



Universidad Politécnica de Cataluña



Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial y Aeronáutica de Terrassa

Departamento de Ingeniería Textil y Papelera

Estudio del refinado de pastas de papel utilizando métodos biotecnológicos (enzimas)

Tesis doctoral

Edith Marleny Cadena Chamorro

Terrassa, 2008

El Doctor **ANTONIO LUIS TORRES LÓPEZ**, Catedrático de Universidad del Departament de Enginyeria Tèxtil i Paperera de la Universitat Politècnica de Catalunya

CERTIFICA:

que **Edith Marleny Cadena Chamorro**, Ingeniera Química, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado "*Estudio del refinado de pastas de papel utilizando métodos Biotecnológicos (Enzimas)*" que presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste expide el presente certificado en Terrassa a 21 de Noviembre de 2008.

Antonio Luís Torres López
Catedrático de Universidad

A mis padres y familia
Al recuerdo de mis abuelos

AGRADECIMIENTOS

La tesis realizada en los laboratorios de la especialidad Papelera y Gráfica del Departamento de Ingeniería Textil y Papelera de la Universidad Politécnica de Cataluña, se ha realizado gracias a la financiación del Programa ALBAN "becas de alto nivel de la Unión Europea para América Latina" N° E04D036666CO; a las Becas UPC de investigación para finalización de la tesis doctoral; y a los siguientes proyectos:

- Proyecto nacional CICYT CTQ2004-07560-C02-01 (REFILAB) "Estudio y optimización de nuevos procesos de refinado y blanqueo de pastas de papel reciclado aplicando métodos biotecnológicos"
- Proyecto nacional CTQ2005-08925-C02-01 (ENZPULP) "Desarrollo de nuevos procesos de blanqueo de pastas para papel de alta calidad e interés estratégico utilizando sistemas enzimáticos mejorados"
- Proyecto europeo NMP2-CT-2006-026456 (BIORENEW) "White Biotechnology for added value products from renewable plant polymers: Design of tailor-made biocatalysts and new industrial processes"
- Proyecto nacional CTQ2007-68003-C02-01 (BIOFIBER) "Optimización de nuevos procesos de reciclado de papeles ECF y TCF incluyendo tratamientos enzimáticos"

Estos años de tesis se han convertido en una experiencia enriquecedora e inolvidable, y detrás de ella he recibido el apoyo constante de muchas personas, su ayuda ha sido indispensable en este proceso, a todos muchas gracias por darme la oportunidad de crecer a nivel profesional y personal. Especiales agradecimientos:

Al **Dr. Antonio L. Torres**, director de esta tesis, por su gran orientación en el desarrollo de esta investigación, y por recibir un continuo apoyo. Las horas invertidas en transmitirme sus conocimientos son incontables, horas agradables que me han permitido adquirir experiencia en el campo científico y también en el personal; horas que siempre serán recordadas. Estoy inmensamente agradecida por su confianza, dedicación, por sus consejos y por pensar en mi bienestar y futuro.

A la **Dra. Teresa Vidal** por su valioso aporte a la realización de este proyecto; su gran vitalidad y acertados consejos han permitido sacar muy buenos resultados y hacer que la investigación sea muy agradable, por permitirme seguir en el grupo de investigación y mil gracias por su confianza, por el apoyo, por cuidarnos y animarnos constantemente.

A los **Drs. Javier Pastor, Pilar Díaz** y a **Iulia Chiriac** del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona por suministrar las celulasas, por vuestra disponibilidad para transmitir los amplios conocimientos biotecnológicos; y por los buenos momentos que hemos compartido en reuniones y viajes inolvidables.

Al **Dr. Josep F. Colom** por estar pendiente del desarrollo de esta tesis, por sus consejos, confianza, tiempo y disponibilidad para transmitir sus experiencias y amplios conocimientos.

A los **Drs. Blanca Roncero y José Antonio García Hortal** por su buena disposición para resolver cualquier problema e inquietud, por transmitirme sus conocimientos, y prácticas orientaciones investigativas.

A **Antonio Clemente y Adrian Oliva**, por la constante ayuda y disponibilidad para la consecución del material de laboratorio y por la introducción en los métodos experimentales y equipos; por el buen humor que hacen que los momentos compartidos sean inolvidables.

Al **Grupo empresarial ENCE**, por suministrar las pastas papeleras para realizar los estudios de refinado. A **NOVOZYMES®** por suministrar la lacasa, a **la Universidad Complutense de Madrid** y **Torraspapel S.A** por su colaboración para realizar los refinados en el estudio del acondicionamiento de superficies.

A **Mercedes Escusa** del Departamento de Ingeniería Textil y Papelera, por su colaboración en las sesiones de microscopia electrónica de barrido (SEM).

A **Cris y Ursula**, por recibirme con los brazos abiertos en el laboratorio, e introducirme en los métodos experimentales, gracias por brindarme vuestra

amistad, compartir las múltiples alegrías, por ser tan especiales y transmitirme constantemente la cultura catalana, y por supuesto... un poquito de la brasileña.

A **Jordi**, muchas gracias por tu confianza, alegría y tu disposición para escucharme y dar tu opinión; por las horas y horas agradables que dedicamos al laboratorio y despacho para descubrir el mundo de las fibras y sacar adelante a "misión imposible".

A los chicos de papel: **Amandita, Elisabetta, Glòria, Diego, Carlos** por sorprenderme cada día con las múltiples historias, aventuras y experiencias, anécdotas que le dan chispa a la vida; son personas maravillosas de las cuales estoy muy agradecida por vuestra disposición; y por los agradables e inolvidables momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

A **Maria, Sílvia y Rosa**, por la gran disponibilidad para realizar trámites y gestiones administrativas; por el buen humor, confianza y amabilidad; y a los **chicos de proyectos** que dejan su huella en el laboratorio (Giulio, Albert, Josep, Jose,...).

A mis **amigos**, Paula por estar siempre allí y transmitirme tu alegría y energía; Anita, Lina, Rodo indescriptible alegría encontrarlos en mi camino; a los chicos de Terrassa "los cuatro J & Compañía" por los gratos momentos que hemos pasado en nuestros días de alta culinaria y festejos, en especial a Javier gracias por tu confianza y amistad. A tío Fabio, Sensen y Liz por los inolvidables momentos compartidos; a todos los que se han cruzado en mi camino para dejar muy buenos recuerdos; y a los amigos que están a miles de kilómetros a quienes les debo sus mensajes sin importar la distancia.

A mi segunda familia, **Maga y Javi**, eternamente agradecida por adoptarme en vuestro hogar y tratarme con mucho cariño, mil gracias por todo el apoyo, por los acertados consejos, y por estar pendientes en todo momento. Igualmente a la familia de Javi por toda su gentileza.

Especiales agradecimientos a mis **padres**, quienes siempre han confiado en mi, por su cariño y generosidad, y por estar siempre conmigo animándome continuamente y vivir esta gran experiencia juntos; y a mis **hermanos** por todo el cariño, por escucharme y siempre enviarme buena energía.

Nomenclatura

%CrI	Índice de cristalinidad
%IRA	Índice de retención de agua
ζ	Potencial Zeta
A	Absorbancia
CBD3b	Dominio de unión a celulosa de la enzima Cel9B
Cel48C	Tratamientos con la enzima exoglucanasa
Cel9B	Tratamientos con la enzima endoglucanasa
DC	Demanda catiónica
E	Etapa de extracción alcalina
ECF	Secuencia de blanqueo libre de cloro elemental (<i>Elemental Chlorine Free</i>)
Fn3	Dominio de unión a fibronectina de la enzima Cel9B
g p.s.	Gramos de pasta seca
GH9-CBD3c	Dominio catalítico de la enzima Cel9B
HBT	1-hidroxibenzotriazol, mediador
HexAs	Ácidos hexenurónicos
I	Intensidad
IU/g p.s.	Unidades de enzima por gramos de pasta seca
IU/kg p.s.	Unidades de enzima por kilogramo de pasta seca
k	Tratamientos control
kLR	Tratamiento control del sistema lacasa-mediador y etapa reductora
L	Tratamiento con el sistema lacasa-mediador
L*a*b*	Coordenadas cromáticas
LE	Extracción alcalina posterior al tratamiento sistema lacasa-mediador
LE_HexAs	Remoción química de HexAs posterior a la secuencia LE
L _{HBT}	Tratamiento sistema lacasa-mediador, con mediador HBT
L _L	Longitud media aritmética de fibra ponderada en longitud
L _n	Longitud media aritmética de fibra
LR	Tratamiento sistema lacasa-mediador y etapa reductora
LRE	Tratamiento sistema lacasa-mediador, etapa reductora y extracción alcalina
NK	Número kappa

NK _{HexAs}	Número kappa debido a los ácidos hexenurónicos
NK _{Lig}	Número kappa debido a la lignina residual
NK _{OE}	Número kappa debido a otras estructuras
°SR	Grado Schopper-Riegler
Pb Bendtsen	Permeabilidad Bendtsen
PFI	Equipo de refinado
PI	Pasta inicial
R	Etapa reductora con NaBH ₄
rev.	Número de revoluciones
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TCF	Secuencia de blanqueo totalmente libre de cloro (<i>Totally Chlorine Free</i>)
TCF_HexAs	Pasta TCF sin contenido de ácidos hexenurónicos
TLC	Cromatografía en capa fina
Visc.	Viscosidad específica
W _n	Ancho medio aritmética de la fibra
XRD	Difracción de rayos X

ÍNDICE

RESUMEN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1-1
1.1 PASTAS DE FRONDOSAS	1-1
1.1.1 Constituyentes de las fibras celulósicas	1-3
1.2 FABRICACIÓN DE PAPEL	1-4
1.2.1 Obtención de pastas y blanqueo	1-5
1.2.2 Proceso de Refinado	1-7
1.3 BIOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA PAPELERA	1-9
1.4 OBJETIVOS	1-13
1.5 BIBLIOGRAFÍA	1-14
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	2-1
2.1 REFINADO: MOLINO PFI	2-1
2.2 OBTENCIÓN DE HOJAS Y ENSAYOS FÍSICOS	2-3
2.2.1 Ensayos físicos sobre las hojas de papel	2-4
2.3 TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS	2-6
2.3.1 Aplicación de enzimas hidrolíticas:	2-6
2.3.2 Aplicación de enzimas oxidativas	2-7
2.4 ANALISIS DE LEJÍAS RESIDUALES	2-8
2.5 EFECTO DE LOS BIOTRATAMIENTOS EN LAS PASTAS	2-9
2.5.1 Caracterización inicial	2-9
2.5.2 Determinación de la cristalinidad	2-9
2.5.3 Determinación de grupos funcionales	2-10
2.5.4 Ácidos Hexenurónicos [HexAs]	2-12
2.5.5 Propiedades electrocinéticas	2-15
2.6 ESTABILIDAD DE LAS PASTAS ECF Y TCF	2-17
2.7 BIBLIOGRAFÍA	2-18

CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN INICIAL Y CURVAS DE REFINADO DE LAS PASTAS KRAFT ECF Y TCF	3-1
3.1 INTRODUCCIÓN	3-1
3.1.1 Principios básicos de la operación de refinado	3-3
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	3-6
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	3-7
3.4 CONCLUSIONES	3-17
3.5 BIBLIOGRAFÍA	3-19
CAPÍTULO 4. APLICACIÓN DE CELULASAS CEL9B. BIOREFINADO DE PASTAS PAPELERAS ECF	4-1
4.1 INTRODUCCIÓN	4-1
4.1.1 Celulasas y sus mecanismos de acción	4-4
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	4-5
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	4-6
4.3.1 Influencia enzimática de “Cel9B” en la operación de refinado	4-6
4.3.2 Influencia de la enzima Cel9B en la morfología de las fibras	4-15
4.3.3 Capacidad de hidrólisis de la celulasa Cel9B	4-18
4.3.4 Estudio del tratamiento control	4-20
4.4 CONCLUSIONES	4-26
4.5 BIBLIOGRAFÍA	4-27
CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN DE LA CELULASA CEL48C, SINERGISMO ENDO-EXO (CEL9B + CEL48C) EN LA PASTA ECF Y EFECTO DE BIOREFINADO CON CEL9B EN LA PASTA TCF	5-1
5.1 INTRODUCCIÓN	5-1
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	5-3
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5-4
5.3.1 Influencia enzimática de “Cel48C” en refinado de la pastas ECF	5-4
5.3.2 Sinergismo “endo-exo”, aplicación enzimática de Cel9B+Cel48C	5-7
5.3.3 Aplicación de la enzima Cel9B en pastas TCF	5-12
5.4 CONCLUSIONES	5-15
5.5 BIBLIOGRAFÍA	5-16

CAPÍTULO 6. APLICACIÓN DE CELULASAS Y DOMINIOS DE UNIÓN A CELULOSA RECOMBINANTES EN EL REFINADO DE PASTA KRAFT TCF	6-1
6.1 INTRODUCCIÓN	6-1
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS	6-4
6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6-5
6.3.1 Influencia de las celulasas recombinantes en el refinado	6-5
6.3.2 Efecto de las celulasas recombinantes en la resistencia del papel	6-11
6.3.3 Efecto de las celulasas recombinantes en la morfología de las fibras	6-17
6.4 CONCLUSIONES	6-22
6.5 BIBLIOGRAFÍA	6-24
CAPÍTULO 7. APLICACIÓN DEL SISTEMA LACASA-MEDIADOR EN PASTAS BLANQUEADAS TCF Y ECF	7-1
7.1 INTRODUCCIÓN	7-1
7.2 MATERIALES Y MÉTODOS	7-3
7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7-4
7.3.1 Efecto de L_{HBT} sobre el número kappa y ácidos hexenurónicos	7-4
7.3.2 Oxidación de la celulosa	7-9
7.3.3 Efecto del sistema lacasa-mediador en el refinado	7-11
7.4 CONCLUSIONES	7-17
7.5 BIBLIOGRAFÍA	7-18
CAPÍTULO 8. INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS HEXENURÓNICOS EN EL ENVEJECIMIENTO Y REFINADO DE PASTAS KRAFT	8-1
8.1 INTRODUCCIÓN	8-1
8.1.1 Formación de HexAs	8-2
8.2 MATERIALES Y MÉTODOS	8-3
8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8-5
8.3.1 Estabilidad de propiedades ópticas en pastas TCF y ECF	8-5
8.3.2 Disminución de la reversión de blancura con aplicación enzimática	8-10
8.3.3 Influencia de los HexAs en el refinado	8-14
8.4 CONCLUSIONES	8-20
8.5 BIBLIOGRAFÍA	8-22

CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES GENERALES	9-1
9.1 APLICACIÓN DE CELULASAS	9-2
9.2 APLICACIÓN DEL SISTEMA LACASA-MEDIADOR	9-4
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	B-1
ANEXO	A-1

RESUMEN

La presente tesis se enmarca en una de las líneas de investigación del Grupo de Investigación Papelero y Gráfico (CIPAGRAF) -Departamento de Ingeniería Textil y Papelera, Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)- orientado a la Aplicación de la Biotecnología en los Procesos de Fabricación del Papel, en particular a la aplicación de métodos biotecnológicos en la operación de refinado para potenciar la modificación de las fibras celulósicas mediante la utilización de enzimas. El objetivo es la obtención de una etapa de “biorefinado” aportando una disminución del consumo energético requerido por el refinado mecánico, así como la consecución de una tecnología limpia que cumpla con las leyes medioambientales.

En la investigación de nuevas técnicas biotecnológicas (enzimas) en la operación de refinado se utilizan enzimas hidrolíticas (celulasas). También, debido al gran auge de las enzimas oxidativas (lacasas) en procesos de bioblanqueo, se estudia su influencia indirecta sobre las fibras y, consecuentemente, en el proceso de refinado y la calidad del papel. Los efectos de estas enzimas son evaluados en pastas kraft de *Eucalyptus globulus* con secuencias de blanqueo ECF y TCF.

El “biorefinado” está influido por la efectividad de las enzimas para favorecer el proceso de refinado. Al mismo tiempo depende de la materia prima y así lo revela el comportamiento diferencial de las pastas ECF y TCF. La diferente severidad de los procesos de obtención (cocción y blanqueo) confiere propiedades específicas a las fibras y causará diferentes alteraciones sobre su composición química. Estas alteraciones condicionaran la aptitud al refinado de las pastas. La comparación de los dos tipos de pastas permite afirmar que la secuencia TCF causa mayor cambio estructural en las fibras y, como consecuencia, se obtiene una más rápida respuesta en la operación de refinado.

