Y., Li, J., 2001. A Simple and Rapid Method to Determine Hexenuronic Acid Groups in Chemical Pulps. *Journal of Pulp and Paper Science* 27(5), 165-170.

Costa, M.M., Colodette, J.L., 2007. The impact of kappa number composition on eucalyptus kraft pulp bleachability. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 24(1), 61-71.

de la Rosa A., 2003. Utilización papelera de fibras no madereras (kenaf y *Miscanthus sinensis*) Estudio de les secuencias ECF y TCF. Tesis doctoral. UPC, Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera.

Devenyns, J., Chauveheid, E., Martens, H. 1998. Uronic acids and metal control. *International Pulp Bleaching Conference*. Helsinki. Volum 1. 151-157.

Fillat, A. 2011. Flax fibre modification using enzymatic systems to obtain high-value cellulose products. PhD Thesis, UPC, Department of Textile and Paper Engineering. <http://www.tdx.cat/handle/10803/38251>.

Fillat, U., Roncero, M.B., 2009c. Biobleaching of high quality with laccase mediator system: influence of treatment time an oxygen supply. *Biochemical Engineering Journal* 44, 193-198.

Gellerstedt, G., Li, J., 1996. An HPCL method for the quantitative determination of hexenuronic acid groups in chemical pulps. *Carbohydrate Research* 294, 41-51.

Heijnesson, A., Simonson, R., Westermark, U., 1995. Metal ion content of material removed from the surface of unbleached kraft fibres. *Holzforschung* 49(1), 75-80.

Li, J., Gellerstedt, G., 1997. The contribution to kappa number from hexeneuronic acid groups in pulp xylan. *Carbohydrate Research* 302, 213-218.

Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Villar, J.C., 2011. Biobleaching of Eucalyptus bglobulus kraft pulps: Comparison between pulps obtained from exploded and non-explodes chips. *Biorersource Technology* 102, 4530-4535.

Moldes, D., Cadena, E.M., Vidal, T., 2010. Biobleaching of eucalypt kraft pulp with a two laccase-mediator stages sequence. *BioresourceTechnology* 101, 6924-6929.

Roncero, M. B., 2001. Obtención de una secuencia "TCF" con la aplicación de ozono y enzimas para el blanqueo de pastas madereras y de origen agrícola. Optimización de la etapa Z. Análisis de los efectos en la fibra celulósica y sus componentes. Tesis doctoral. UPC, Departament d' Enginyeria Tèxtil i Paperera.

Capítol 6

Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F., Vidal, T. 2003. Effect of xylanase on ozone bleaching kinetics and properties of Eucalyptus kraft pulp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 78(1), 1023- 1031.

Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F., Vidal, T. 2005. The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps. *Bioresource Technology* 96, 21-30.

Shatalov, A.A., Pereira, H., 2007. Xylanase pre-treatment of giant reed organosolv pulps: Direct bleaching effect and bleach boosting. *Industrial Crops and Products* 25(3), 248-256.

Toven, K. 2003. Paper properties and swelling properties of ozone-based ECF bleached softwood kraft pulps. *Tappi Journal* 2(2), 3-7.

Valls, C., 2008. Application of new enzymatic systems for bleaching of eucalypt kraft pulp. PhD Thesis, UPC, Department of Textile and Paper Engineering. <http://www.tdx.cat/TDX-0323109-131410>.

Valls, C., Vidal T., Roncero, M.B., 2009. The role of xylanases and laccases on hexenuronic acid and lignin removal. *Process Biochemistry* 45, 425-430.

Valls, C., Vidal T., Gallardo O., Diaz, P., Pastor, F.I.J., Roncero, M.B., 2010. Obtaining low-HexA-content cellulose from eucalypt fibres: Which glycosil hydrolase family is more efficient? *Carbohydrate Polymers* 80, 154-160.

Valls, C., Roncero, M.B., 2012. Antioxidant property of TCF pulp with a high hexenuronic acid (HexA) content. *Holzforschung* DOI 10.1515/hf-2012-0114

Vuorinen, T., Fagerström, P., Räsänen, E., Vikkula, A. 1997. Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups opens new possibilities for development of bleaching processes. 9th International Symposium on Wood pulping Chemistry. Montreal, Canada.M4-1-M4-4.

Capítol 7

CONSIDERACIONS GENERALS, CONCLUSIONS I PERSPECTIVES DE FUTUR

Consideracions generals

L'objectiu de la present tesi, tal com s'ha presentat en el Capítol 1 de la memòria, és: **“Desenvolupar una seqüència de blanqueig totalment lliure de clor (TCF) per blanquejar pasta de kenaf basada en l'aplicació del sistema lacasa-mediador”**.

Punt de partida i referent va ser el treball d'investigació : “Utilitzación papelera de fibras no madereras (Kenaf i Miscanthus sinensis). Estudio de secuèncias de blanqueo ECF y TCF” (de la Rosa, 2003). La seqüència de blanqueig **OpPoP** (TCF no enzimàtica) assajada en el mateix es pren com punt de referència comparativa amb la seqüència final desenvolupada en el present treball. La seqüència **OpPoP** descriu tres etapes de tractament: i) deslignificació amb oxigen i peròxid d'hidrogen, ii) blanqueig amb peròxid d'hidrogen pressuritzat, iii) blanqueig amb peròxid d'hidrogen. Les propietats determinades per les mostres de pasta de kenaf xinès blanquejat en la seqüència varen ser una blancor de 74.5% ISO, número kappa de 6.4 ($NK_{lig} : 2.5$; $NK_{HexA} : 3.9$) i una viscositat de $660 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ (de la Rosa, 2003).

A la figura 7.1 és presenten imatges de les diferents mostres de kenaf blanquejat obtingudes en la seqüència enzimàtica **LQPoWa** basada en l'aplicació del sistema lacasa-mediador en el blanqueig de pasta de kenaf. Per cadascuna de les mostres es fa constar la deslignificació “real”, calculada a partir de l'equació 6.1 amb els valors corresponents el número kappa degut a la lignina (NK_{lig}), la blancor i la viscositat; la

Capítol 6

figura presenta igualment la imatge del kenaf no blanquejat de partida i es referencien els valors dels paràmetres esmentats anteriorment pel tractament TCF no enzimàtic.

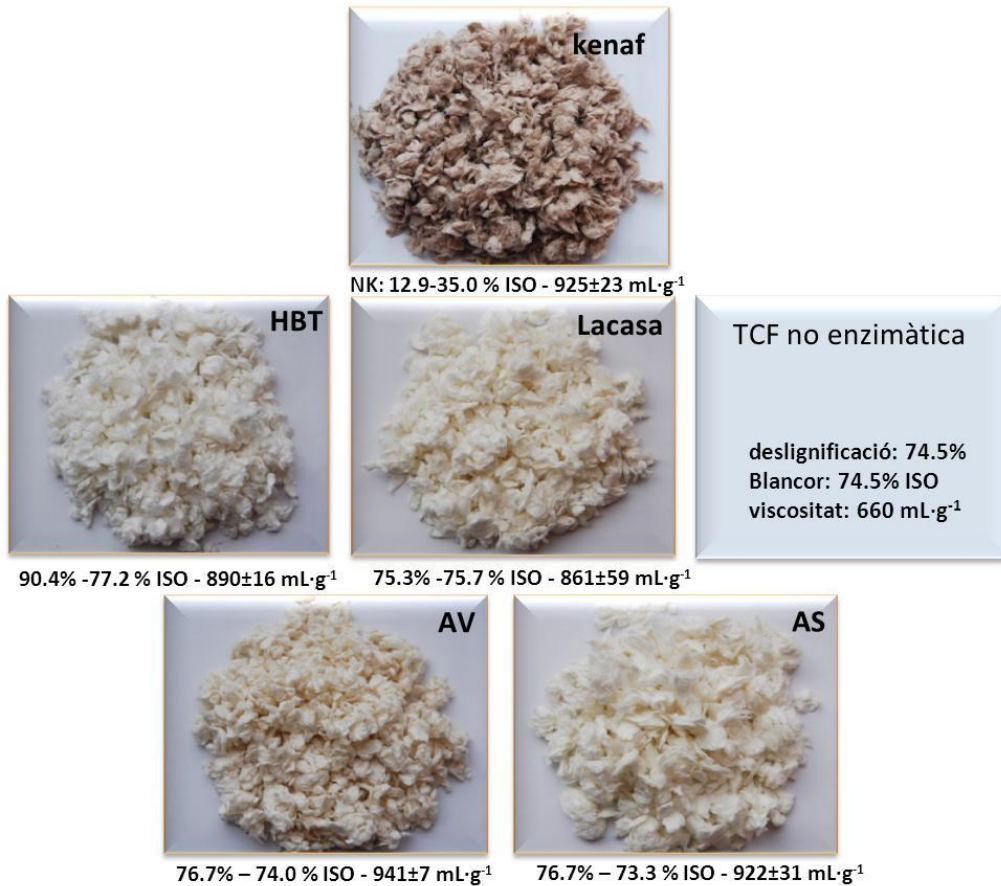


Figura 7.1 Imatges corresponents a les mostres de kenaf no blanquejat i a les mostres de kenaf tractades amb els diferents sistemes lacasa-mediador i la lacasa.

Prenent en consideració els resultats obtinguts podem assumir que s'ha aconseguit l'objectiu principal de la Tesi, ja que s'ha desenvolupat per primera vegada una seqüència TCF aplicant el sistema lacasa-mediador en la qual: i) el grau de deslignificació "real" obtingut és molt superior pel sistema lacasa- HBT (90.4%) i comparable pels sistemes lacasa-AV i lacasa-AS (76.7% per ambdós) i la lacasa sola (75.3%), a l'assolit en el tractament no enzimàtic (74.5%), ii) s'han obtingut augments de blancors amb l'aplicació del sistema lacasa-HBT (2.7% ISO) i lacasa (1.2 % ISO)

respecte al no enzimàtic, iii) el tractament enzimàtic ha fet compatible una important deslignificació amb la integritat de les cadenes cel·lulòsiques.