La aplicación de la enzima Cel9B (1,4-β endoglucanasa) de *Paenibacillus barcinonensis* en la pasta ECF potencia su respuesta al refinado, efecto que se revela al conseguir una aceleración de los efectos primarios y secundarios del refinado y fenómenos como la mayor hidratación en la matriz interna de las fibras que favorecen los mecanismos de cohesión interfibrillar que generan resistencia en el papel. Este efecto de biorefinado permite catalogar a la enzima Cel9B como “coadyuvante del refinado”. Su aplicación permite reducir la energía de refinado para conseguir determinadas propiedades de resistencia. En las pastas TCF la acción de Cel9B

también genera cambios en las fibras, verificándose así su actuación sobre las fibras celulósicas.

Para evaluar la posibilidad de un sinergismo entre celulasas que incremente el efecto individual de la enzima Cel9B en el refinado se estudió el sistema endo-exo entre endoglucanasas (Cel9B) y exoglucanasas (Cel48C); este posible efecto sinérgico se descarta ya que no se obtienen propiedades de resistencia superiores al efecto individual de la celulasa Cel9B.

La etapa de biorefinado con la enzima Cel9B permite identificar en su estructura modular [GH9-CBD3c-Fn3-CBD3b] el dominio responsable de la modificación de las fibras. La aplicación de las celulasas recombinantes de Cel9B: dominio catalítico [GH9-CBD3c], dominios de unión a celulosa [Fn3-CBD3b] y [CBD3b] revelan que la mayor contribución del efecto de biorefinado se debe a la actuación del dominio catalítico [GH9-CBD3c]. Estos resultados innovadores muestran que la aplicación de esta celulasa recombinante produce aumentos de resistencia en el papel, con mejor respuesta en la resistencia al desgarro que la obtenida con la enzima completa Cel9B.

En el estudio de la aplicación de la enzima lacasa de *Trametes villosa* con el mediador HBT -1-hidroxibenzotriazol- se encontró que el sistema lacasa-mediador (LMS) oxida la celulosa de las pastas blanqueadas (generación de grupos carbonilo) y modifica el contenido de los ácidos carboxílicos presentes en la pasta TCF y, a su vez, las propiedades electrocinéticas; estos resultados se vinculan a la remoción parcial de los ácidos hexenurónicos [HexAs]. También se ha encontrado que el LMS no degrada la celulosa, y su influencia en el refinado de la pasta TCF se considera positiva.

La eliminación de ácidos hexenurónicos con el LMS tiene especial interés al verificar su influencia en la determinación del número kappa y en la estabilidad de las propiedades ópticas; así el LMS reduce la reversión de la blancura por su efecto en la eliminación de los HexAs.

El estudio de envejecimiento acelerado mediante luz y calor de la pasta TCF pone en evidencia la interferencia de los HexAs en la reversión de la blancura; la aplicación del LMS es una alternativa potencial para la obtención de papeles permanentes y resistentes. Además la remoción de HexAs modifica las propiedades de las pastas en la operación del refinado, destacándose un aumento de la drenabilidad para un valor específico de resistencia, manteniendo la energía requerida en el refinado.

ABSTRACT

The present thesis is placed within the frame of one of the lines of research of the Paper and Graphic Research Group (CIPAGRAF) -Department of Textile and Paper Engineering (DETIP), Technical University of Catalonia (UPC)-. The study is orientated to the Application of the Biotechnology in the Paper Manufacturing Processes. It deals with the application of biotechnological methods in the refining operation to promote the modification of the cellulose fibers by means of the utilization of enzymes. The goal is to get a stage of "biorefining" contributing to the decrease of the energy consumption - needed by the mechanical refining - and in the use of clean technologies that comply with the environmental laws.

In the research of new biotechnological techniques (enzymes) hydrolytic enzymes (cellulases) are used. Also, due to the growing importance of oxidative enzymes (laccases), it is studied their influence on fibers, on refining and in the quality of paper. The effects of these enzymes are evaluated in ECF and TCF kraft pulps of *Eucalyptus globulus*.

Biorefining depends on the efficacy of enzymes to enhance the refining process. At the same time the raw material highly influence the refining process. That is proved by the differences of refining behaviour shown by the ECF and TCF pulps.

The different severity of the production processes (pulping and bleaching) gives specific properties to the fiber, as they cause different alterations of their chemical structure. These alterations determine the refining aptitude of the pulps. The comparison of both types of pulps (ECF and TCF) allows to affirm that the sequence TCF causes major structural changes in the fibers and, as a consequence, a more rapid response is obtained in the refining operation.

The enzyme Cel9B (1,4- β endoglucanase) of *Paenibacillus barcinonensis* promotes a significant response in the refining of the ECF pulp, this fact is revealed by an increase of the primary and secondary refining effects. Phenomena like the higher hydration in the internal matrix of the fibers aids the mechanisms of interfibrillar cohesion that generate the mechanical resistance in the paper. This biorefining effect allows to catalogue the enzyme Cel9B as a "refining helper" or "booster". Its application allows to reduce the refining energy and, also, to obtain certain strength properties. In the TCF pulp the action of Cel9B also generates changes in the refined fibers.

To evaluate the possibility of a synergistic effect between cellulases that increase the individual effect of the enzyme Cel9B, the system endoglucanase (Cel9B) - exoglucanase (Cel48C) was studied. The possible synergistic effect was discarded since the strength properties attained are not higher than the individual effect of the cellulase Cel9B.

The biorefining stage with enzyme Cel9B allows to identify the responsible domain of the fibers modification in its modular structure [GH9-CBD3c-Fn3-CBD3b]. The application of recombinant cellulase Cel9B: catalytic domain [GH9-CBD3c], cellulose-binding domains [Fn3-CBD3b] and [CBD3b] shows that the greatest contribution of the biorefining effect is due to the performance of catalytic domain [GH9-CBD3c]. These innovative results show that the application of this recombinant cellulase produces increases of paper resistance, specially in tear strength in comparison with the complete enzyme Cel9B.

In the study of the application of the enzyme laccase of *Trametes villosa* with the mediator HBT-1-hidroxibenzotriazol it was found that the laccase-mediator system (LMS) oxidizes bleached pulp (generation of carbonyl groups) and modifies the content of the carboxylic acids present in the TCF pulp. Also, the electrokinetic properties are modified. These results are related to the partial elimination of hexenuronic acids [HexAs]. It has also been found that the LMS does not degrade the cellulose, therefore its influence on refining the TCF pulp is considered positive.

The elimination of the hexenuronic acids with the LMS has special interest due to its influence on the kappa number and on the stability of the optical properties; LMS reduces the brightness reversion by removing the HexAs.

The accelerated aging by light and heat of the TCF pulp highlights the influence of HexAs in the brightness reversion; the application of the LMS is a potential alternative for obtaining permanent and resistant papers.

In addition HexAs' elimination modifies the properties of the pulp in the refining operation, causing an important increase of the drainability for a specific value of strength and the same refining energy.

CAPÍTULO 1.

Introducción y objetivos

Los avances biotecnológicos han permitido el desarrollo de nuevas tecnologías que permiten procesos más amigables con el medio ambiente, este es el caso de los procesos papeleros, donde la aplicación de la biotecnología ha revelado importantes resultados que reducen el impacto ambiental y costos. Para dar una idea general de la introducción del campo biotecnológico en la producción de pastas y papel se introduce los puntos claves de los procesos papeleros, comenzando por la materia prima utilizada en esta investigación (pastas kraft de Eucalyptus globulus) y realizando énfasis en la operación de refinado y la utilización de enzimas como las celulasas y lacasas en la industria papelera.

1.1 FIBRAS DE FRONDOSAS

Durante mucho tiempo, la longitud de fibra ha sido un factor de gran importancia para determinar la calidad de las pastas papeleras, las frondosas proporcionan fibras más cortas (longitud media comprendida entre 0.75 y 1.5 mm) en comparación a las coníferas, es por esto que este tipo de fibras fueran consideradas menos aptas para la fabricación del papel. Sin embargo la tendencia a usar pastas de fibra corta es creciente debido a la escasez de recursos forestales, elevación de costos de otros tipos de madera y a la demanda mundial de productos papeleros (García Hortal, 2007).

En las frondosas existen cuatro tipos generales de fibras que se dividen en dos categorías: las fibras verdaderas (libriformes y/o traqueadas) y traqueidas (vasculares y vasicéntricas), donde las fibras verdaderas se encuentran en todas las especies y son el componente mayoritario. A diferencia de las fibras de coníferas, las frondosas tienen un alto contenido en constituyentes no fibrosos (vasos, segmentos de vasos y restos de la pared celular) que afectan tanto a la fabricación del papel como a las

propiedades finales de la hoja. Los vasos son un importante componente de las frondosas, estos representan el sistema de conducción longitudinal de las plantas y están compuestos por células individuales que están conectadas verticalmente entre sí para formar unos tubos de longitud indeterminada cuya función principal es la conducción ascendente de agua y nutrientes, su longitud media esta comprendida entre 0.4 - 0.8 mm con un máximo de 1.1 - 1.3 mm y el diámetro oscila desde 20 a 500 μm . Las propiedades papeleras de los vasos son inferiores a las fibras, no tienen la capacidad de generar enlaces por consiguiente no contribuyen a la resistencia del papel y pueden ser un inconveniente en los papeles impresión escritura, ya que ocasionalmente pueden ser arrancados de la superficie de la hoja durante el proceso de impresión dependiendo de su tamaño, abundancia y posible degradación que se realice durante el refinado.

Las frondosas en comparación a las coníferas como materia prima papeleras son menos atractivas debido al menor rendimiento, pero presentan ventajas en cuanto a su menor contenido en lignina. Los elementos no fibrosos encontrados en la madera, vasos y células cortas de parénquima, reducen la uniformidad de la pasta y la resistencia superficial del papel. La morfología de las fibras, de pared relativamente gruesa y lumen estrecho las hace más propensas a retener una forma cilíndrica, y menos colapsada en la hoja de papel, por esto las propiedades de resistencia son inferiores a las coníferas. Las ventajas de la utilización de las fibras cortas están vinculadas a propiedades importantes del papel y cartón como imprimabilidad, lisura, opacidad, mano y rigidez. En general las pastas de frondosas se utilizan en calidad de papel y cartón destinadas a la impresión, donde se requiere mayor calidad con respecto a las propiedades superficiales y apariencia. Actualmente las frondosas se utilizan en la obtención de pastas químicas blanqueadas y semiquímicas, y son introducidas en los procesos de obtención de pastas de alto rendimiento.

De las pastas de frondosas las más utilizadas en el mercado europeo corresponde a las provenientes del *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus saligna*. Las pastas de eucalipto son frondosas comúnmente llamadas *latifolias*, *caducifolias* y maderas duras (*hardwood*) (García Hortal, 2007). Del género *Eucalyptus* existen alrededor de 700 especies distribuidas por gran parte del mundo y debido a su rápido crecimiento se utilizan en plantaciones forestales para la industria papeleras, maderera o para la obtención de productos químicos.

La introducción del *Eucalyptus globulus* en la industria papeleras genera gran interés debido a sus características para obtener papel impresión escritura, papel tisú, sobres

y bolsas, bases para estucados y soporte de laminados, y otros tipos de aplicaciones en los que se requiere buena formación, opacidad, porosidad (óptima absorción de tinta en el proceso de impresión y su posterior secado) y lisura.

1.1.1 Constituyentes de las fibras celulósicas

La celulosa junto con la hemicelulosa y la lignina son los principales polímeros mayoritarios de la lignocelulosa. La celulosa es un polímero lineal compuesto hasta por 10.000 moléculas D-glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos β (1-4). La estereoquímica impuesta por la unión β -(1-4) glucosídica crea una larga cadena lineal donde cada residuo de glucosa presenta una rotación de 180° respecto al residuo contiguo, por lo que la celobiosa es la unidad básica de la celulosa (Delmer and Amor, 1995); las cadenas se unen mediante enlaces puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals generando fibrillas elementales que a su vez se asocian íntimamente para formar microfibrillas que tienen diferente orientación en cada nivel de la pared secundaria (Figura 1-1), y se caracterizan por ser rígidas, insolubles y de estructura fibrillar ordenada (alta cristalinidad).

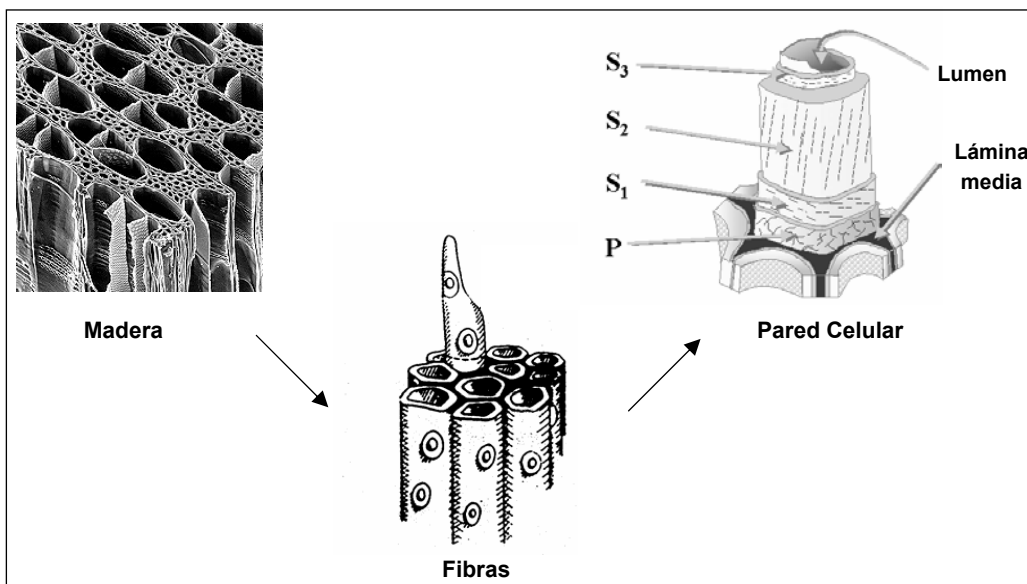


Figura 1-1. Estructura de la madera y de la pared celular de las fibras vegetales, P: pared primaria, S₁: pared secundaria externa, S₂: pared secundaria media, S₃: pared secundaria interna y LM: lámina media. (Kirk and Cullen, 1998)

Las zonas de elevada cristalinidad dificultan la penetración de disolventes y reactivos químicos, contrario a las zonas relativamente más desordenadas (amorfás) que son

más accesibles a las reacciones químicas, y que además favorecen el hinchamiento, alargamiento y la flexibilidad de las fibras (Annergren, 1996; García Hortal, 2007; Zhao et al., 2007).

Las hemicelulosas son polisacáridos químicamente heterogéneos y constituidos por diferentes unidades de monosacáridos (pentosas, hexosas y ácidos urónicos) que se encuentran unidos por enlaces glucosídicos formando estructuras ramificadas y en general amorfas. Las hemicelulosas actúan junto con la lignina como matriz soporte para las microfibrillas de celulosa en la pared celular, y su estructura varía según el tipo de madera; en las frondosas se encuentran principalmente hemicelulosas con cinco unidades de carbonos (pentosas).

La lignina es un polímero aromático que da soporte estructural a los tejidos de las plantas e impermeabilidad a los elementos vasculares; actúa como material incrustante entre la lámina media y las paredes de la fibra, y debido a su carácter hidrofóbico tiende a expandirse a través de la pared celular, desplazando al agua y formando una red hidrofóbica que dificulta el hinchamiento de la fibra y el refinado de las pastas. El tipo de uniones y unidades presentes en la lignina (estructura básica) difieren según el tipo de plantas; en las coníferas se forma mayoritariamente a partir del alcohol coniferílico (unidad G), mientras que la lignina de frondosas se sintetiza a partir de los alcoholes coniferílico y sinapílico (unidades G y S) (Hibberd et al., 1999; Lachenal and Muguet, 1992), siendo la unidad S más reactiva que la unidad G, por consiguiente la madera de coníferas presentan mayor dificultad para los procesos de deslignificación (del Rio et al., 2007).

1.2 FABRICACIÓN DE PAPEL

El papel y los productos papeleros tienen marcada importancia en la vida cotidiana, sus aplicaciones son ilimitadas y se encuentran en continuo desarrollo para obtener productos especiales. El nombre de "papel" se deriva de la planta llamada *Cyperus papyrus*, que en el antiguo Egipto se utilizó como el primer material de escritura uniendo entre sí finas láminas del tallo de esta planta, aunque el papel auténtico fue inventado en China (siglo I d.C.) y elaborado a partir de la corteza de la morera papirífera (*Broussonetia Papyrifera*) y de residuos agrícolas (paja de arroz, cáñamo, algodón, etc.) (Colom et al., 1984). Después de varios siglos, el arte de la fabricación del papel alcanzó el oriente medio (siglo VIII) y más tarde, a través de la España árabe, al resto de Europa utilizando como materias primas trapos de lino y algodón;

en el siglo XV existían múltiples molinos papeleros en España, Italia, Alemania y Francia (Smook, 2002). En el siglo XX se desarrolla rápidamente nuevas tecnologías e implementaciones en el sector papelerero con la introducción de nuevas materias primas (fibras madereras - no madereras y fibras sintéticas), técnicas de cocción y blanqueo en continuo (múltiples etapas), estucado en máquina, formación en seco, entre otros avances han permitido mejorar la productividad y cumplir con la creciente demanda que no se ha visto obstaculizada por la tecnología electrónica.