Conclusions Generals

A continuació es presenten les conclusions que es consideren més rellevants de la tesis:

- S'ha aplicat per primera vegada una seqüència TCF amb el sistema lacasa-mediador en el blanqueig de pasta de kenaf.
- L'augment de la capacitat oxidativa del sistema lacasa-mediador i lacasa sola en presència de pasta de kenaf està relacionada amb les característiques morfològiques del kenaf xinès utilitzat.
- Els diferents radicals formats en l'etapa enzimàtica determinen la capacitat oxidativa del sistema lacasa-mediador, remarcant la importància de la naturalesa química del mediador.
- Els mediadors naturals utilitzats presenten reaccions competitives amb l'oxidació de la lignina durant el procés enzimàtic: les reaccions d'empelt (mediador-lignina) i la condensació dels radicals fenoxi condicionen el procés de bioblanqueig.
- Els millors resultats s'han obtingut amb l'aplicació del sistema lacasa-HBT.
- Els resultats obtinguts en el tractament amb lacasa sola (comparables als assolits amb els mediadors naturals) cal relacionar-los amb l'augment de la concentració d'unitats siringil (Unitats S / Unitats G = 3.3 en el kenaf) en la mescla reactiva procedents de la degradació de la lignina durant el tractament enzimàtic.
- La quantitat d'àcids hexenurònics presents en el kenaf limita el grau de blancor que es pot assolir en els tractaments.
- L'alt grau de deslignificació "real" obtingut en les fibres ha sigut compatible amb la no degradació de les cadenes cel·lulòsiques.
- La xilanasa s'ha mostrat efectiva en l'eliminació d'àcids hexenurònics presents en la pasta de kenaf.

Capítol 6

Perspectives de futur

Com s'ha determinat en les conclusions de la Tesi, les característiques pròpies de la pasta de kenaf utilitzada condicionen les propietats de la pasta blanquejada. Però encara que la presència d'àcids hexenurònics en la mateixa limita el grau de blancor de pasta assolit, finalment s'han aconseguit blancors semblats o superiors a una pasta TCF convencional.

Considerant aquest fet i l'eficiència demostrada per la xilanasa en l'eliminació d'aquests àcids, una primera perspectiva concreta de treball estaria encaminada a una millora de l'etapa X (aplicació de xilanasa). S'hauria de considerar, com ja s'ha comentat, la seva aplicació abans de l'etapa enzimàtica amb lacasa; un altre factor que s'hauria de valorar estaria relacionat amb el temps d'aplicació d'aquesta etapa.

Una perspectiva a més llarg termini, i aprofitant la capacitat dels mediadors fenòlics de realitzar reaccions d'empelt o condensació, planteja com camí de treball la modificació de les fibres de kenaf per aplicació superficial del sistema lacasa-mediador. Amb la funcionalització superficial de suports lignocel·lulòsics es pretén obtenir productes d'alt valor afegit i amb noves propietats (hidrofobicitat, antioxidant, bacterioestàtica) que permeti la substitució de productes sintètics utilitzats actualment. Aquesta nova perspectiva de treball queda emmarcada dintre del projecte : ESTUDIO Y DESARROLLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA FUNCIONALIZACION SUPERFICIAL DE SOPORTES LIGNOCELULOSICOS MEDIANTE SISTEMAS ENZIMATICOS (CTQ2012-34109).

Aquesta perspectiva continua contemplant els dos eixos bàsics plantejats al començament de la tesi: 1) la biotecnologia com eina per desenvolupar processos respectuosos amb el medi ambient, 2) la utilització d'una fibra natural obtinguda a partir d'un vegetal renovable com compromís amb un futur sostenible.

Bibliografia General

Adler, E., 1977. Lignin chemistry: past present and future. *Wood Science and Technology* 11, 169-218.

Amin, H.M., 2006. Extended usage of xylanase enzyme to enhance the bleaching of softwood kraft pulp. *Tappi Journal* 5(1), 23-26.

Aracri, E., Colom, J.F., Vidal, T., 2009. Application of laccase-natural mediator systems to sisal pulp: an effective approach to biobleaching or functionalizing pulp fibres? *Bioresource Technology* 100, 5911–5916.

Aracri, E., Fillat A., Colom, J.F., Gutiérrez A., del Rio, Jose C., Martinez, Angel T., Vidal, T., 2010. Enzymatic grafting of simple phenols on flax and sisal pulp fibres using laccases. *Bioresource Technology* 101, 8211-8216.

Aracri, E., 2012. Application of laccase-based systems for biobleaching and functionalization of sisal fibres. PhD Thesis, UPC, Department of Textile and Paper Engineering. <http://hdl.handle.net/10803/77921>

Ashori, A., 2006. Pulp and paper from kenaf bast fibers. *Fibers and Polymers* 7(1), 26-29.

Astolfi, P., Brandi, P., Galli, C., Gentili, P., Gerini, M.F., Greci, L., Lanzalunga, O., 2005. New mediators for the enzyme laccase: mechanistic features and selectivity in the oxidation of non-phenolic substrates. *New Journal Chemistry* 29, 1308–1317.

Atchinson, J. E., 1998. Update on global use of non-wood plant fibers and some prospects for their greater use in the United States, in: *North American Non-Wood Fiber Symposium, TAPPI Proceedings*, pp. 1-3.

Bajpai, P., 2004. Biological bleaching of chemical pulps. *Critical Reviews in Biotechnology* 24, 1-58.

Barneto, A.G., Aracri, E., Andreu, G. Vidal, T., 2012. Investigating the structure-effect relationships of various natural phenols used as laccase mediators in the biobleaching of kenaf and sisal pulps. *Bioresource Technology* 112, 327-335.

Barneto, A. G., Valls, C., Ariza, J. and Roncero, M. B., 2011. Thermogravimetry study of xylanase- and laccase/mediator-treated eucalyptus pulp fibres. *Bioresource Technology* 102, 9033-9039.

Biermann, C.J., 1996. Optical Properties of Paper. Ed. Biermann. *Handbook of Pulping and Papermaking*. 2^a ed. San Diego: Academic Press. 487-515.

Blain, T. J., 1993. Anthraquinone pulping: fifteen years later". *Tappi Journal* 76, 137-46.

Bollag, J-M., Myers, C.J., Minard, R.D., 1992. Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *The Science of the Total Environment* 123/124, 205-217.

Bourbonnais, R., Paice, M.G., 1996. Enzymic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi Journal* 79, 199-204.

Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E., Bornemans, S., 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63,4627-32.

Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, M.G., 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *BBA General Subjects* 1379, 381-390.

Brooks, R.T., Edwards, L.L., Nepote, J.C. y Caldwell, M.R., 1994. Bleach plant close up and conversion to TCF: A case study using mill data and computer simulation. *Tappi Journal* 77, 3-92.

Burto, S.W., 2001. Low-energy thermomechanical pulping process using an enzyme treatment of wood between refining zones. U.S. Pat appl. US6267841.

Cadena, E.M., Vidal, T., Torres, A.L., 2010. Influence of the hexenuronic acid content on refining and ageing in eucalyptus TCF pulp. *Bioresource Technology* 101, 3554-3560.

Cadena, E.M., Du X., Gellerstedt, G., Li, J., Fillat, A., García-Ubasart, J., Vidal, T., Colom, J.F., 2011. On hexenuronic acid (HexA) removal and mediator coupling to pulp fiber in the laccase/mediator treatment. *Bioresource Technology* 102, 3911-3917.

Call, H.P., Mücke, I., 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology* 53, 163-202.

Camarero, S., Garcia, O., Vidal T., Colom, J., del Rio, J.C., Gutiérrez, A., Gras J.M., Monje R., Martínez, M.J., Martínez, A.T., 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 113-120.

Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M. J. and Martínez, Á. T., 2005. Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 1775-1784.

Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, Á. T., Romero, J., Gutiérrez, A. i del Río, J. C., 2007. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1264-1271.

Cañas, A.I., Camarero, S., 2010. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances* 28, 694-705.

Chai, X. S., Zhu, J. Y. and Li, J. 2001. A simple and rapid method to determine hexeneuronic acid groups in chemical pulps. *Journal of Pulp and Paper Science*. 27(5):165-170.

Chang, H.M., Sarkanen, K.V., 1973. Species variation in lignin-Effect of the species on the rate of kraft pulping. *Tappi* 56(3), 132-134.

Chandra, R.P., Ragauskas, A.J., 2002. Evaluating laccase-facilitated coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology* 30, 855-861.

Chandra, R.P., Lehtanen, L.K., Ragauskas, A.J., 2004. Modification of high lignin content kraft pulps with laccase to improve paper strength properties. 1. Laccase treatment in the presence of gallic acid. *Biotechnology Progress* 20, 255-261.

Clark, J., 1978. Carbohydrates, cellulose, and lignin, in: Clark, J. (Ed.), Pulp technology and treatment for paper. Miller Freeman Publications, Inc., San Francisco, USA, pp. 106-124.

Costa, M.M., Colodette, J.L., 2007. The impact of kappa number composition on eucalyptus kraft pulp bleachability. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 24, 61-71.

Danielsson, S., Kisara, K., Lindstrom, M.E., 2006. Kinetic study of hexenuronic acid and methylglucuronic acid reactions in pulp and in dissolved xylan during kraft pulping of hardwood. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 45(8), 2174-2178.

de la Rosa, A., 2003. Utilización papelera de fibras no madereras (kenaf y *Miscanthus sinensis*) Estudio de las secuencias ECF y TCF. Tesis doctoral. UPC, Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera.

del Río, J.C., Gutiérrez, A., Martínez, M.J. i Martínez, Á.T., 2001. Py-GC/MS study of Eucalyptus globulus wood treated with different fungi. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 58-59, 441-452.

del Río, J.C., Gutiérrez, A., Hernando, M., Landin, P., Romero, J. i Martínez, Á.T., 2005. Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 74, 10-115.

Devenyns, J., Chauveheid, E., Martens, H. 1998. Uronic acids and metal control. *International Pulp Bleaching Conference*. Helsinki. Volum 1. 151-157.

Dence, C.W., 1996. Chemistry of chemical pulp bleaching, in: Dence, C.W. and Reeve, D. W. (Eds.), Pulp bleaching - principles and practice. TAPPI Press, Atlanta, USA, pp. 125-159.

Diaz, M., Vidal, T., Tzanova, T., 2009. Electrochemical study of phenolic compounds as enhancers in laccase-catalyzed oxidative reactions. *Electroanalysis* 21 (20), 2249-2257.

Díaz-Gonzalez, M., Tzanov, T., Vidal, T., 2011. Phenolic compounds as enhancers in enzymatic and electrochemical oxidation of veratryl alcohol and lignins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 1693-1700.

Elsander, A., Ek, M. i Gellerstedt, G., 2000. Oxalic acid formation during ECF and TCF bleaching of kraft pulp. *Tappi Journal* 83, 73-77.

Eklund, D., Lindström, T., 1991. *Paper Chemistry, An Introduction*. DT Paper Science. 1st English edition.

FAO., 2009. Faostat-Forestry. www.faostat.fao.org. Consulta: setembre 2012.

Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D. y Eriksson, K.E.L., 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters* 391, 144-148.

Enguita, F.J., Matias, P.M., Martins, L.O., Placido, D., Henriques, A.O., Carrondo, M.A., 2002. Spore-coat laccase cotA from *Bacillus subtilis*: crystallization and preliminary X-ray characterization by the MAD method. *Acta Crystallographica Section D-biological Crystallography* 58, 1490-1493.

Fengel, D. i Wegener, G., 1989. "Lignin", in: Fengel, D. and Wegener, G. (Eds.), *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter and Co., Berlin, Germany, pp. 127-157.