En la formación del papel, las fibras celulósicas deben desarrollar uniones que permitan la obtención de papeles con determinada calidad -que varía según la aplicación final-. Las uniones o enlaces interfibrilares son consecuencia de las atracciones fisicoquímicas en el medio acuoso cuya intensidad queda determinada por el tipo de fibra, por los procesos de obtención (cocción, blanqueo), por los pasos requeridos en la fabricación del papel (desintegración, refinado, secado,...) y por la utilización de productos químicos auxiliares que activan los grupos determinantes para formar una estructura fibrosa con suficiente fuerza de unión para conseguir papeles con determinada resistencia.

El enlace puente de hidrógeno es la principal fuente de unión entre las fibras, el efecto de hidratación de las superficies de las fibras se verifica a través de enlaces de este tipo entre el agua y los grupos hidroxilos de la superficie celulósica cuyo mecanismo de unión se extiende a los grupos hidroxilos de la superficie de las fibras vecinas al eliminar el agua. A medida que se va formando el manto fibroso, las fibras entran en contacto más íntimo y los enlaces puentes de hidrógeno entre fibras contiguas comienzan a desarrollarse y consolidarse a lo largo de la sequería. Las uniones interfibrilares dependen de diversos factores, las mejores condiciones en las fibras de celulosa se presentan cuando se elimina la lignina con substancial retención de hemicelulosas.

1.2.1 Obtención de pastas y blanqueo

La separación de las fibras de celulosa que se encuentran cementadas por la lámina media -compuesta fundamentalmente por lignina- requiere métodos físicos o químicos (Casey, 1980) que permitan la liberación de las fibras con altos rendimientos, este proceso es conocido como pasteado. En los procesos mecánicos se obtiene la pasta desfibrando troncos mediante muelas, o astillas mediante refinados de discos; en estos procesos prácticamente todos los constituyentes estructurales originales del vegetal permanecen en la pasta, por lo que el rendimiento obtenido es próximo al 95% (García Hortal, 2007); la aplicación de las pastas mecánicas se orienta a determinados tipos

de papeles puesto que las fibras, muy lignificadas, son rígidas (característica que limita la capacidad de enlace), y sensibles al envejecimiento óptico (tendencia al amarillamiento por exposición a la luz como consecuencia de la oxidación de la lignina residual y otros componentes de la pasta) (Ragauskas, 1994).

En el pasteado químico se produce una modificación de la lignina por acción de agentes químicos a condiciones alcalinas o ácidas. El método más utilizado actualmente es el proceso kraft (hidróxido sódico y sulfuro sódico) que permite obtener pastas con alta resistencia mecánica y que, al degradar un gran contenido de lignina, las cantidades residuales y grupos cromóforos remanentes se pueden eliminar mediante procesos de blanqueo, generando pastas con elevado grado de blancura.

Para la obtención de papeles impresión escritura es indispensable la eliminación de la lignina residual presentes en las pastas químicas con un proceso de blanqueo; el principal objetivo de esta etapa es incrementar la blancura ya sea por eliminación o modificación de la lignina residual y sus productos de degradación (Fengel and Wegener, 1984). El cloro elemental (Cl_2) era el principal agente oxidante utilizado tradicionalmente; la liberación de clorofenoles y otros compuestos organoclorados en los efluentes del proceso y las normativas medioambientales restrictivas han permitido que la industria papelera elimine el uso del cloro elemental en la etapa de blanqueo, y sea sustituido por dióxido de cloro (ClO_2) en los denominados blanqueos ECF (*Elemental Chlorine Free*) (Valchev et al., 1999). Los continuos avances tecnológicos en esta área consiguen eliminar totalmente el uso del cloro elemental y sus derivados en las secuencias de blanqueo TCF (*Totally Chlorine Free*), proceso que reduce las emisiones de compuestos organoclorados a niveles tolerables por la legislación medioambiental (Ragnar et al., 2004; Roncero and Vidal, 2007; Yadav et al., 2006).

Las secuencias de blanqueo incluyen el uso de oxígeno (O), ozono (Z), peróxido de hidrógeno (P); y la introducción de tratamientos biotecnológicos (enzimas) como las xilanasas (Kuligowski et al., 2006; Roncero et al., 2003b; Valls, 2008) y oxidoreductasas ligninolíticas (Ibarra et al., 2006; Sigoillot et al., 2005; You et al., 2008) revelan grandes ventajas en el blanqueo al reducir la toxicidad de los efluentes y disminuir el consumo de agentes químicos; los tratamientos enzimáticos son potencialmente más selectivos en la eliminación de la lignina (Fillat, 2008; Moldes and Vidal, 2008).

En los procesos químicos de obtención de pastas -operaciones de cocción y blanqueo- es de gran interés preservar la resistencia de las fibras a fin de evitar la formación de puntos débiles en el papel. Las mejores condiciones para la posterior

fabricación del papel se obtienen cuando se elimina la lignina y se retienen importantes cantidades de hemicelulosas; para potenciar la capacidad de enlace interfibrillar y optimizar su contribución a las propiedades fisicomecánicas del papel se introduce la etapa de “refinado” (Torres et al., 2004) puesto que la resistencia final del papel no sólo depende de la resistencia individual de las fibras sino también de las uniones entre ellas, que se favorecen mediante esta operación típicamente papelera.

1.2.2 Proceso de Refinado

El principal objetivo de la operación de refinado es preparar las fibras para alcanzar las propiedades de resistencia deseables en el producto final. Los diversos estudios experimentales realizados en esta operación establecen que el refinado confiere cambios importantes en la estructura física de las fibras, modificándose la morfología de las mismas por la acción de un trabajo mecánico en un medio acuoso (Torres López, 1988). En esta operación se desarrollan algunas de las características que favorecen la formación del papel, tales como la fibrillación externa e interna, formación de finos, variación en la longitud de fibra e incremento en la capacidad retención de agua y habilidad de enlace interfibrillar e intrafibrillar, entre otros efectos (Kerekes, 2005; Lumiainen, 2000; Page, 1989; Stoere et al., 2001).

Durante el refinado se eliminan parcialmente las paredes (primaria y secundaria) externas de la fibra, lo que permite la penetración del agua en el interior de la misma provocando su hinchamiento (Torres López, 1988) al romper enlaces secundarios celulosa-celulosa, hemicelulosa-hemicelulosa y hemicelulosa-celulosa. La hidratación de las fibras y la fibrillación externa e interna generan un aumento sensible de la superficie y volumen específicos (incremento de los puntos de contacto en la formación del papel) favoreciendo el desarrollo de las propiedades fisicomecánicas del papel fabricado (Seth, 1999).

En el funcionamiento de equipo de refinado, la suspensión fibrosa pasa entre una superficie fija (estator) la otra se desplaza con un movimiento perpendicular al eje de las cuchillas (rotor), de esta manera las fibras situadas entre ambas sufren un efecto de cortadura, aplastamiento y fricción entre sí y contra las guarniciones del aparato. La acción conjunta de todos estos esfuerzos mecánicos producirá el refinado de la pasta. El flujo en el interior de los canales formados por las guarniciones en movimiento es complejo, básicamente parece estar formado por tres componentes (Figura 1-2), un flujo primario que va desde el centro hacia el exterior por el rotor y del exterior al centro -retorno- por el estator; un flujo secundario, de tipo vórtice, en el interior de los canales formados por las cuchillas, que está inducido por el movimiento de las mismas

y que con el flujo primario provoca un movimiento en espiral; y un flujo terciario a lo largo de las paredes del estator inducido por el flujo primario, pues al ser más importante el flujo en el rotor que en el estator existirá un gradiente de presión del estator hacia el rotor. La combinación de estos tres flujos impone el posicionamiento de las fibras en el refinador y su acumulación sobre las aristas del rotor, punto dónde se le transfiere energía de refinado durante el impacto de ambas guarniciones (Torres López, 1988).

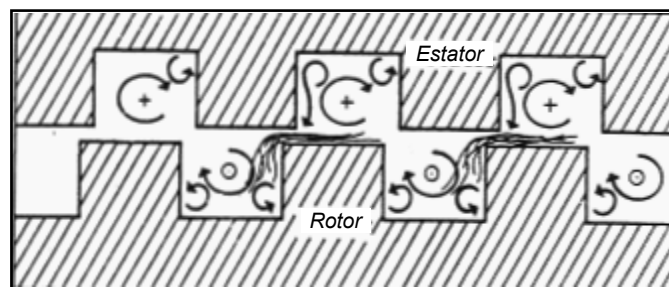


Figura 1-2. Flujos entre las guarniciones y posicionamiento de las fibras sobre el rotor.

Los efectos del refinado sobre la morfología de las fibras varían según las variables del proceso. El tipo de materia prima, procedencia y el sistema operativo utilizado en la obtención de las pastas tiene una marcada influencia sobre la aptitud al refinado de la misma, puesto que afectarán a la constitución química final de la fibra. En pastas kraft con alto número kappa la etapa de refinado presenta dificultades ya que la lignina obstruye la penetración del agua a las zonas internas de la fibra donde se encuentran los hidratos de carbono, por consiguiente no es posible obtener una fibrillación externa e interna requerida para la formación de los enlaces interfibrilares. Las pastas con gran porcentaje de hemicelulosas responden al aporte de energía mecánica, y su gran afinidad por el agua proporciona hinchamiento y fibrillación.

Otra variable que afecta la aptitud de la pasta al refinado y que no depende de su naturaleza, es el secado que se realiza a las pastas; se ha observado que las pastas que no han sido sometidas a secado refinan mejor que las pastas secadas (García et al., 2002), este fenómeno se atribuye al cierre de los microporos existentes en la pared fibrosa en el proceso de secado a alta temperatura, inhibiendo parcialmente su aptitud de hidratación, este es un proceso irreversible conocido como “cornificación”, en el secado el espesor de la pared y el perímetro de la fibra se reducen y las paredes se vuelven más densas; un secado sucesivo causa una pérdida progresiva e irreversible de la capacidad de hinchamiento de las fibras que se traduce en una pérdida de flexibilidad, plasticidad y del potencial de enlace (Garg and Singh, 2006;

Wang et al., 2003).

El pH de la suspensión fibrosa también se encuentra como variable del proceso que puede influir en las propiedades de las fibras, a pH ácidos o fuertemente alcalinos se generan disminuciones en las propiedades mecánicas respecto a las pastas refinadas a un pH ligeramente alcalino; por otra parte, el requerimiento energético incrementa cuando se trabaja a valores bajos (pH 4 - 4,5). La temperatura también puede afectar negativamente al refinado, ya que influye en el hinchamiento de las fibras -el fenómeno de hinchamiento es una reacción exotérmica y, por tanto, una disminución de la temperatura aumentará la capacidad de hidratación-. La consistencia de la suspensión fibrosa es un parámetro que interfiere en la aptitud al refinado, generalmente a bajas consistencia hay un efecto de mayor corte sobre las fibras (Kerekes, 2005), y el incremento de la consistencia favorece los efectos de fibrillación con una disminución en el corte de la fibra (Hietanen and Ebeling, 1990).

En general la operación de refinado se evalúa con las propiedades físicas de la pasta y del papel, es importante mantener un control de las variables que influyen en la aptitud al refinado para obtener en el papel propiedades fisicomecánicas deseadas junto con una óptima formación de la hoja durante el proceso de fabricación.

1.3 BIOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA PAPELERA

La introducción de la biotecnología en la industria papelera ofrece una fuente potencial para obtener procesos más respetuosos con el medio ambiente, y conseguir ventajas adicionales en el desarrollo de una tecnología más limpia que genere un producto final con alta calidad. Específicamente en la producción de pastas y el blanqueo se han desarrollado múltiples investigaciones con gran auge desde la década de 1980 (Bajpai, 2004).

En el proceso de blanqueo se han estudiado enzimas hidrolíticas (xilanasas) que actúan sobre la unión existente entre la celulosa y la lignina -por la hidrólisis de xilanos-, fenómeno que facilita la eliminación de la lignina en posteriores etapas de blanqueo (Kumar et al., 2001; Vidal et al., 1998) con una mayor accesibilidad de los agentes oxidantes a la fibra, en su aplicación se detecta una importante función en la obtención de papeles con alta estabilidad en las propiedades ópticas por su efecto en la remoción del contenido de ácidos hexenurónicos (Roncero et al., 2003a; Valls, 2008). El bioblanqueo con xilanasas también depende del tipo de secuencia de

blanqueo, así como también del contenido inicial de lignina residual presente en la pasta (Oksanen et al., 1997; Vidal et al., 1998).

Las enzimas ligninolíticas actualmente son una herramienta viable para la biodegradación de la lignina debido a su capacidad oxidativa; en el ciclo natural los hongos ligninolíticos atacan el material lignocelulósico por una combustión enzimática (Kirk and Farrel, 1987), el sistema incluye peroxidasas de elevado potencial redox, lacasas con actividad fenoloxidasas y oxidasas que aportan peróxido de hidrógeno, junto con mediadores redox de bajo peso molecular (Bajpai et al., 2006; Tuomela et al., 2000).

En particular las enzimas **lacasas** son objeto de múltiples investigaciones con resultados prometedores en el bioblanqueo (Camarero et al., 2004; Moldes and Vidal, 2008; Rodriguez Couto and Toca Herrera, 2006); estas enzimas actúan en presencia de oxígeno de manera que en el mecanismo de oxidación la lacasa reduce el oxígeno molecular a agua, seguidamente se reduce oxidando la lignina presente en la pasta, su bajo potencial redox sólo permite oxidar los grupos fenólicos de la lignina, y únicamente en presencia de un mediador que actúa como intermediario redox es posible la oxidación de unidades no fenólicas (Ibarra et al., 2007; Shleev et al., 2006; Widsten and Kandelbauer, 2008). La lacasa en presencia del mediador reduce el oxígeno molecular a agua, posteriormente se reduce oxidando al mediador hasta un radical libre estable que, a su vez oxida la lignina presente en la pasta (Figura 1-3), esta aplicación es el llamado “sistema lacasa-mediador”.

La efectividad del sistema lacasa-mediador para degradar la lignina depende de las condiciones operativas, de las propiedades de las lacasas y del mediador (Ibarra et al., 2006; Moldes and Vidal, 2008). Los mediadores más utilizados por su efectividad se caracterizan por tener un grupo –NOH-, como el 1- hidroxibenzotriazol (HBT), ácido violúrico (VIO) o N-hidroxiacetanilida (NHA) (Barreca et al., 2003). Las investigaciones con el sistema lacasa-mediador se enfocan a optimizar las condiciones de aplicación para obtener una mayor selectividad, reducir la toxicidad y costos generados por el uso de mediadores sintéticos, en este último aspecto la utilización de mediadores naturales son una potente alternativa para obtener un proceso que cumpla con las normativas medioambientales (Aracri et al., 2008; Moldes et al., 2008).

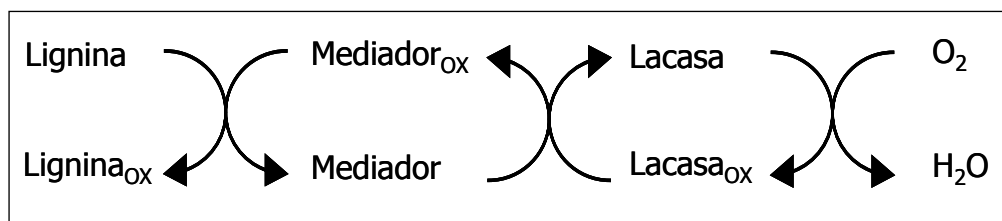


Figura 1-3. Mecanismo de actuación del sistema lacasa-mediador.

En otros procesos de la fabricación del papel, enzimas como las celulasas, hemicelulasas, peroxidadas, lipasas y amilasas se han investigado con el objetivo de potenciar los mecanismos de cohesión de las fibras e incrementar la resistencia del papel, eliminar problemas de pitch y depósitos de almidón, favorecer el proceso de destintado en la obtención de papel reciclado y el tratamiento de efluentes del proceso de fabricación (Bajpai, 2004; Jain et al., 2001; Jeffries, 2008; Savitha et al., 2009; Suurnakki et al., 2001; Wong and Mansfield, 1999).

En los últimos años, las enzimas **celulasas** y hemicelulasas (que degradan celulosa y hemicelulosa, respectivamente), han sido evaluadas por su capacidad de modificar beneficiosamente las características de los materiales celulósicos (pastas y papeles). El tratamiento con celulasas parece aumentar el área de enlaces entre fibras, mejorando algunas propiedades del papel (Ahmad et al., 2006).

La aplicación de celulasas se relaciona a su capacidad de convertir la celulosa en glucosa y azúcares solubles. Los microorganismos que pueden degradar la celulosa producen un sistema complejo de enzimas que es denominado en forma general "celulasa", cada sistema está integrado por una variedad de enzimas que actúan en sinergia para hidrolizar la celulosa; en el sistema de celulasa típico intervienen tres tipos de enzimas (endoglucanasas, exoglucanasas y celobiasas) que rompen los enlaces β -(1,4) del polímero celulósico (Walker and Wilson, 1991). Las celulasas se encuentran representadas en diferentes familias de glicósido hidrolasas, hecho que sugiere una evolución convergente de los plegamientos de las diferentes familias para dar a lugar a la misma especificidad del sustrato (Bayer et al., 2007; Bhat, 2000).

El gran número y diversidad de familias probablemente refleja la heterogeneidad de la celulosa y polisacáridos asociados en el material vegetal, o alternatively se puede sugerir que la naturaleza no ha optimizado totalmente la eficacia de la hidrólisis de la recalcitrante e insoluble celulosa microcristalina (Lynd et al., 2002). Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Sin embargo, sólo algunos de ellos producen

enzima celulasa extracelular capaz de hidrolizar la celulosa a determinadas condiciones del medio (pH, temperatura) (Bhat and Bhat, 1997).

Al determinar la capacidad de la celulasa para hidrolizar el polímero celulósico, se introduce su aplicación para modificar las paredes celulares de las fibras; las fibrillas de celulosa están densamente empaquetadas y dispuestas en haces paralelo, estas fibrillas se hallan aglutinadas por una matriz conformada por hemicelulosa y otros componentes, así una hidrólisis efectiva permitiría su liberación. En la industria papelera el uso de “celulasas” genera un elevado interés por los beneficios que se puedan obtener en la modificación de los constituyentes de la madera y fibras.

Las investigaciones realizadas con la aplicación de celulasas reportan la posibilidad de mejorar el drenaje y conseguir mayor productividad en la fabricación del papel (Kamaya, 1996), además confiere un incremento en las propiedades de resistencia del papel (Blanco, 1998; García *et al.*, 2002; Mansfield *et al.*, 1997; Mohlin and Pettersson, 2002; Pastor *et al.*, 2001). Sin embargo no todas las investigaciones concuerdan, se ha encontrado diferencias en el modo de acción enzimática, y su influencia sobre las propiedades físicas de la pasta varía según el tipo de celulasa utilizada. La aplicación de endoglucanasas en pastas kraft producen un importante deterioro de las propiedades mecánicas del papel y la pasta, en cambio con las celobiohidrolasas no se encontró efectos significativos (Pere *et al.*, 1996). Otra investigación reporta que, la celobiohidrolasa Cel48A proporciona beneficios en la resistencia a la tracción tras un refinado mecánico (Mansfield and Meder, 2003), también la aplicación de Cel9B de *Paenibacillus s.p.* BP-23 mejora el índice de tracción y el índice de estallido, permitiendo ahorros en la energía de refinado, y su uso puede ser muy prometedor a partir de fibras secundarias debido a la posibilidad de compensación del efecto de cornificación (García *et al.*, 2002).

El trabajo que realiza el equipo de refinado es indispensable para el desarrollo de la resistencia en el papel, esta operación en la industria papelera requiere grandes consumos de energía, la necesidad de disminuir la energía específica de refinado requiere mejorar su efectividad con el diseño de nuevos refinadores, variación de los parámetros de operación en el equipo de refinado y/o del proceso, y una alternativa potencial es la utilización de enzimas que funcionen como “coadyuvantes del refinado de pastas”; en esta área, la investigación sobre las celulasas es de gran interés para determinar la acción específica sobre la morfología de las fibras.

1.4 OBJETIVOS

La etapa de refinado es una de las operaciones más fundamentales de los procesos papeleros, la transmisión de energía a las fibras o el trabajo mecánico realizada en ellas es indispensable para favorecer los mecanismos de enlace y obtener un producto final con alta resistencia o con los requerimientos de calidad exigidos. Esta operación implica altos consumos de energía, que puede llegar a representar el 95% de los costos en relación a los requerimientos energéticos en la fabricación del papel. En este aspecto se busca en una alternativa biotecnológica para potenciar el efecto de refinado en las fibras celulósicas y conseguir posibles disminuciones en los consumos de energía del proceso. Así, el objetivo principal de esta tesis es:

- **Desarrollar nuevos procesos en la obtención del papel mediante la aplicación de enzimas en el refinado de pastas para mejorar las propiedades fisicomecánicas del papel y aportar un ahorro de energía en el proceso.**

Objetivos específicos:

- Evaluar la aptitud al refinado de pastas kraft industriales ECF y TCF de *Eucalyptus globulus*, pastas que difieren únicamente en el tipo de secuencia de blanqueo.
- Estudiar la efectividad enzimática de la celulasa -Cel9B- del tipo 1,4- β endoglucanasa de *Paenibacillus barcinonensis* sobre el refinado de las pastas kraft ECF y TCF.
- Determinar un posible efecto sinérgico entre las celulasas Cel9B y Cel48C en el refinado de las pastas y modificación superficial de las fibras celulósicas.
- Conseguir un efecto de “biorefinado” e investigar la clase de dominio presente en la arquitectura estructural de la celulasa que es responsable de potenciar los mecanismos de cohesión de las fibras.
- Estudiar el sistema lacasa-mediador en pastas blanqueadas de bajo contenido de lignina residual, para evaluar posibles efectos en la morfología de las fibras y consecuencias en la operación de refinado.
- Determinar la influencia del sistema lacasa-mediador en la oxidación de la

celulosa y su efecto en las propiedades fisicomecánicas en el papel.

- Estudiar la remoción de ácidos hexenurónicos con la aplicación del sistema lacasa-mediador y evaluar las posibles ventajas en la obtención de papeles con alta estabilidad de las propiedades ópticas.

1.5 BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, S., Jain, R., Mediratta, R., Prasad, K.D. and Arora, S.S., 2006. Enzymatic treatment on chemical pulp in beating/ refining process- An attempt towards energy conservation. *IPPTA: Quarterly Journal of Indian Pulp and Paper Technical Association*, 18(3): 127-132.
- Annergren, G.E., 1996. Strength properties and characteristics of bleached chemical and (chemi)mechanical pulps. In: *Pulp Bleaching – Principles and Practice*, Section VII: The Properties of Bleached Pulp. Tappi Press: 717-748.
- Aracri, E., Fillat, A. and Vidal, T., 2008. Modificación enzimática de pastas de lino y sisal con lacasas y mediadores naturales. V Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel, CIADICYP-2008, Guadalajara, México.
- Bajpai, P., 2004. Biological bleaching of chemical pulps. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24(1): 1-58.
- Bajpai, P., Anand, A., Bajpai, P.K. and El-Gewely, M.R., 2006. Bleaching with lignin-oxidizing enzymes. *Biotechnology Annual Review*, 12(1): 349-378.
- Barreca, A.M., Fabbrini, M., Galli, C., Gentili, P. and Ljunggren, S., 2003. Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26(1-2): 105-110.
- Bayer, E.A., Lamed, R. and Himmel, M.E., 2007. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3): 237-245.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5): 355-383.
- Bhat, M.K. and Bhat, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15(3-4): 583-620.
- Blanco, A., Pujol, X., Vidal, T., Torres, A.L., Diaz, P., Pastor, F.I.J, 1998. New Cellulases from *Bacillus*. Applications in paper industry. *MIE Bioforum*: 144-146.
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., Del Rio, J.C., Gutierrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martinez, M.J. and Martinez, A.T., 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and*

- Microbial Technology, 35(2-3): 113-120.
- Casey, J.P., 1980. Pulp and Paper: Chemistry and Chemical Technology, vol 2. John Wiley & Sons, New York, 1446 pp.
- Colom, J.F., Torres, A.L. and García, J.A., 1984. Monografías de Materias Papeleras. Introducción histórica a la fabricación de papel y pastas. Publicaciones de la UPC. Universidad Politécnica de Cataluña, Terrassa.
- del Rio, J.C., Gutierrez, A., Rodriguez, I.M., Ibarra, D. and Martinez, A.T., 2007. Composition of non-woody plant lignins and cinnamic acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 79(1-2): 39-46.
- Delmer, C. and Amor, Y., 1995. Cellulose Biosynthesis. The Plant Cell, 7(7): 987-1000.
- Fengel, D. and Wegener, G., 1984. Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gruyter Inc., United States, 613 pp.
- Fillat, U., 2008. Aplicación de biotecnología para la obtención de pastas de alta calidad. Estudio de sistemas enzimáticos en secuencias de blanqueo respetuosas con el medio ambiente. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.
- García Hortal, J.A., 2007. Fibras Papeleras. Edicions UPC, Barcelona, 243 pp.
- García, O., Torres, A.L., Colom, J.F., Pastor, F.I.J., Diaz, P. and Vidal, T., 2002. Effect of cellulase-assisted refining on the properties of dried and never-dried eucalyptus pulp. Cellulose, 9(2): 115-125.
- Garg, M. and Singh, S.P., 2006. Reasons of strength loss in recycled pulp. Appita Journal, 59(4): 274-279.
- Hibberd, A.I., Wearne, R.H. and Wallis, A.F.A., 1999. Effect of variation in the aromatic units of lignin in plantation eucalypt woods on pulping quality. Appita Annual General Conference, 2: 781-785.
- Hietanen, S. and Ebeling, K., 1990. Fundamental aspects of the refining process. Paperi Ja Puu-Paper And Timber, 72(2): 158-170.
- Ibarra, D., Chavez, M.I., Rencoret, J., Del Rio, J.C., Gutierrez, A., Romero, J., Camarero, S., Martinez, M.J., Jimenez-Barbero, J. and Martinez, A.T., 2007. Structural modification of eucalypt pulp lignin in a totally chlorine-free bleaching sequence including a laccase-mediator stage. Holzforschung, 61(6): 634-646.
- Ibarra, D., Romero, J., Martinez, M.J., Martinez, A.T. and Camarero, S., 2006. Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalypt pulp by laccase-mediator. Enzyme and Microbial Technology, 39(6): 1319-1327.
- Jain, R.K., Mathur, R.M. and Kulkarni, A.G., 2001. Enzymatic deinking of recycled paper - An overview. IPPTA: Quarterly Journal of Indian Pulp and Paper

- Technical Association, 13(3): 21-40.
- Jeffries, T.W., 2008. Introduction of a special issue on biotechnology for the pulp and paper industry. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2): 77-232.
- Kamaya, Y., 1996. Role of endoglucanase in enzymatic modification of bleached kraft pulp. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(6): 549-553.
- Kerekes, R.J., 2005. Characterizing refining action in PFI mills. *Tappi Journal*, 4 (3): 9 - 14.
- Kirk, T.K. and Cullen, D., 1998. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry* (eds Young, R. A. and Akhtar, M.), John Wiley & Sons, Inc, New York. Tappi Press, Atlanta, 279-308 pp.
- Kirk, T.K. and Farrel, R.L., 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 465-505.
- Kuligowski, C., Brochier, B., Petit-Conil, M. and Housen, 2006. Development and optimization of biotechnology use in the manufacture of bleached chemical pulps. Tappi Press, 2006: 16-20.
- Kumar, S., Rao, N.J. and Mathur, S., 2001. Application of commercial xylanases in bleaching - A review. *IPPTA: Quarterly Journal of Indian Pulp and Paper Technical Association*, 13(1): 13-24.
- Lachenal, D. and Muguet, M., 1992. Degradation of Residual Lignin in Kraft Pulp with Ozone: Application to Bleaching. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 7(1): 25-29.
- Lumiainen, J., 2000. *Papermaking Part 1, Stock Preparation and Wet: Refining of chemical pulp*. Paulapuro, H. *Papermaking Science and Technology*. Helsinki: FAPET & TAPPI, Book 8 - Vol 2.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Willem, H.Z. and Pretorius, I.S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(3): 506-577.
- Mansfield, S.D., De Jong, E., Stephens, R.S. and Saddler, J.N., 1997. Physical characterization of enzymatically modified kraft pulp fibers. *Journal of Biotechnology*, 57(1-3): 205-216.
- Mansfield, S.D. and Meder, R., 2003. Cellulose hydrolysis - The role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. *Cellulose*, 10(2): 159-169.
- Mohlin, U.B. and Pettersson, B., 2002. Improved papermaking by cellulase treatment before refining. *Biotechnology In The Pulp And Paper Industry: 8th ICBPPI*, 21, 291-299 pp.
- Moldes, D., Díaz, M., Tzanov, T. and Vidal, T., 2008. Comparative study of the

- efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Bioresource Technology*, 99(17): 7959-7965.
- Moldes, D. and Vidal, T., 2008. Laccase-HBT bleaching of eucalyptus kraft pulp: Influence of the operating conditions. *Bioresource Technology*, 99(18): 8565-8570.
- Oksanen, T., Amann, M., Candussio, A., Buchert, J. and Viikari, L., 1997. Role of Xylanase in Laccase-Mediator Delignification of Kraft Pulps. Canadian Pulp and Paper Association, Montreal, 83-84 pp.
- Page, D.H., 1989. The beating of chemical pulps. The action and the effects. 9th Fundamental Research Symposium Fundamentals of Papermaking. Cambridge, 1-38 pp.
- Pastor, F.I.J., Pujol, X., Blanco, A., Vidal, T., Torres, A.L. and Diaz, P., 2001. Molecular cloning and characterization of a multidomain endoglucanase from *Paenibacillus* sp. BP-23: Evaluation of its performance in pulp refining. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(1): 61-68.
- Pere, J., Liukkonen, S., Siika-Aho, M., Gullichsen, J. and Viikari, L., 1996. Use of Purified Enzymes in Mechanical Pulping. *Pulping Conference: Proceedings (Tappi)*: 693-696.
- Ragauskas, A.J., 1994. Brightness Reversion of Mechanical Pulps, 2: Thermal Aging of Ascorbic Acid-Impregnated Lignin-Retaining Pulps. *Cellulose Chemistry and Technology*, 28(3): 265-272.
- Ragnar, M., Dahllof, H. and Lundgren, S., 2004. Towards an environmentally sustainable bleaching of kraft pulp exploring alternative ECF and TCF bleaching sequences. 58th Appita Annual Conference, 2: 477-485.
- Rodriguez Couto, S. and Toca Herrera, J.L., 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5): 500-513.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. and Vidal, T., 2003a. Effect of xylanase on ozone bleaching kinetics and properties of Eucalyptus kraft pulp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(10): 1023-1031.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. and Vidal, T., 2003b. TCF bleaching of wheat straw pulp using ozone and xylanase. Part A: Paper quality assessment. *Bioresource Technology*, 87(3): 305-314.
- Roncero, M.B. and Vidal, T., 2007. Optimización del tratamiento con ozono en el blanqueo TCF de pastas para papel. *Afinidad*, 64(529): 420-428.
- Savitha, S., Sadhasivam, S. and Swaminathan, K., 2009. Modification of paper properties by the pretreatment of wastepaper pulp with *Graphium putredinis*, *Trichoderma harzianum* and fusant xylanases. *Bioresource Technology*, 100(2): 883-889.