Fillat A., Colom, J.F., Vidal T., 2010. A new approach to the biobleaching of flax pulp with laccase using natural mediators . *Bioresource Technology* 101, 4104–4110.

Fillat, A., Roncero, M.B. i Vidal, T., 2011. Assessing the use of xylanase and laccases in biobleaching stages of a TCF sequence for flax pulp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 86, 1501-1507.

Fillat, A. 2011. Flax fibre modification using enzymatic systems to obtain high-value cellulose products. PhD Thesis, UPC, Department of Textile and Paper Engineering. <http://www.tdx.cat/handle/10803/38251>.

Fillat, U., d Roncero, M. B., 2009a. Effect of process parameters in laccase-mediator system delignification of flax pulp: Part I. Pulp properties. *Chemical Engineering Journal*. 152, 322-329.

Fillat, U., Roncero, M.B., 2009b. Effect of process parameters in laccase mediator system delignification of flax pulp. Part II: impact on effluents properties. *Biochemical Engineering Journal*. 152, 330–338.

Fillat, U., Roncero, M.B., 2009c. Biobleaching of high quality with laccase mediator system: influence of treatment time an oxygen supply. *Biochemical Engineering Journal* 44, 193-198.

Fillat, U., Roncero, M.B., 2010. Optimization of laccase mediator system in producing biobleached flax pulp. *Bioresource Technology* 101, 181–187.

Galli, C., Gentili, P., 2004. Chemical messengers: mediated oxidations with the enzyme laccase. *Journal Physical Organic Chemistry* 17, 973-7.

García, O., Camarero, S., Colom, J., Martínez, A. T., Martínez, M. J., Monje, R., Vidal, T., 2003. Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* 57, 513-519.

García Barneto, A., Vila, C., Ariza, J., Vidal, T., 2011. Thermogravimetric measurement of amorphous cellulose content in flax fibre and flax pulp. *Cellulose*. 18:17-31.

García Hortal, J.A., 2007a. *Fibras papeleras: Características de las fibras naturales no madereras*. Edicions UPC, Barcelona, pp. 131-178.

García Hortal, J.A., 2007b. *Fibras papeleras : Composición química y estructura de la fibra. Propiedades fundamentales*. Edicions UPC, Barcelona, pp. 52-84.

García Hortal, J.A., 2007c. *Fibras papeleras: Introducción*, Edicions UPC, Barcelona, pp. 13-50.

Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J. C., 2001. Kinetic modelling of corncob autohydrolysis. *Process Biochemistry*. 36(6): 571-578.

Gellerstedt, G., Li, J. B., 1996. An HPLC method for the quantitative determination of hexeneuronic acid groups in chemical pulps. *Carbohydrate Research*. 294:41-51.

Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J., 1999. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3, 1-25.

Gomez, F., Brito, J.O., 2008. *Panorama de la industria de celulosa y papel en Iberoamérica*. Area, M.C. (Ed.) Argentina, 61-102.

- Gonzalez, J., 2012. <http://centrodeinvestigacionlaorden.gobex.es>. Consulta : Setembre 2012.
- Grönqvist, S., Rantanen, K., Alén, R., Mattinen, M. L. and Buchert, J., Viikari, L., 2006. Laccase-catalysed functionalization of TMP with tyramine. *Holzforschung* 60, 503-508.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto A., Martínez, M.J. i Martínez, A.T., 1994. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus. *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* 209,603-611.
- Gutiérrez, A. Rodríguez, Isabel M., del Río, J.C., 2004. Chemical characterization of lignin and lipid fractions in kenaf bast fibers used for manufacturing high-quality papers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4764-4773.
- Gutiérrez, A., Rencoret, J., Ibarra, D., Molina, S., Camarero, S., Romero, J., del Río, J.C., Martínez, A.T., 2007. Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environmental Science. Technology* 41, 4124-4129.
- Hager A., Nellessen B., Puls J., 2002. On the applicability of laccases for deinking. In: *Proceeding of PTS-CTP deinking symposium* 34, 1-10.
- Heijnesson, A., Simonson, R., Westermark, U., 1995. Metal ion content of material removed from the surface of unbleached kraft fibres. *Holzforschung* 49(1), 75-80.
- Higuchi, T., 1985. *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. Academic Press. Orlando.USA
- Hillis, W.E., Sumimoto, M., 1989. Effect of extractives on pulping. *Natural Products of Woody Plants II*; Ed. Rowe, J.W.Springer-Verlag, Berlin. pp. 880-920.
- Holberg, M., 2000. *Dyes and fluorescent whitening agents*. Neimo, L. (ed.). *Papermaking Chemistry*, Helsinki: Tappi Press, vol. 4.
- Hunt, R.W.G., 1998. *Measuring colour*. 3rd Ed. Kingston-upon-Thames: Fountain Press.

Hurter, R.W., 2001. Sisal Fibers: market opportunities in the pulp and paper industry, in: FAO/CFC Seminary on Alternative Applications for Sisal and Henequen Proc. pp. 61-64.

Ioelovich, M., Leykin, A., Figovsky, O., 2010. Study of cellulose paracrystallinity. *BioResources* 5, 1393- 1407.

Jeon, JR., Kim, EJ., Murugesan, K., Park, HK., Kim, YM, Kwon, JH., Kim, WG., Lee, JY., Chang, YS., 2010. Laccase-catalysed polymeric dye synthesis from plant-derived phenols for potential application in hair dyeing: Enzymatic colourations driven by homo- or hetero-polymer synthesis. *Microbial Biotechnology* 3 (3), 324-335.