- Seth, R.S., 1999. Beating and refining response of some reinforcement pulps. *Tappi Journal*, 82(3): 147-155.
- Shleev, S., Persson, P., Shumakovich, G., Mazhugo, Y., Yaropolov, A., Ruzgas, T. and Gorton, L., 2006. Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4): 841-847.
- Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Perez-Boada, M., Martinez, M.J., Sigoillot, J.-C., Asther, M., Colom, J.F. and Martinez, A.T., 2005. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal of Biotechnology*, 115(4): 333-343.
- Smook, G.A., 2002. *Handbook for Pulp & Paper Technologists*. Angus Wilde Publications, Vancouver, 425 pp.
- Stoere, P., Nazhad, M.M. and Kerekes, R.J., 2001. An Experimental Study of the Effect of Refining on Paper Formation. *Tappi Journal*, 84(7): 1-9.
- Suurnakki, A., Mustranta, A., Siika-Aho, M., Holmbom, B., Viikari, L. and Buchert, J., 2001. Biotechnical approaches for pitch removal. *Papiripar*, 45(2): 51-55.
- Torres, A.L., Roncero, M.B., Colom, J.F., Martinez, J.A. and Vidal, T., 2004. Application of an experimental design to modeling of ozone bleaching stage in TCF processes. *Ozone: Science and Engineering*, 26(5): 443-451.
- Torres López, A.L., 1988. Últimos avances en la tecnología del refinado. *Introducción al refinado: Aspectos generales*. Tecnología Papelera E.T.S.E.I.A.T. Universidad Politécnica de Cataluña, Terrassa.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itävaara, M., 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 72(2): 169-183.
- Valchev, I., Valchev, V. and Ganey, I., 1999. Improved elemental chlorine-free bleaching of hardwood kraft pulp. *Cellulose Chemistry and Technology*, 33(1): 61-66.
- Valls, C., 2008. *Aplicació de nous sistemes enzimàtics pel blanqueig de pasta kraft d'eucaliptus*. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.
- Vidal, T., Munoz, M. and Colom, J.F., 1998. Xylanase bleaching of Eucalyptus kraft pulp - an economical TCF process. *Proceedings of the International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, 3: 11-14.
- Walker, L.P. and Wilson, D.B., 1991. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. *Bioresource Technology*, 36(1): 3-14.
- Wang, X., Maloney, T.C. and Paulapuro, H., 2003. Internal fibrillation in never-dried and once-dried chemical pulps. *Appita Journal*, 56(6): 455-459.
- Widsten, P. and Kandelbauer, A., 2008. Laccase applications in the forest products

- industry: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(4): 293-307.
- Wong, K.K.Y. and Mansfield, S.D., 1999. Enzymatic processing for pulp and paper manufacture: a review. *Appita Journal*, 52(6): 409-418.
- Yadav, S.K., Singh, N., Prasad, K.D. and Arora, S.S., 2006. Chlorine dioxide substitution during bleaching of pulp - An attempt towards AOX reduction in effluent. *IPPTA: Quarterly Journal of Indian Pulp and Paper Technical Association*, 18(SPEC ISS): 111-117.
- You, J., Meng, J., Chen, X. and Ye, H., 2008. Study on direct delignification with laccase/xylanase system. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 28(3): 227-239.
- Zhao, H., Kwak, J.H., Conrad, Z.Z., Brown, H.M., Arey, B.W. and Holladay, J.E., 2007. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 68(2): 235-241.

CAPÍTULO 2.

Materiales y Métodos

2.1 REFINADO: MOLINO PFI

El estudio detallado de la influencia de la operación de refinado sobre la morfología de las fibras celulósicas y sus efectos sobre las propiedades fisicomecánicas de los papeles y pastas es evaluado en el molino PFI según procedimiento normalizado (ISO-5264). La transmisión de energía a las fibras durante el refinado se realiza en el sistema carcasa – molón, como se presenta en la Figura 2-1.

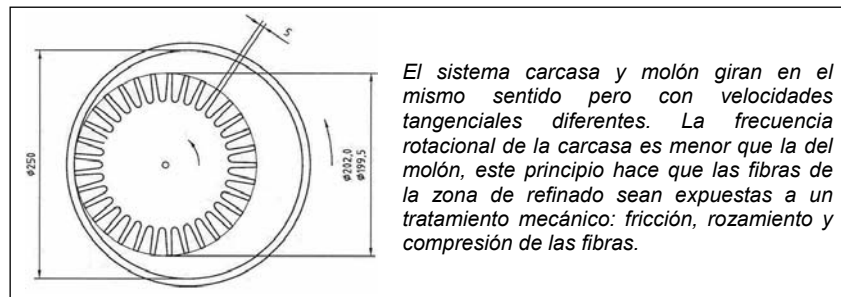


Figura 2-1. Representación de las superficies de refinado

En la Figura 2-2 se presenta el molino PFI, este equipo principalmente está integrado por los siguientes elementos:

- ✓ Molón cilíndrico: provisto de 33 cuchillas con distribución radial y paralelas al eje del molón. Las dimensiones de cada cuchilla corresponden a 50 mm de longitud y 5 mm de ancho; el diámetro del molón medido a través de las cuchillas es de 200 mm, y con una profundidad de los alveolos entre las cuchillas de 30 mm. Mediante una correa de transmisión y un motor de potencia aproximada de 1 kW se acciona el molón con una rotación sin carga aplicada de 24.3 ± 0.5 rps, cuando se aplica presión de refinado la velocidad del molón disminuye 0.3 - 0.6 rps.

- ✓ Carcasa de refinado: superficie lisa de refinado con un diámetro interior de 250 mm y altura interior de 52 mm, esta accionada por un motor eléctrico de 0.4 kW de potencia aproximada mediante una correa de transmisión. La diferencia entre las velocidades periféricas de la carcasa de refinado y el molón es de 6.0 ± 0.2 m/s a carga cero.
- ✓ Caja de control: controla los movimientos del molón y la presión de refinado mediante un PLS (autómata programable). La presión de refinado se obtiene con cilindros neumáticos que provocan el movimiento del molón en el plano horizontal presionando al molón contra la pared de la carcasa del refinado. La presión de refinado puede ajustarse entre 1 - 5.5 N/mm mediante una válvula de reducción montada en el panel frontal de la caja de control.
- ✓ Tornillo de ajuste: permite mantener una distancia entre el molón y la carcasa de refinado, su uso se limita al acondicionamiento de las superficies.



<i>Cantidad de pasta</i>	<i>30 g p.s.</i>
<i>Consistencia</i>	<i>10%</i>
<i>Presión</i>	<i>3.33 N/mm</i>
<i>Agua</i>	<i>Desionizada</i>
<i>Pasta</i>	<i>Desintegrada</i>

Figura 2-2. Equipo de refinado: molino PFI y condiciones de operación

Los equipos de refinado pueden presentar una evolución de las superficies de refinado produciendo resultados no comparables con otros equipos o con datos de un historial del mismo equipo; por consiguiente es necesario realizar una verificación del molino PFI de acuerdo al procedimiento descrito en el manual del fabricante.

Refinados realizados con una pasta patrón indican una evolución de las superficies de refinado haciéndose indispensable un acondicionamiento o calibración del equipo para obtener una respuesta equivalente al estado inicial del molino PFI. El procedimiento

de calibración y las pruebas de verificación y comparación con otros equipos de refinado se presentan en un Anexo.

Para el refinado se requiere con anterioridad una preparación de la pasta que consiste en una desintegración (ISO-5263) o individualización de las fibras a 30000 revoluciones; posterior a esta desintegración se efectúa una filtración para obtener una torta, y conocido su peso húmedo distribuirla uniformemente sobre la superficie lisa de refinado y ajustar la consistencia de refinado al 10%. Finalizado el refinado, la pasta se desintegra a 10000 revoluciones con una consistencia del 1.5%, con esta suspensión fibrosa se determina la resistencia al desgote (°SR) (ISO-5267) con el refinómetro Schopper-Riegler.

2.2 OBTENCIÓN DE HOJAS Y ENSAYOS FÍSICOS

La formación de las hojas de papel se realizan en el equipo Rapid-Köthen (ISO-5269) con una suspensión fibrosa de 2.356 g/L para un gramaje equivalente a 75 ± 2 g/m² (referido en peso seco absoluto). Las hojas húmedas son secadas mediante una aplicación de vacío, presión y calor (93 ± 4 °C) durante 10 minutos. Con 26 g p.s se obtienen 10 hojas de papel; y adicional, un litro de suspensión es utilizado para la determinación del índice de retención de agua (%IRA) (ISO-23714; Merkblatt-IV/33/57).



Equipo Rapid-Köthen integrado por una unidad de secado y por el formador de hojas. Un litro de suspensión fibrosa se introduce en el recipiente de formación donde posteriormente es diluida, agitada y filtrada a través de una tela metálica de formación (tamiz).

Figura 2-3. Equipo Rapid Köthen – formador de hojas de laboratorio

✓ **Análisis de longitud de fibra**

De la suspensión fibrosa preparada para la elaboración de hojas, se toman 40 mL para analizar las características de las fibras en un analizador de imagen Kajaani FS300 (ISO-16065; Tappi-271). El equipo reporta datos de la longitud media aritmética

de fibra [L_n], contenido de finos ($L \leq 0.2$ mm), longitud proyectada, distribuciones de longitud; vasos, ancho de fibra, curl y kink (rizado); en este estudio se utilizan las siguientes definiciones de longitud de fibra:

Longitud de fibra media aritmética:

$$L_n (mm) = \frac{\sum_{i=1}^N n_i l_i}{\sum_{i=1}^N n_i} \times 100 \quad \text{Ec. 2-1}$$

Longitud de fibra media ponderada:

$$L_L (\%) = \frac{\sum_{i=1}^N n_i l_i}{\sum_{i=1}^N n_i l_i} \times 100 \quad \text{Ec. 2-2}$$

Donde:

n_i Número de fibras correspondientes a una determinada longitud (l_i)

l_i Longitud de fibra (mm)

2.2.1 Ensayos físicos sobre las hojas de papel

El análisis del papel incluye medidas físicas, de resistencia y permeabilidad (ISO-5270); estas determinaciones se realizan sobre hojas de papel acondicionadas en un ambiente normalizado de 23 °C y 50% de humedad relativa (ISO-187).

✓ **Propiedades físicas**

Gramaje (ISO-536) y espesor (ISO-534), estas medidas son utilizadas en la determinación de la densidad y volumen específico (ISO-534).

✓ **Propiedades fisicomecánicas**

Resistencia a la tracción (ISO-1924): una probeta normalizada (15 mm × 100 mm) es sometida a un esfuerzo axial de tracción hasta producir la rotura del papel; el equipo utilizado corresponde a un máquina universal de ensayos (Retrofit), y los resultados obtenidos se expresan como alargamiento a la rotura (en %) y como índice de tracción en función del gramaje.

Resistencia al estallido (ISO-2758): aplicación de una presión uniforme sobre una muestra de papel sujeta sobre un diafragma circular elástico; las fuerzas actúan perpendicularmente a la superficie del papel hasta ocasionar una rotura, y su índice corresponde a la presión de reventamiento en relación al gramaje.

Resistencia al desgarro (ISO-1974): fuerza necesaria para continuar un desgarro ya iniciado en una muestra de papel utilizando un péndulo que se desplaza en un plano perpendicular al plano inicial de la probeta. El trabajo efectuado para desgarrar la probeta corresponde a la pérdida de energía potencial del péndulo (Elmendorf). El resultado se expresa como índice de desgarro en función del gramaje.

Resistencia al plegado (ISO-5626): logaritmo decimal del número de dobles pliegues requeridos para producir la rotura de una probeta de 15 mm de ancho cuando se encuentra bajo una tensión controlada y un ángulo específico.

✓ **Permeabilidad a los fluidos**

Permeabilidad al aire "Bendtsen" (ISO-5636): caudal de aire expresado en mL/min que pasa a través de un área conocida de papel bajo una diferencia de presión y tiempo controlado.

✓ **Análisis superficial de las fibras**

Microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM): provee información sobre la morfología de las fibras. Una muestra de papel es cubierta superficialmente por un film conductor de electrones; el microscopio electrónico JEOL JSM-6400 genera una imagen con apariencia tridimensional como consecuencia del barrido electrónico, su funcionamiento se basa en la utilización de un haz muy concentrado de electrones que recorre la muestra preparada punto a punto, los electrones pueden dispersarse o provocar la aparición de electrones secundarios, ambos son atraídos por un detector electrónico que proporciona la imagen topográfica.

Microscopía óptica: visualización de la morfología de las fibras con un microscopio óptico Olympus modelo BSH que dispone de una videocámara digital JVC y esta conectado a un PC a través de una tarjeta digitalizadora de vídeo Matrox Meteor. Con esta técnica se analizan las fibras usando el reactivo Herzberg (ISO-9184), este colorante permite la individualización de las fibras y resalta las particularidades morfológicas (García Hortal, 2007).

2.3 TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS

La aplicación de métodos biotecnológicos (celulasas - lacasas) y la influencia de la operación del refinado sobre la morfología de las fibras celulósicas es estudiada en dos tipos de pastas comerciales que corresponden a pastas kraft de *Eucalyptus globulus* con secuencias de blanqueo ECF y TCF. Estas pastas provienen del grupo empresarial ENCE, y presentan las siguientes características iniciales:

Tabla 2-1. Propiedades de las pastas TCF y ECF

	TCF	ECF
Blancura, % ISO	89,0 ± 0,4	89,5 ± 0,3
Número kappa	5,0 ± 0,1	0,5 ± 0,0
Viscosidad, mL/g	759 ± 15	858 ± 27

2.3.1 Aplicación de enzimas hidrolíticas:

El efecto del biorefinado se estudia con la aplicación de “celulasas” de *Paenibacillus barcinonensis*, clonada y caracterizada por miembros del grupo investigador *Enzimas microbianas de aplicación industrial* del Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona. La enzima presenta un mecanismo de hidrólisis sobre los enlaces β -(1,4) glucosídicos de la celulosa. Los biotratamientos corresponden a:

- ✓ Celulasa Cel9B (EC 3.2.1.4) → endoglucanasa
- ✓ Celulasa Cel48C (EC 3.2.1.91) → exoglucanasa
- ✓ Aplicación de Cel9B + Cel48C → posible efecto sinérgico
- ✓ Celulasas recombinantes → dominios fusionados de la celulasa Cel9B: dominio catalítico GH9-CBD3c y dominios de unión a celulosa CBD3b y Fn3-CBD3b.

Los tratamientos enzimáticos requieren tres etapas: preparación, acondicionamiento y aplicación enzimática. La preparación consiste en la desintegración y posterior filtración al vacío (filtro de placa porosa N°2) de 30 g p.s. (cantidad necesaria para un punto de refinado); la pasta preparada se introduce en bolsas de polietileno ajustando la consistencia al 10% con una solución tampón; y en un baño termostático se efectúa la fase de acondicionamiento durante 30 minutos con el objetivo de adecuar la suspensión fibrosa a las condiciones de operación requeridas por las respectivas enzimas [temperatura y pH] (Tabla 2-2). Tras el acondicionamiento se procede a la

aplicación enzimática donde se realiza un nuevo ajuste de la consistencia -10%- con el tampón más la dosis de enzima; transcurrida una hora de hidrólisis se procede a la recolección de lejías y lavado de la pasta con abundante agua descalcificada y desmineralizada. Consecutivamente a los tratamientos se pasa a la operación de refinado, elaboración de hojas y respectiva caracterización.

Adicional a los biotratamientos se realizan tratamientos control [k] para verificar si las condiciones de aplicación enzimática modifican las fibras celulósicas.

Tabla 2-2. Condiciones de aplicación enzimática en las pastas kraft

	Celulasas		Enzima Cel9B y sus dominios fusionados			
	Cel9B	Cel48C	Cel9B	GH9-CBD3c	Fn3-CBD3b	CBD3b
Dosis, IU/g p.s.	2,5	0,343	60	60	2 mL	2 mL
pH	6	6	5,5	5,5	5,5	5,5
Temperatura, °C	45	45	55	55	40	40
Tiempo, horas	1	1	1	1	1	1

2.3.2 Aplicación de enzimas oxidativas

Tratamientos sistema lacasa-mediador [L_HBT] sobre pastas kraft ECF y TCF con una enzima oxidativa "lacasa" comercial (*Trametes villosa*) de Novozymes®, y el mediador HBT [1-hidroxibenzotriazol].

Inicialmente en las pastas, se efectúa un lavado ácido (pH 4.0) durante 30 minutos con el objetivo de acondicionar las fibras a las condiciones requeridas por la enzima y eliminar posibles impurezas como cationes metálicos; posteriormente esta pasta se introduce en un reactor de acero inoxidable (Figura 2-4) a una consistencia del 5% ajustada con tartrato de sodio 50 mM [pH 4.0]; y la aplicación del sistema lacasa-mediador se realiza a una temperatura de 30 °C en presencia de Tween 80 y HBT. Los tratamientos finalizan con la recolección de lejías, y lavado de la pasta con abundante agua descalcificada y desmineralizada. Consecutivamente a los tratamientos se pasa a la operación de refinado, elaboración de hojas y respectiva caracterización.

Posterior al tratamiento enzimático se realiza una etapa de extracción alcalina con el objetivo de verificar una posible eliminación de lignina residual en las pastas TCF; y una etapa reductora para determinar el grado de oxidación del sistema lacasa-mediador.