Jiang, Z., van, L., Barbara and Berry, R., 2000. Hexenuronic acid groups in pulping and bleaching chemistry. *Tappi Journal* 83, 167-175.

Johannes, C., Majcherczyk, A. 2000. Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 524-528.

Jordan, B., 1996. The Properties of Bleached Pulp - Brightness: Basic Principles and Measurement. Dence, C. W. and Reeve, D. W., (ed.). *Pulp Bleaching - Principles and Practice*. 1^a ed. Atlanta: Tappi Press. 695-716.

Kaldor, A.F., Karigren, C., Herwest, H., 1999. Kenaf - a fast growing fiber source for papermaking. *Tappi Journal* 59-66.

Karhunen, P., Petteri, R., Sipila, J., Brunow, G., 1995. Dibenzodioxocins: A novel type of linkage in softwood lignin. *Tetrahedron Letters* 36, 166-170.

Kawai, S., Umezawa, T., Higuchi, T., 1987a. *p*-Benzoquinone monoketals, novel degradation products of β -O-4 lignin model compounds by *Coriolus versicolor* and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 210, 61-65.

Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M., Higuchi, T., Koide, K., Nishida, T., Morohoshi, N., Haraguchi, T., 1987b. C_α-C_β cleavage of phenolic b-1 lignin substructure model compound by laccase of *Coriolus versicolor*. *Mokuzai Gakkaishi* 33, 792-797.

K.E.F.I.: Kenaf Eco Fibers Italy S.p.A. www.kenaf.fiber.com. Consulta :
Desembre 2012

Kenealy, W. R., Jeffries, T.W., 2003. Enzyme processes for pulp and paper: A review of recent developments, in: Wood derioration and preservation: advances in our changing world. ACS Symposium Series. Volume 845. Oxford Press, Washington, USA, pp. 210-239.

Kirk, K., Kullen, D., 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi, in: Young, R. A. and Akhtar, M. (Eds.), Environmentally friendly technologies for pulp and paper industry. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA, pp. 273-308.

Kissinger, M., Fix, J., Rees, W.E., 2007. Wood and nonwood pulp production: Comparative ecological footprint on the Canadian prairies. *Ecological Economics* 62, 552-558.

Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. , Bohn, A., 2005. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie, International Edition* 44, 3358-3393.

Kudanga, T., Nyanhongo, G.S., Guebitz, G.M., Burton, S., 2011. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 48, 195-208.

Leponiemi, A., 2008. Non-wood pulping possibilities- a challenge for the chemical pulping industry. *Appita Journal* 61, 234-243.

Li, J., Gellerstedt, G., 1997. The contribution to kappa number from hexeneuronic acid groups in pulp xylan. *Carbohydrate Research* 302, 213-218.

Lin, J-G., Ma, Y-S., 2000. Oxidation of 2-chlorophrnlol in water by ultrasound / Fenton method. *Journal of Environmental Engineering* 130-137.

Lips, H. A., 1991. Pulpa y papel. *Química y Tecnología Papelera*. Casey, P. J. (ed.). 1ª ed. México: Noriega Limusa, vol. 3: 217-263.

López, F., García, J.C., Pérez, A., García, M.M., Feria, M.J., Tapias, R., 2010. *Leucaena diversifolia* a new raw material for paper production by soda-ethanol pulping process. *Chemical Engineering Research and Design* 88, 1-9.

Madakadze, I.C., Radiotis, T., Li, J., Goel, K., Smith, D.L., 1999. Kraft pulping characteristics and pulp properties of warm season grasses. *Bioresource Technology* 69, 75-85.

Madakadze, I.C., Masamvu, T M., Radiotis, T., Li, J., Smith, D.L., 2010. Evaluation of pulp and paper making characteristics of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum) and switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *African Journal of Environmental Science and Technology* 4, 465-470.

Marques, G., 2010. Valoración de diferentes cultivos para la fabricación de pasta de papel: Caracterización química, modificaciones estructural de sus constituyentes orgánicos durante los procesos de cocción y blanqueo y aplicaciones biotecnológicas. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Marques, G., Rencoret, J., Gutierrez, A., del Rio, J.C., 2010. Evaluation of the chemical composition of different non-woody plant fibers used for pulp and paper manufacturing. *Open Agriculture Journal* 4, 93-101.

Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Villar, J.C., 2011. Biobleaching of *Eucalyptus* bglobulus kraft pulps: Comparison between pulps obtained from exploded and non-explodes chips. *Biorersource Technology* 102, 4530-4535.

Martínez, M.J., Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T., 1994. Studies on homoveratric acid transformation by the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41, 500-504.

McGinnis, G.D., Shafizadeh, F., 1981. Cellulose and hemicellulose. Casey, J.P. (ED). *Pulp and Paper: Chemistry and Chemical Technology*. John Wiley and Sons, pp.1-38.

Mikolasch, A., Schauer, F., 2009. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82, 605-624.

Mohanty, A.K., Misra, A., Drzal, L.T., 2005. Natural fibers, biopolymers, and biocomposites. CRC Press, Taylor and Francis Group.

Moldes, D., Díaz, M., Tzanov, T., Vidal, T., 2008. Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Bioresource Technology* 99, 7959–7965.

Moldes, D., Vidal, T., 2008. Laccase–HBT bleaching of eucalyptus kraft pulp: Influence of the operating conditions. *Bioresource Technology* 99, 8565-8570.