Tratamiento L_HBT:

<i>Dosis</i>	<i>20 IU/g p.s.</i>
<i>Consistencia</i>	<i>5%</i>
<i>HBT</i>	<i>2% g p.s.</i>
<i>Tween 80</i>	<i>0.05% p/v</i>
<i>Agitación</i>	<i>30 rev/min</i>
<i>Presión</i>	<i>6 kg/cm²</i>
<i>Tiempo</i>	<i>4 y 24 horas</i>

Figura 2-4. Reactor a presión y condiciones generales del tratamiento L_HBT

✓ **Etapa de extracción alcalina [E]**

La extracción alcalina se realiza en un reactor Easydye de Datacolor a 90 °C utilizando hidróxido de sodio (1.5%); los tratamientos se efectúan con 5 g p.s. al 5% de consistencia durante 120 minutos. Finalizada la extracción alcalina se lava la pasta con agua decalcificada y desmineralizada.

✓ **Etapa reductora [R]**

Aplicación de un agente reductor (NaBH_4 2%) en 5 g p.s. durante 30 minutos a una consistencia del 5% y temperatura ambiente. Los tratamientos se realizan en bolsas de polietileno y finalizado el tiempo de reacción se lava la pasta con agua descalcificada y desmineralizada.

2.4 ANALISIS DE LEJÍAS RESIDUALES

En los tratamientos enzimáticos con celulasas se analizan las lejías residuales mediante cromatografía de capa fina [TLC]. Esta técnica permite la identificación cualitativa de productos liberados en la hidrólisis de celulosa, utilizando un patrón "glucosa" que está integrado por G1 (glucosa) y G2 (celobiosa). En una placa de sílica gel (Kieselgel 60 F₂₅₄) se inyectan gota a gota 5 µL del patrón glucosa y 200 µL de las lejías (efluentes). La separación de los productos de hidrólisis se realiza con tres ascensos de una fase móvil (eluyente), que consiste en una mezcla de cloroformo, ácido acético y agua (6:7:1 v/v/v). Finalizada la separación se dejan secar las placas al aire en una campana extractora, posteriormente sobre la placa se rocía una solución

de H₂SO₄ al 5% en etanol y se introducen en una estufa a 100 °C durante un tiempo mínimo de 5 minutos o hasta la aparición de oligosacáridos correspondientes a los productos de degradación.

2.5 EFECTO DE LOS BIOTRATAMIENTOS EN LAS PASTAS

2.5.1 Caracterización inicial

En las pastas iniciales y tratadas enzimáticamente se determina la viscosidad (ISO-5351), número kappa (ISO-302), y blancura (ISO-2470; ISO-3688).

2.5.2 Determinación de la cristalinidad

La cristalinidad se determina con un difractómetro de rayos X de geometría BRAGG-BRENTANO $\theta/2\theta$ Siemens D-500. Radiación K α de Cu ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) a 40 kV y 30 mA. Se realizan barridos de 5° a 50° 2θ con tamaño de paso 0.05° y tiempo de medida por paso de 10 s.

El porcentaje de cristalinidad (%CrI) se calcula a partir de los difractogramas obtenidos, una aproximación consiste en tomar la intensidad máxima y mínima apropiadas para dar un índice de cristalinidad (Browning, 1967; Buschle-Diller and Zeronian, 1994; Roncero et al., 2003).

Índice de cristalinidad:

$$CrI (\%) = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100 \quad \text{Ec. 2-3}$$

Donde:

I_{002} Intensidad del pico cristalino en el máximo a 2θ entre 22° y 23° para celulosa I (madera y pasta)

I_{am} Intensidad en el mínimo a 2θ entre 18° y 19° y 23° para celulosa I

2.5.3 Determinación de grupos funcionales

Las muestras de las respectivas pastas son secadas al aire en ausencia de luz; seguidamente se realiza un forplexado en un molinillo y se determina la sequedad de las muestras.

✓ **Ácidos carboxílicos**

Método basado en un intercambio de iones y el consumo del 50% de azul de metileno (Davidson, 1948).

Reactivos:

- Hidróxido de sodio (NaOH) 2 M
- Acido clorhídrico (HCl) 0.1 N
- Barbitol ($C_{18}H_{12}N_2O_3$)
- Solución tampón 0.0625 M: 5.756 g de barbitol (ácido 5-5 dietilbarbitúrico) se disuelven en 400 mL de agua destilada y 10 mL de NaOH (2M), la solución se enrasa en un matraz aforado de 500 mL con agua destilada.
- Azul de metileno 0.2 mM: 0.078 g de azul de metileno ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) se disuelven en 200 mL de agua destilada y 10 mL de la solución tampón. Introducir en un matraz aforado de 1 L y enrasar con agua destilada. Comprobar el pH (valor aproximado a 8.6).

Procedimiento:

En un filtro de placa porosa (N°4) previamente tarado, se pesa la cantidad de pasta forplexada para un consumo del 50% de azul de metileno. Directamente en el filtro, se lava la muestra con aproximadamente 250 mL de ácido clorhídrico 0.1N y seguidamente con 750 mL de agua destilada, este lavado se realiza con el objetivo de eliminar cationes metálicos.

La pasta lavada se introduce en un erlenmeyer de 250 mL (provisto de tapón), adicionar 50 mL de azul de metileno 0.2 mM, tapar y homogenizar la suspensión manualmente. Las muestras se dejan reaccionar en la oscuridad durante una noche a temperatura ambiente.

Introducir el filtro en una estufa a 105 °C durante una noche, determinar su peso seco, y calcular la cantidad de muestra residual que haya podido quedar en el filtro.

Después de la reacción, centrifugar las muestras durante 25 minutos a 3000 rpm; tomar 4 mL del sobrenadante y enrasar en un matraz aforado de 100 mL con la solución tampón 0.0625 M diluida 100 veces (0.0625 mM). Con la solución obtenida se determina la densidad óptica a 664 nm (máxima absorción del azul de metileno).

Antes de realizar la medición espectrofotométrica de la solución problema se debe realizar una recta de calibrado con disoluciones de concentraciones conocidas (0.8 μ M, 1.6 μ M, 4 μ M y 8 μ M) de la solución de azul de metileno en la solución tampón 0.0625 mM.

- *Contenido de grupos carboxilos:*

$$COOH \text{ (mmol / 100 g)} = \frac{(c - c') \cdot 0.05}{m + p - m'} \times 100 \quad \text{Ec. 2-4}$$

Donde:

- c Concentración inicial de azul de metileno (0.2 mM)
- c' Concentración de azul de metileno después de la reacción (mM)
- m Peso del filtro de placa porosa (g)
- p Peso seco de la muestra inicial (g)
- m' Peso del filtro después del lavado y secado (g)

✓ **Grupos carbonilo**

Determinación de grupos carbonilo por la formación de cianhidrinas (Lewin and Epstein, 1962).

Reactivos:

- Cianuro de sodio (NaCN) 0.02 M
- Nitrato de plata (AgNO₃) 0.02 N
- Hidróxido de sodio (NaOH) 2 M
- Yoduro potásico (KI) 10% p/v
- Solución tampón: introducir 3.108 g de bicarbonato de sodio y 1.378 de carbonato de sodio en un matraz aforado de 1 L y enrasar con agua destilada. Comprobar el pH (valor aproximado a 9.5)

Procedimiento:

1 g p.s. de pasta se introduce en un erlenmeyer de 250 mL con 25 mL de solución tampón y 50 mL de cianuro de sodio (0.02M). La suspensión se agita manualmente y se deja reaccionar durante 18 horas a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Finalizada la reacción se realiza una filtración (filtro de placa porosa N° 4).

A 25 mL del filtrado se adiciona 5 mL de hidróxido de sodio (2 M) (para asegurar un medio alcalino) y 5 mL de yoduro potásico (para evitar la formación de subproductos de reacción debido a los dos puntos de equivalencia). Esta disolución es valorada con nitrato de plata hasta la aparición de una turbulencia persistente de color blanco. La reacción del nitrato de plata con cianuro forma un complejo del tipo $\text{Ag}(\text{CN})_2$.

- *Contenido de grupos carbonilo:*

$$C = O \text{ (mmol / 100 g)} = \frac{6 \cdot (a - b) \cdot c}{m} \times 100 \quad \text{Ec. 2-5}$$

Donde:

- a Volumen de nitrato de plata consumidos en la valoración del blanco (mL)
- b Volumen de nitrato de plata consumidos en la valoración de la muestra (mL)
- c Concentración de la solución de nitrato de plata (mol/L)
- m Peso seco de la muestra (g)

2.5.4 Ácidos Hexenurónicos [HexAs]

La presencia de ácidos hexenurónicos en las pastas kraft se determina por espectroscopia UV según metódica propuesta por Li (Chai et al., 2001; Gellerstedt and Li, 1996).

Reactivos:

- Acetato de mercurio ($\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) 60 mM en tampón acetato de sodio: Disolver 4.84 g de $\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ en 80 mL de agua desionizada, adicionar 0.72 mL de ácido acético glacial (CH_3COOH) a fin de ayudar la disolución del acetato de mercurio y proteger su hidrólisis. En otros 80 mL de agua desionizada adicionar 4.66 g de acetato de sodio

(CH_3COONa) y disolver. Mezclar las dos soluciones anteriores y enrasar con agua destilada en un matraz aforado de 250 mL. Verificar el pH (valor aproximado 5.4).

- Periodato de sodio (NaIO_4) 0.1 M disuelto en ácido fosfórico (H_3PO_4) 2.8 M. La solución se debe conservar en ausencia de luz.
- Arsenito de sodio (NaAsO_2) al 4% en ácido clorhídrico (HCl) 0.5 M; si no se consigue disolver totalmente, la solución se filtra mediante un filtro de placa porosa (Nº 4) y se recoge el filtrado.
- Ácido tiobarbitúrico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) al 0.3% en agua desionizada. Se recomienda prepararla el mismo día de utilización.

Procedimiento:

En un erlenmeyer de 100 mL se pesa aproximadamente 1 g de pasta seca, y se desintegra con 30 mL agua por medio de agitación magnética; a la pasta desintegrada se adicionan 30 mL de acetato de mercurio (para efectuar la hidrólisis) y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente; seguidamente se realiza una filtración y lavado utilizando un filtro de placa porosa (Nº 2), el líquido filtrado se enrasa en un matraz aforado de 100 mL.

Oxidación: en un tubo de ensayo graduado de 10 mL y provisto de tapón se adicionan 500 μL del filtrado; y bajo una campana de extracción se añade 1 gota de HCl concentrado con una pipeta Pasteur (el HCl se utiliza para separar el Hg de la estructura); tras una agitación suave y manualmente la solución se torna transparente, en este instante adicionar 500 μL de periodato de sodio, agitar rápidamente con un vórtex y dejar en reposo durante 20 minutos, a temperatura ambiente.

Pasados los 20 minutos agitar un poco, añadir 2 mL de arsenito de sodio y agitar inmediatamente hasta conseguir una mezcla homogénea; posteriormente tapar y observar los cambios de color en la solución, pasando de incoloro a amarillo, luego a marrón, posteriormente a amarillo y finalmente a incoloro, este fenómeno ocurre entre 30 segundos y 2 minutos. Es posible que se observe manchas sobre las paredes del tubo de ensayo, para esto se recomienda agitar manualmente hasta conseguir una solución incolora, si no se observa el cambio de color añadir la solución KI, gota a gota hasta que desaparezca el precipitado de color marrón.

Con la solución de ácido tiobarbitúrico se ajusta el volumen total de 10 mL, seguidamente agitar manualmente 2 ó 3 veces asegurando una mezcla eficiente (mantener tapado). Calentar en un baño de agua a 50 °C durante 170 min. Es

importante que el tiempo de reacción sea lo más exacto posible, principalmente si la medición se hace mediante espectroscopia UV.

Finalizado el tiempo de reacción se determina la absorbancia a 549 nm y a 700 nm en un espectrofotómetro UV, realizando previamente una línea de base con agua desionizada. Se recomienda no enfriar y agitar los tubos de ensayo para evitar precipitaciones. La introducción de la solución en las cubetas del espectrofotómetro se debe realizar con una pipeta Pasteur para evitar la presencia de precipitados en la solución a analizar.

Contenido de ácidos hexenurónicos:

$$\text{HexAs } (\mu\text{mol} / \text{g p.s.}) = 0.1318 \cdot \frac{V_T}{V_P} \cdot \frac{A_{549} - A_{700}}{P_s} \quad \text{Ec. 2-6}$$

Donde:

V_T Volumen total preparado (100 mL)

V_P Volumen parcial oxidado (0.5 mL)

A_{549} Absorbancia medida a 549 nm

A_{700} Absorbancia medida a 700 nm

P_s Peso seco de la muestra (g)

Recomendaciones:

-La cantidad de muestra debería ser tal que diera un valor de absorbancia al final entre 0.8 y 1.5, para reducir los errores de lectura. Si la muestra no es de 1 g p.s. variar los volúmenes según la relación 1 (gramos de pasta) : 30 (mL de agua) : 30 (mL de solución de acetato).

- Asegurar una buena desintegración, antes de realizar la hidrólisis y oxidación, por lo que se recomienda dejar la pasta con agua durante un mínimo de 12 horas.

- La adición de los reactivos en el tubo de ensayo se debe realizar apoyando la punta de la pipeta en la pared del tubo y lo más próxima a la solución interior (sin tocarla).

2.5.5 Propiedades electrocinéticas

El análisis de propiedades electrocinéticas incluye la determinación del potencial Zeta (ζ), demanda catiónica por potencial de flujo y titulación polielectrolítica (titulación coloidal). Las respectivas determinaciones se realizaron tras un acondicionamiento de la metodología planteada por los fabricantes de los equipos ya que en las mediciones realizadas en pastas blanqueadas ECF - TCF de eucalipto y lino se encontró una gran interferencia de la conductividad en el potencial de flujo (Cadena et al., 2008)

✓ Potencial Zeta (ζ)

La medición del potencial ζ que se realiza en el equipo SPZ-06 (Figura 2-5) proporciona información sobre la distribución de carga superficial en una suspensión fibrosa.



Determinación del potencial ζ

La suspensión fibrosa es succionada con el funcionamiento de la bomba de vacío y se forma una torta en la célula de medición; cuando el flujo pasa a través de la torta se crea un potencial de potencial que se transmite hacia el SPZ-06 por los electrodos ubicados en la célula de medición.

SZP-06 Mütek™

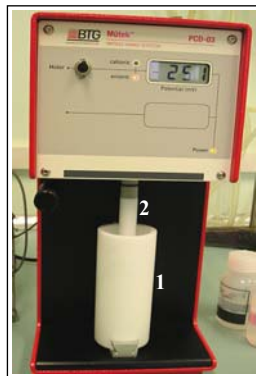
1. Válvula de vacío
2. Célula de medición
3. Vaso célula de medición

Figura 2-5. Equipo SZP-06 Mütek™ (System Zeta Potencial)

La preparación de la suspensión fibrosa (500 mL) se realiza con una desintegración (10000 rev.) a una consistencia $c \leq 3\%$, y ajuste de la conductividad con una solución de KCl 10% en un valor aproximado de 0.1 mS/cm.

✓ Demanda Catiónica por potencial de flujo

La demanda catiónica se realiza en el equipo PCD-03 (Figura 2-6) que se encuentra automatizado con el Dosino 800 (Titrande Metrohm); el método determina la carga presente en una muestra, y su cuantificación requiere hacer una titulación con un polielectrolito de carga opuesta hasta llegar a un potencial de flujo de 0.0 mV; esta neutralización se realiza con un polímero catiónico (Poly-Dadmac 0.001 N) para una carga aniónica, y si una muestra corresponde a una carga catiónica se neutraliza con el polímero aniónico PES-Na 0.001 N.



Demanda catiónica

En la célula de medición y la superficie del pistón los contraiones son separados de las partículas coloidales por influencia de las fuerzas de Van der Waals; y por acción de un movimiento oscilante del pistón se genera un potencial de flujo, donde los contraiones inducen una corriente a través de los electrodos ubicados en la célula de medición, esta corriente (mV) se visualiza en la pantalla del PCD-03.

PCD-03 Mütek™

1. Célula de medición
2. Pistón

Figura 2-6. Equipo PCD-03 Mütek™ (Particle Charge Detector)

La muestra que se analiza corresponde a 10 mL del filtrado (malla 300 µm) de la suspensión fibrosa preparada para el análisis del potencial ζ. Con la detección de carga se procede a la neutralización (automática) con el polímero correspondiente.