Moldes, D., Cadena, E.M., Vidal, T., 2010. Biobleaching of eucalypt kraft pulp with a two laccase-mediator stages sequence. *BioresourceTechnology* 101, 6924-6929.

Moore, G., 1996. Nonwoodfibre applications in papermaking. Pira Internacional. Leatherhead. Surrey. UK.

Morrison, R.T., Boyd, R.N., 1998. Organic Chemistry. Allyn and Bacon, Inc., Boston. Massachusetts.

Nelson, P.J., Chin, C.W.J., Viikari, L., Tenkanen, M., 1998. The use of a laccase mediator stage in bleaching eucalypt Kraft pulps. *Appita Journal* 51, 451-455.

Nishimura, N.; Izumi, A.; Kuroda, K., 2002. Structural characterization of kenaf lignin: differences among kenaf varieties. *Industrial Crops and Products*. 15(2):115-122.

Nousiainen, P., Maijala, P., Hatakka, A., Martínez, Á. T. and Sipila, J., 2009. Syringyl-type simple plant phenolics as mediating oxidants in laccase catalyzed degradation of lignocellulosic materials: model compound studies. *Holzforschung* 63, 699-704.

Ohtani, Y., Mazumber, B.B., Sameshima, K., 2001. Influence of the chemical composition of kenaf bast and core on the alkaline pulping response. *Journal Wood Science* 59(3), 30-35.

Oudia, A., Queiroz, J., Simoes, R., 2008. Potencial and limitation of *Trametes versicolor* laccase on biodegradation of *Eucalyptus globulus* and *Pinus pinaster* kraft pulp. *Enzyme Microbial Technology* 43, 144-148.

Page, D. H., 1989. The beating of chemical pulps - the action and the effects, in: Baker, C. F. and Punton, V. W. (Eds.), *Transactions of the 9th Fundamental Research Symposium. Volume 1: Fundamentals of Papermaking*. Mechanical Engineering Publications Ltd., London, England, pp. 1-38.

Paice, M. G., Bourbonnais, R., Reid, I. D., Archibald, F. S., Jurasek, L., 1995. Oxidative bleaching enzymes: A review. *Journal of Pulp and Paper Science* 21, J280-J284.

Pande, H., 1998. Non wood fibre and global fibre supply. *Unasylva* 193, 49, 44-50.

Parham, R. A., 1983. Ultrastructure and chemistry, in: Kocurek, M. J. and Stevens, C. F. B. (Eds.), Pulp and paper manufacture. Volume 1: Properties of fibrous raw materials and their preparation for pulping. Joint Textbook Committee of the Paper Industry, TAPPI Press, Atlanta, USA, pp. 35-43.

Pauler, N., 1990. Propietes optiques du Papier AB Lorentzen & Wettre, Gábor, Ludwig, Mémeth, Hungrie.

Popson, S.J.; Malthouse, D.D.; Crawford, B.T., Popson, M.T., Crawford, P.M., 1996. Measurement and Control of the Optical Properties of Paper Technidyne Color Corporation.

Riva, S., 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. Trends in Biotechnology 24, 219-226.

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. UPC, Tesis Doctoral. Departament d' Enginyeria Tèxtil i Paperera.

Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F., Vidal, T. 2003. Effect of xylanase on ozone bleaching kinetics and properties of Eucalyptus kraft pulp. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 78(1), 1023- 1031.

Roncero, M. B., Torres, A.L., Colom, J. F., Vidal, T., 2005. The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps. Biorresource Technology 96-1-21-30.

Schröder, M., Aichering, N., Gübitz, G.M., Kokol, V., 2007. Enzymatic coating of lignocellulosic surfaces with polyphenols. Biotechnological Journal 2, 334-41.

Sealey, J., Ragauskas, A.J. y Elder, T.J., 1999. Investigations into laccase-mediator delignification of kraft pulps. Holzforschung 53, 498-502.

Sears, K. D., Alexander, W. J., Goldschmid, O., Halmiton, J.K., 1978. Characterization of hemicelluloses. Studies of representative pulps from Quebec black spruce and balsam fir. Tappi Journal 21, 49-53.

Shatalov, A.A., Pereira, H., 2007. Xylanase pre-treatment of giant reed organosolv pulps: Direct bleaching effect and bleach boosting. *Industrial Crops and Products* 25(3), 248-256.

Shleev, S., Persson, P., Shumakovich, G., Mazhugo, Y., Yaropolov, A., Ruzgas, T., Gorton, L., 2006. Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 841–847.

Sjöström, E., 1981. "Lignin", in: Sjöström, E. (Ed.), *Wood chemistry: fundamentals and applications*. Academic Press, Orlando, USA, pp. 71-88.

Sjöström, E., 1993. *Wood chemistry. Fundamentals and applications*. Academic Press, San Diego.

Ström, M., Bergnor-Gidnert, E., Mellender, P., 1998. Shave and knot elimination with TCF and ECF bleaching sequences. *Tappi Journal* 81(6), 163-169.

Tanaka, T., Takahashia, M., Hagino, H., Nudejima, S., Usuia, H., Fujiib, T., Taniguchia, M., 2010. Enzymatic oxidative polymerization of methoxyphenols. *Chemical Engineering Science* 65, 569-573.

Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19-26.

Toven, K. 2003. Paper properties and swelling properties of ozone-based ECF bleached softwood kraft pulps. *Tappi Journal* 2(2), 3-7.