Demanda catiónica:

$$c_f = \frac{V_{FP} \cdot c}{V} \cdot 1000 \quad \text{Ec. 2-7}$$

Donde:

- c_f Densidad de carga o demanda catiónica (meq/L)
- V_{FP} Volumen total del polímero estándar requerido para neutralizar la carga superficial (mL)
- c Concentración del polímero titulante (0.001 N)
- V Volumen de la muestra analizada (10 mL)

✓ **Demanda Catiónica por titulación coloidal**

La técnica de titulación coloidal para la caracterización de la carga superficial se realiza con una valoración por retroceso; donde un exceso de carga catiónica [Metil-Glicol Chitosan (MGCh)] en el sistema fibroso es neutralizado con un polímero aniónico [Polivinil Sulfato Potásico (PVSK)] en presencia de un indicador [Azul de O-toluidina (OTB)].

En el análisis se adicionan 4 mL de Metil Glicol Chitosan (cantidad requerida para garantizar un exceso de carga catiónica) a una suspensión fibrosa preparada al 1% de consistencia con 0.25 g p.s. Posterior a la absorción del MGCH (N/400) en las fibras celulósicas se procede a centrifugar la suspensión fibrosa a 3000 rev. durante 20 minutos. Un volumen determinado del líquido sobrenadante (10 mL) se neutraliza con PVSK N/400 (polímero de carga opuesta). El punto de equivalencia se detecta con el indicador azul de O-toluidine que produce un viraje del color azul a rosa.

Demanda catiónica:

$$q = \frac{I}{400} \cdot \frac{2.9}{1000} \cdot (V_b - V_a) \cdot \frac{fa}{w} \quad \text{Ec. 2-8}$$

Donde:

- q Carga aniónica (eq-g MGCh/g)
- V_b Volumen de PVSK consumidos en una valoración realizada sin pasta (mL)
- V_a Volumen de PVSK consumidos en la valoración de la muestra
- fa Factor de actividad de la disolución del PVSK
- w Gramos de pasta seca utilizada en el análisis

2.6 ESTABILIDAD DE LAS PASTAS ECF Y TCF

Específicamente se estudia la estabilidad de la blancura con un envejecimiento acelerado bajo la influencia de calor-humedad (80 °C y 65 %HR) (ISO-5630) y luz, durante un total de 144 horas. Una posible reversión de blancura se realiza con la medición de las propiedades ópticas en el equipo Technidyne PC Color Touch, en intervalos de 4 horas. El análisis incluye blancura (ISO-2470), coordenadas cromáticas CIE L*a*b* y CIE L*C*, curvas de reflectancia, y curvas k/s .

La exposición de las hojas de papel al envejecimiento acelerado por efecto de calor y humedad [termoamarillamiento] se realiza en una "cámara climática" (HC 2020 de Heraeus Vötsch); y la reversión de blancura por exposición a la luz [fotoamarillamiento] se efectúa en un aparato Suntest (CPS+ Heraeus Industrietechnik) equipado con una fuente de luz de Xenón y un filtro UV que permite simular la luz del día.

2.7 BIBLIOGRAFÍA

- Browning, B.L., 1967. *Methods of wood chemistry*. John Wiley & Sons, New York, 800 pp.
- Buschle-Diller, G. and Zeronian, S.H., 1994. Enzymatic and acid hydrolysis of cotton cellulose after slack and tension mercerization. *Textile Chemist and Colorist*, 26(4): 17-24.
- Cadena, E.M., Garcia, J., Vidal, T. and Torres, A.L., 2008. Determination of Zeta potential and cationic demand of bleached pulps. V Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel, CIADICYP-2008, Guadalajara, México.
- 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.
- Davidson, G.F., 1948. The acidic properties of cotton cellulose and derived oxycelluloses. Part 2, The absorption of methylene blue. *Journal of the Textile Institute* 39: 65-86.
- García Hortal, J.A., 2007. *Fibras Papeleras*. Edicions UPC, Barcelona, 243 pp.
- Gellerstedt, G. and Li, J., 1996. An HPLC method for the quantitative determination of hexeneuronic acid groups in chemical pulps. *Carbohydrate Research*, 294(1): 41-51.
- ISO-187:1990 Paper, board and pulps - Standard atmosphere for conditioning and testing and procedure for monitoring the atmosphere and conditioning of samples.
- ISO-302:2004 Pulps - Determination of Kappa number.
- ISO-534:1995 Paper and board - Determination of thickness, density and specific volume.
- ISO-536:1995 Paper and board - Determination of grammage.
- ISO-1924:1994 Paper and board - Determination of tensile properties. Part 1: Constant rate of loading method.
- ISO-1974:1990 Paper - Determination of tearing resistance (Elmendorf method).
- ISO-2470:1999 Paper, board and pulps - Measurement of diffuse blue reflectance factor (ISO brightness).
- ISO-2758:2001 Paper - Determination of bursting strength.
- ISO-3688:1999 Pulps - Preparation of laboratory sheets for the measurement of diffuse blue reflectance factor (ISO brightness).

- ISO-5263:2004 Pulps - Laboratory wet disintegration. Part 1: Disintegration of chemical pulps.
- ISO-5264:2002 Pulps - Laboratory beating. Part 2: PFI mill method.
- ISO-5267:1999 Pulps - Determination of drainability. Part 1: Schopper-Riegler method.
- ISO-5269:2004 Pulps - Preparation of laboratory sheets for physical testing. Part 2: Rapid-Köthen method.
- ISO-5270:1998 Pulps - Laboratory sheets -Determination of physical properties.
- ISO-5351:2004 Pulps - Determination of limiting viscosity number in cupri-ethylenediamine (CED) solution.
- ISO-5626:1993 Paper - Determination of folding endurance.
- ISO-5630:1996 Paper and board - Accelerated ageing - Part 3: Moist heat treatment at 80 °C and 65 % relative humidity.
- ISO-5636:1992 Paper and board - Determination of air permeance (medium range). Part 3: Bendtsen method.
- ISO-9184:1990 Paper, board and pulps - Fibre furnish analysis. Part 3: Herzberg staining test.
- ISO-16065:2001 Pulps - Determination of fibre length by automated optical analysis. Part 1: Polarized light method.
- ISO-23714:2007 Pulps - Determination of water retention value (WRV).
- Lewin, M. and Epstein, J.A., 1962. Functional groups and degradation of cotton oxidized by hypochlorite. *Journal of Polymer Science*, 58(166): 1023-1037.
- Merkblatt-IV/33/57, Bestimmung des Wasserückhatevermögens von Zellstoffen.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. and Vidal, T., 2003. TCF bleaching of wheat straw pulp using ozone and xylanase. Part A: paper quality assessment. *Bioresource Technology*, 87(3): 305-314.
- Tappi-271, cm-02 Fiber length of pulp and paper by automated optical analyzer using polarized light.

CAPÍTULO 3.

Caracterización inicial y curvas de refinado de las pastas kraft ECF y TCF

La operación de refinado es una etapa fundamental en los procesos papeleros, produce una modificación en las fibras celulósicas para conferir propiedades deseadas en el papel, estas características especiales están relacionadas, entre otras, con la formación de enlaces fibra-fibra. Son diversas las variables que interfieren en la respuesta al refinado, excluyendo las variables controlables del proceso (presión, temperatura, pH, consistencia,...) y las especificaciones geométricas de los equipos de refinado, se encuentra la materia prima (fibras celulósicas) cuyas especificaciones finales involucran su procedencia (fibras madereras y no madereras), procesos de cocción y secuencias de blanqueo. La evaluación de dos tipos de pastas TCF (Totally Chlorine Free) y ECF (Elemental Chlorine Free) de Eucalyptus globulus en la operación de refinado permiten evidenciar que el tipo de blanqueo condiciona la aptitud al refinado, ya sea por sus características iniciales en la morfología de las fibras o por su composición química. El refinado de las pastas TCF revela una mayor evolución en el índice de retención de agua (%IRA), en la resistencia al drenaje (°SR) -efectos que se atribuyen a su mayor contenido en ácidos carboxílicos y al factor de cristalinidad- y en la obtención de papeles más cerrados –densos- con alta resistencia en el índice de estallido. La evolución en las resistencias al desgarrar, plegado y tracción demuestran que una secuencia de blanqueo TCF provoca mayor modificación en las fibras celulósicas en comparación a una ECF.

3.1 INTRODUCCIÓN

Los principales objetivos de los procesos papeleros se enfocan a la obtención de papeles con determinadas especificaciones técnicas para su posterior uso y

aplicación; blancura, resistencia y durabilidad son parámetros de gran interés que dependen directamente de la materia prima, de los procesos de cocción, blanqueo, y refinado. Múltiples investigaciones enfocadas a potenciar los procesos papeleros tienen una finalidad medioambiental y económica; específicamente el desarrollo de las secuencias de blanqueo ha permitido la introducción de tecnologías más amigables con el medio ambiente (Reinstaller, 2008); en estas tecnologías se encuentra la secuencia TCF (*Totally Chlorine Free*) que elimina totalmente el uso de compuestos clorados como agentes de blanqueo, generando una reducción total de los compuestos organoclorados en los efluentes del proceso; y ventajas como la reutilización de efluentes, cierre de circuitos, disminución del consumo de agentes de blanqueo y nuevas aplicaciones como las destinadas al embalaje de productos alimenticios (pastas sin halógenos orgánicos absorbibles - AOX).

Actualmente la tecnología predominante en blanqueo corresponde a la secuencia ECF (*Elemental Chlorine Free*); las etapas que involucran esta secuencia producen una eficaz deslignificación pudiéndose obtener papeles con alta blancura; sin embargo la detección de AOX, DQO, y color en los efluentes por la utilización de dióxido de cloro (Roncero, 2001) hace que este tipo de secuencia este en continua investigación. Adicionalmente en este campo diversos estudios se enfocan a optimizar los procesos para reducir el consumo de agentes de blanqueo, incrementar la selectividad con la introducción de ozono (Mokfienski and Demuner, 1994; Roncero et al., 2003a) y alternativas biotecnológicas, como la utilización de las enzimas xilanasas (Roncero et al., 2003b) y el sistema lacasa mediador (Camarero et al., 2004; García et al., 2003; Moldes and Vidal, 2008), entre otras aplicaciones que consecuentemente permitan obtener secuencias TCF comparables en propiedades ópticas y fisicomecánicas a las pastas ECF (Rautonen et al., 1996) y se orienten a la obtención de procesos de blanqueo totalmente libres de efluentes "TEF" (*Totally Effluent Free*).

Los procesos de blanqueo provocan un deterioro de las fibras celulósicas; la severidad de las condiciones de los tratamientos y los reactivos químicos utilizados inducen a una alteración de los hidratos de carbono (Roncero et al., 2003a) causando, entre otras consecuencias, un efecto sobre el grado de polimerización de la celulosa y la morfología de las fibras; por consiguiente las investigaciones y técnicas enfocadas a la búsqueda de nuevos parámetros que optimicen la obtención de pastas blanqueadas deben tener en cuenta la aptitud de las pastas al refinado, ya que las características físicas y químicas de las fibras influyen en la formación y consolidación del sistema fibroso en el proceso de fabricación del papel.

La resistencia de las fibras condiciona las diferentes aplicaciones en el papel y cartón, siendo este un criterio importante para evaluar la obtención de pastas papeleras (Molin and Teder, 2002). Las pastas de celulosa requieren, además, una preparación o acondicionamiento para potenciar los mecanismos de cohesión de las fibras y generar resistencia en el papel, este acondicionamiento se realiza con la etapa de refinado y depende del tipo de fibra, propiedades iniciales tanto físicas como químicas (Kerekes, 2005; Mohlin and Miller, 1995; Seth, 1999; Wang et al., 2006). El refinado es una operación compleja, el entendimiento de los diversos efectos en la fibra han sido fundamentadas en las teorías propuestas por Higgins y Yong (1962) con una clasificación de los efectos primarios y secundarios del refinado.

3.1.1 Principios básicos de la operación de refinado

La etapa de refinado es una operación mecánica donde se modifica la morfología de las fibras celulósicas en medio acuoso para conferir características especiales que permitan la generación de enlaces interfibrilares (enlaces naturales con fibras adyacentes) y producir una respuesta óptima en las propiedades físicas del papel como producto final. A nivel fisicoquímico los efectos del refinado se relacionan con el incremento del área superficial de las fibras (creación de nuevas superficies y partículas) (Seth, 1999; Stoere et al., 2001) y a la generación de enlaces puentes de hidrogeno intrafibra (Hietanen and Ebeling, 1990).

El área superficial se incrementa por la liberación de fibrillas, efecto conocido como fibrillación externa, siendo este uno de los principales efectos primarios de la operación de refinado que se produce por la eliminación parcial de las paredes externas de la fibra, lo que a su vez permite la penetración del agua en el interior de la misma provocando una fibrillación interna (Stone et al., 1968) al romper enlaces intermoleculares, celulosa-celulosa (intrafibras) y hemicelulosa-celulosa, y sustituirlos por enlaces celulosa-agua-celulosa (fibra-agua) (García Hortal, 2007; Smook, 2002; Torres López, 1988). Los efectos mencionados dependen de la intensidad del refinado, una mayor energía de refinado acelera los fenómenos de hidratación, fibrillación externa, deslaminación y eliminación parcial de las paredes S1 y S2 de las fibras celulósicas (Nanko et al., 1989). Otra consecuencia de la operación de refinado se relaciona con la disminución de la longitud de fibra y la formación de finos secundarios ($L \leq 0.2$ mm) que resultan de la remoción de partículas de las paredes externas de la fibra como consecuencia de la fibrillación externa y de un efecto de cortadura en las fibras.

La clasificación de los efectos primarios del refinado: fibrillación externa e interna, generación de finos, acortamiento de la fibra (Higgins and de Yong, 1962; Page, 1989), se complementa con la "fibrillación molecular", definida como una solubilización parcial de algunos componentes poliméricos de la pared celular (Lumiainen, 2000; Torres López, 1988). Los tres tipos de fibrillación y la formación de nuevas partículas tienen gran influencia sobre los efectos secundarios de la fibra [flexibilidad, longitud media de la fibra, volumen y superficie específica]; sobre el sistema fibra-agua [resistencia al desgote, resistencia de la hoja húmeda, retención de agua, tensiones durante el secado]; y en las propiedades fisicomecánicas del papel [área enlazada, densidad, permeabilidad, alargamiento, módulo elástico, resistencia a la tracción, estallido, plegado, desgarró]. El conjunto de los efectos primarios y secundarios efectúan un importante rol en los mecanismos de cohesión fibra - fibra (*bonding*) permitiendo el desarrollo de resistencia al papel fabricado (Kerekes and Schell, 1995).

La Figura 3-1 expone, a nivel general, los cambios morfológicos de la fibra durante el refinado; los efectos primarios como la fibrillación externa, acortamiento de la fibra y formación de finos pueden ser observados con el incremento de la energía de refinado. La modificación de las paredes externas de la fibra implica la liberación de fibrillas y producción de microfibrillas en la superficie de la fibra, lo que ocasiona un aumento sensible del área superficial; otros efectos se relacionan con el deterioro estructural de la fibra con la formación de hendiduras, dislocaciones y torceduras.

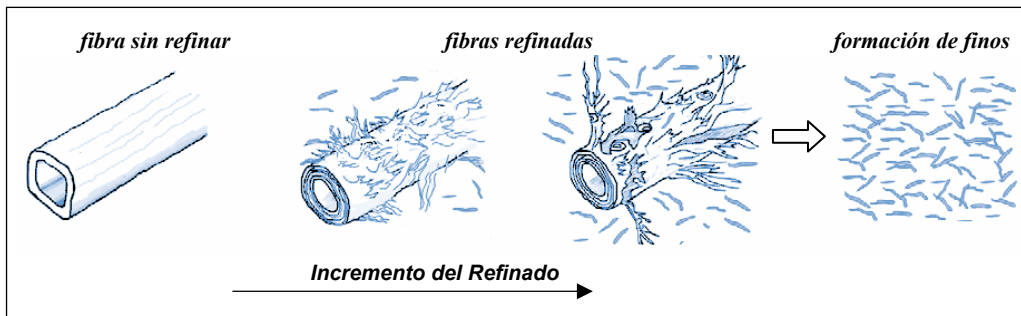


Figura 3-1. Esquema general de la transformación morfológica de las fibras en el refinado

Los cambios morfológicos que produce la transmisión de energía a las fibras durante el refinado se vincula a fuerzas hidráulicas y mecánicas; convencionalmente en los mecanismos del refinado el rotor gira a alta velocidad respecto al estator, de esta forma las fibras ubicadas entre ambos sufren un efecto de cortadura, aplastamiento y fricción entre sí y las guarniciones del equipo, la acción conjunta de estos esfuerzos mecánicos producirá el refinado de las pastas papeleras (Torres López, 1988).