Tsutsumi, Y., Kondo, R. Sakai, K., Imamura, H., 1995. Difference in reactivity between syringyl and guaiacyl lignin in alkaline systems. *Holzforschung* 49, 423-428.

Turner, J. C., Skerker, P. S., Burns, B. J., Howard, J.C., Alonso, M A., Andres, J. L., 1992. Bleaching with enzymes instead of chlorine-mill trials. *Tappi Journal* 75, 83-89.

Valls, C., 2008. Application of new enzymatic systems for bleaching of eucalypt kraft pulp. PhD Thesis. UPC, Department of Textile and Paper Engineering. <http://www.tdx.cat/TDX-0323109-131410>.

Valls, C., Roncero, M.B., 2009. Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. *Bioresource Technology* 100, 2032–2039.

Valls, C., Vidal T., Roncero, M.B., 2009. The role of xylanases and laccases on hexenuronic acid and lignin removal. *Process Biochemistry* 45, 425-430.

Valls, C., Colom, J F., Baffert, C., Gimbert, I., Roncero, M.B., Sigoillot, J., 2010. Comparing the efficiency of the laccase–NHA and laccase–HBT systems in eucalyptus pulp bleaching. *Biochemical Engineering Journal* 49, 401-407.

Valls, C., Roncero, M.B., 2012. Antioxidant property of TCF pulp with a high hexenuronic acid(HexA) content. *Holzforschung* DOI 10.1515/hf-2012-0114.

van Beek, T.A., Kuster, B., Claassen, F.W., Tienvieri T., Bertaud, F., Lenon G., 2007. Fungal bio-treatment of spruce wood with *Trametes versicolor* for pitch control: Influence on extractive contents, pulping process parameters, paper quality and effluent toxicity. *Bioresource Technology* 98, 302-311.

van Lierop, B., Skothos, A., Liebergott, N., 1996. Section iV. The Technology of Chemical Pulp Bleaching. Chapter 5. Ozone Delignification. *Pulp Bleaching*. Ed Dence i Reeve. Tappi Press. Atlanta. USA. 321-345.

Vuorinen, T., Fagerström, P., Räsänen, E., Vikkula, A. 1997. Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups opens new possibilities for development of bleaching processes. 9th Internacional Symposium on Wood pulping Chemistry. Montreal, Canada.M4-1-M4-4.

Vuorinen, T., Fagerström, P., Buchert, J., Tenkanen, M., Teleman, A., 1999. Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps. *Journal of Pulp and Paper Science* 25, 155-162.

Wareham, D.G., Hall, K.J., Mavinic,D.S., 1993. Real-time control of aerobic-anoxic sludge digestion using ORP. *Journal of Environmental Engineering, ASCE* 119(1), 120-136.

Widsten, P., Kandelbauer, A., 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 293-307.

Widsten, P., Nguyen, T., Laine, J.E., Malmqvist, A., Welander, Y., 2004. In-mill removal of TPM whitewater contaminants by biological treatment in an aerobic biokidney used in conjunction with microfiltration and laccase treatment. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 19,379-83.

Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K.C., Krikstopaitis, K., Deussen, H-J.W., Abbate, E., Galinyte, V., Schneider, P., 2000. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2052-2056.

Zaveri, M., 2004. Absorbency characteristics of kenaf core particle. Master of Science Department of Textile Engineering NORTH Carolina State University. USA.

Normativa

ASTM D1252-06

Determinació de la Demanda Química d'Oxigen de l'aigua.

ASTM D1209-05:2011

Determinació del color en líquids clars (Escala platí- cobalt).

ISO 11475

Determinació propietats òptiques de la pasta.

ISO 2470-1:2009

Determinació grau de blancor de la pasta.

ISO 302:2004

Determinació número kappa de la pasta.

ISO 5351:2010

Determinació de la viscositat de la pasta en una dissolució de coure-etilendiamina (CED).

UNE-EN ISO 11348-3:2009

Qualitat de l'aigua. Determinació sobre la luminescència de *Vibrio fischeri* (Assaig de bacteris luminescents). Part 3: Mètode utilitzant bacteris luminescents liofilitzats (IS= 11348-3:2007).

TAPPI T-233-cm-06

Classificació de la longitud de fibres.

Els continguts del Capítol 3 han estat publicats en l'article:

“Effects of laccase-natural mediator systems on kenaf pulp”.

Autors: G. Andreu i T. Vidal

Bioresource Technology. Volum : 102. Pàgines: 5932- 5937 (2011)

Els continguts del capítol 4 seran publicats en l'article:

Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* and phenolic compounds: Can the efficiency of an enzyme mediator for delignifying kenaf pulp be predicted?

Autors: Glòria Andreu i Teresa Vidal.

Bioresource Technology .

<http://dx.doi.org/10.1016/J.biortech>. On lin:22 gener 2013Acceptat 8 gener

2013. BITTE11197

Els continguts del capítol 5 han estat publicats en l'article:

“A new biobleaching sequence for kenaf pulp: Influence of the chemical nature of the mediator and thermogravimetric analysis of the pulp”

Autors: Glòria Andreu, Agustín G. Barneto, i Teresa Vidal.

Bioresource Technology. Volum : 130. Pàgines: 431–438 (2013)

Una part dels resultats d'aquest capítol es referencien també en l'article:

“Investigating the structure–effect relationships of various natural phenols used as laccase mediators in the biobleaching of kenaf and sisal pulps”

Autors: Agustín G. Barneto, Elisabetta Aracri, Glòria Andreu i Teresa Vidal.

Bioresource Technology. Volum : 112. Pàgines: 327–335 (2012)