Independiente del método o equipo de refinado, es habitual utilizar parámetros de control como la energía específica neta (potencia efectiva absorbida por caudal másico tratado) y la intensidad de refinado (medida que relaciona la energía específica neta con el área efectiva de refinado) para indicar la eficiencia del refino sobre las modificaciones producidas en las fibras para una energía específica dada.

El trabajo mecánico que realizan los equipos industriales, ya sean cilíndricos, de discos o cónicos, sobre la morfología de las fibras depende de diversas variables relacionadas con las características y el tipo de equipo (velocidad de rotación, tamaño, ángulo y forma de las cuchillas, desgaste de las guarniciones,...) (Kerekes, 2005); tipo de materia prima (fibras madereras, no madereras); propiedades morfológicas de las fibras (longitud, ancho, espesor de pared) (Mohlin and Miller, 1995); procedencia y composición química (vinculada a los procesos de cocción y blanqueo); condiciones de operación: energía aplicada, entrehierro, temperatura, pH, consistencia, aditivos presentes, calidad del agua de proceso, concentración de electrolitos, entre otras variables que pueden ser controlables (Casey, 1980; Smook, 2002). Las variables ya mencionadas han generado diversas investigaciones, que buscan optimizar el proceso de refinado y reducir costos de operación minimizando los consumos de energía; en estas investigaciones la utilización de refinadores de laboratorio tienen eficaz y amplia aplicabilidad en la exploración de variables que potencien los efectos del refinado.

La pila Valley, los molinos Lampen, Jokro y PFI son los equipos de laboratorio más conocidos para el refinado de pastas. Los primeros se han ido reemplazando gradualmente por el molino PFI, siendo este equipo el refinador más utilizado a nivel de laboratorio (Seth, 1999); la ventaja que presenta el molino PFI está vinculada al control de la energía aplicada (número de revoluciones), a un efecto de refinado semejante a los refinadores industriales con alta fibrillación interna (Kerekes, 2005) sin generar significativas deformaciones de la fibra (Mohlin and Miller, 1995), y a la cantidad de pasta requerida (30 g p.s.) para un punto de refinado (ISO-5264). Otros equipos utilizados en investigaciones corresponden a los refinadores Escher-Wyss y Bauer-Mead.

Dados estos fundamentos, este capítulo tiene como objetivo principal evaluar la aptitud al refinado de pastas kraft industriales ECF y TCF de *Eucalyptus globulus*, pastas que difieren únicamente en el tipo de secuencia de blanqueo. Los efectos que se observen en la modificación de las fibras celulósicas, como respuesta al trabajo mecánico que realiza el molino PFI, y su posterior consecuencia en las propiedades de las pastas refinadas, propiedades físicas y de resistencia de los papeles

elaborados con ellas, permitirá determinar la influencia de las secuencias de blanqueo en los efectos del refinado.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios de la operación de refinado inician con la verificación del funcionamiento del molino PFI, esta verificación consiste en determinar si el equipo necesita una calibración o un acondicionamiento de las superficies de refinado. Con el paso del tiempo y el uso del refinador es posible que se presente una modificación del equipo, realizando un mayor o menor efecto de refinado desde su estado inicial o momento de adquisición del equipo. La norma ISO-5264 recomienda hacer revisiones periódicas utilizando una pasta de referencia para un control interno del molino PFI en el que se compruebe la repetibilidad y reproducibilidad. La verificación del molino PFI generó un extenso trabajo (Anexo) tras descubrir que las superficies de refinado habían evolucionado, este hallazgo hizo evidente la necesidad de ajustar las superficies de refinado para mantener la estabilidad de equipo. Las verificaciones realizadas a nivel interno y externo (interlaboratorio) proporcionaron una respuesta satisfactoria, lo cual permitió iniciar las investigaciones que involucran la operación de refinado.

Pastas kraft ECF y TCF de *Eucalyptus globulus* son refinadas en el molino PFI según el procedimiento descrito en la norma ISO-5264. La aptitud al refinado de estas pastas papeleras se efectúa con cuatro puntos de refino [0, 1500, 3000 y 4500 rev.]. La metodología del refinado requiere la individualización de las fibras mediante la desintegración de 30 g p.s. al 1.5% de consistencia y 30000 revoluciones (ISO 5263), la pasta desintegrada se filtra para obtener una consistencia del 10% y, previa determinación del peso húmedo de la torta formada, se distribuye sobre la superficie lisa del molino PFI para proceder al refinado. La pasta refinada vuelve a ser desintegrada (10000 rev., 1.5% de consistencia), seguidamente se determinan el grado Shopper - Riegler (°SR) (ISO-5267) y el índice de retención de agua (%IRA) (ISO-23714 y Merkblatt IV/33/57).

En el equipo Rapid-Köthen se elaboran las hojas de papel (ISO 5269) con un gramaje de 75 ± 2 g/m². Los papeles son acondicionados a una temperatura y humedad estandarizada por la norma ISO 187 para la determinación del gramaje (ISO-536), espesor, densidad y volumen específico (ISO-534), y propiedades de resistencia como el índice de tracción (ISO-1924), índice de estallido (ISO-2758), índice de desgarro

(ISO-1974), resistencia al plegado (ISO-5626) y permeabilidad al aire Bendtsen (ISO-5636).

En la pasta se realizan otros análisis según procedimientos descritos en el Capítulo 2, y corresponden a la determinación de la blancura (ISO-2470), número kappa (ISO-302), viscosidad específica (ISO-5351), grupos funcionales (ácidos carboxílicos y grupos carbonilo), ácidos hexenurónicos (HexAs), cristalinidad (%CrI) de la celulosa y análisis de las fibras por microscopía electrónica de barrido (SEM).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las pastas ECF y TCF de *Eucalyptus globulus* difieren en el grado de polimerización de la celulosa, la pasta ECF presenta mayor viscosidad específica (858 mL/g) con respecto a la TCF (759 mL/g); usualmente, si se obtiene mayor viscosidad mayores son las propiedades físicas del papel (Lindholm, 1990; Roncero, 2001), sin embargo existen otros factores inherentes a la composición química (hemicelulosas, extractivos, grupos funcionales, lignina residual,...) que pueden conferir una mayor o menor resistencia intrínseca a las fibras celulósicas.

Según algunos autores, las pastas TCF tienen una respuesta inferior o comparable en propiedades de resistencia con respecto a la pasta ECF (Fuhrmann et al., 1996; Reinstaller, 2008; Van Lierop et al., 1997). La evaluación de las secuencias ECF - TCF de procedencia industrial en la operación de refinado admite hacer un balance entre estos procesos de blanqueo en cuanto al desarrollo de propiedades físicas y mecánicas de los papeles obtenidos con ellas, y así verificar la correspondiente aptitud al refinado.

En relación a las características físicas y químicas de las respectivas secuencias de blanqueo (Tabla 3-1) se observa que las pastas TCF difieren de las ECF en el número kappa [NK], viscosidad, contenido de grupos funcionales (grupos carboxilo y carbonilo) y ácidos hexenurónicos [HexAs]. En los resultados se destaca que el número kappa de la pasta TCF (5.0 NK) es superior a la pasta ECF (0.5 NK), esta diferencia no implica cambios significativos en la determinación de la blancura (%ISO). Tradicionalmente el número kappa se ha vinculado al contenido de lignina residual, y una eficiente deslignificación es fundamental para la generación de enlaces fibra – fibra, para la obtención de papeles impresión escritura con altos niveles de blancura y con óptima estabilidad en las propiedades ópticas (eliminación de los fenómenos de reversión).

Tabla 3-1. Propiedades de las pastas kraft ECF y TCF

	ECF	TCF
Blancura, % ISO	89,5 ± 0,3	89,0 ± 0,4
Número kappa	0,5 ± 0,0	5,0 ± 0,1
Viscosidad, mL/g	858 ± 27	759 ± 15
HexAs, μ mol/g p.s.	0,2 ± 0,1	35,4 ± 1,1
Carboxilos, mmol/100 g p.s	6,75 ± 0,14	11,47 ± 0,71
Carbonilos, mmol/100 g p.s	3,03 ± 0,31	0,59 ± 0,21

Con las características iniciales de las pastas, se predice que los efectos del refinado en la pasta TCF pueden ser inferiores a la pasta ECF ya que la lignina residual tiende a debilitar la actividad superficial de las fibras, impide la penetración de agua hacia las zonas internas de la fibra por su carácter hidrofóbico, e inhibe la formación de enlaces interfibrilares. Esta predicción se descarta con el análisis de la resistencia al drenaje (método Shopper Riegler -°SR) y el índice de retención de agua (%IRA) de las pastas refinadas a: 0 - 1500 - 3000 y 4500 rev.; según los resultados expuestos en la Tabla 3-2, la pasta TCF tiene mayor capacidad de hidratación de las fibras (%IRA), y un mayor °SR tras el trabajo mecánico realizado por el molino PFI sobre las fibras celulósicas.

Tabla 3-2. Propiedades físicas de las pastas refinadas ECF y TCF

PFI/rev.	Shopper-Riegler (°SR)		I. Retención de agua (%IRA)	
	ECF	TCF	ECF	TCF
0	20	21	103	106
1500	25	36	128	138
3000	35	60	142	151
4500	50	72	150	166

La Figura 3-2, muestra claramente que la evolución de la resistencia al desgote -°SR- y capacidad de hidratación de las fibras (%IRA) en función del grado de refinado es superior para la pasta TCF, resultados que sugieren diferente modificación en las fibras celulósicas y mayor aptitud al refinado con respecto a la pasta ECF. La evolución de la pasta TCF posiblemente es consecuencia de una mayor deslaminación y/o desprendimiento de las capas externas de la fibra, fibrillación, acortamiento de fibra y formación de finos secundarios, efectos que incrementan el área superficial específica y la capacidad de hidratación de las fibras; este análisis

permite eliminar la interferencia del contenido de lignina residual en las propiedades de hidratación y drenabilidad; por consiguiente el número kappa, junto con la viscosidad específica no son parámetros suficientes que puedan predeterminar la aptitud al refinado de pastas blanqueadas, dado que además en la determinación del número kappa interfieren otras estructuras oxidables (ácidos hexenurónicos) que generan una medida errónea del contenido de lignina residual (Costa and Colodette, 2007; Li and Gellerstedt, 1998).

Las notables diferencias en la resistencia al drenaje (hasta de 25 °SR) ponen en manifiesto la influencia de las secuencias de blanqueo en este parámetro -uno de los más utilizados para controlar el refinado de pastas papeleras (Smook, 2002)-, como también en el índice de retención de agua (%IRA). El notable desarrollo de los efectos primarios del refinado en la pasta TCF puede ser consecuencia de sus características higroscópicas, dado su mayor contenido en ácidos carboxílicos (11.47 mmol/100 g p.s.) con respecto a la pasta ECF (carboxilos: 6.75 mmol/100g p.s.); la presencia de grupos funcionales activos de la celulosa y hemicelulosas interviene en las atracciones fisicoquímicas fibra-agua (Bhardwaj et al., 2006) generando mayor efecto en los fenómenos de hidratación durante la operación de refinado.

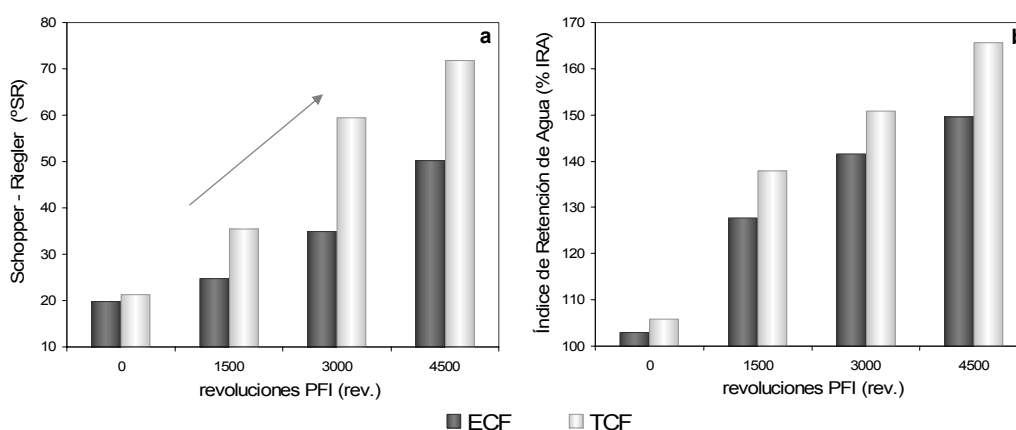


Figura 3-2. Evaluación de las propiedades físicas de las pastas ECF y TCF en el refinado. Schopper - Riegler -°SR- (a), índice de retención de agua -%IRA- (b)

Las propiedades fisicomecánicas de los papeles obtenidos con las pastas refinadas permiten verificar el desarrollo de la resistencia del papel con el incremento de energía en la operación de refinado (Tabla 3-3). Las diferencias que se visualizan en los dos tipos de pastas se atribuyen inicialmente a la composición química y características físicas que alteran la consolidación de las fibras en el sistema fibroso y la generación de enlaces puentes de hidrogeno en la etapa de secado.

Tabla 3-3. Propiedades fisicomecánicas de los papeles elaborados con pastas ECF y TCF

PFI/rev.	Pasta ECF				Pasta TCF			
	0	1500	3000	4500	0	1500	3000	4500
Densidad, $g\ cm^{-3}$	0,55	0,64	0,68	0,72	0,58	0,67	0,72	0,77
Volumen, $cm^3\ g^{-1}$	1,81	1,57	1,46	1,39	1,73	1,48	1,39	1,29
Pb Bendtsen, $\mu m\ (Pa.s)^{-1}$	48,2	28,4	16,3	7,4	43,8	17,5	5,3	1,6
I. Desgarro, $mN\ m^2\ g^{-1}$	5,91	10,19	11,36	11,13	6,75	10,54	10,55	9,71
R. Plegado, $\log(N^{\circ}.Pliegues)$	0,81	2,48	3,49	3,65	0,99	2,72	3,09	3,37
I. Estallido, $kPa\ m^2\ g^{-1}$	0,94	2,47	3,29	3,95	1,14	3,32	3,60	4,39
I. Tracción, $Nm\ g^{-1}$	23,27	41,90	54,30	61,69	22,39	46,83	51,38	59,91
Alargamiento, %	1,19	2,25	2,66	2,91	1,10	2,68	2,74	3,29

El análisis específico del índice de retención de agua (%IRA) de la pasta TCF indica la posibilidad de una mayor generación de enlaces fibra-fibra que, junto con los efectos de la fibrillación externa, colaboran en la compactación del manto fibroso en la formación del papel produciendo papeles más compactos -densos- y con mayor resistencia al paso del flujo del aire según la determinación de la permeabilidad Bendtsen (Figura 3-3a). Las curvas ECF - TCF presentan una tendencia similar a través del incremento del número de revoluciones exhibiendo una evolución normal de las propiedades físicas del papel con la energía aplicada en el refinado, en el que la pasta TCF muestra una resistencia máxima a la permeabilidad Bendtsen de 1.6 $\mu m/(Pa.s)$ y la pasta ECF un valor equivalente a 7.4 $\mu m/(Pa.s)$ en el refinado de 4500 rev., las diferencias en los dos tipos de pasta concuerdan con los respectivos resultados de densidad específica (Figura 3-3b).

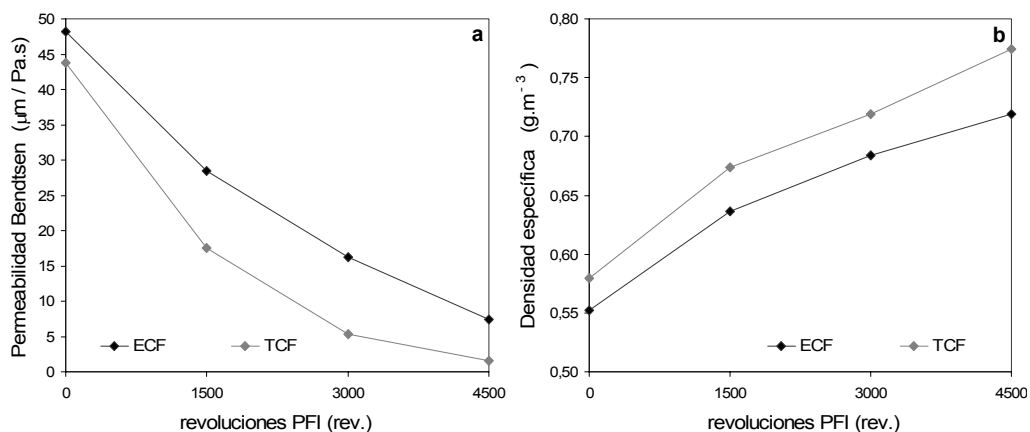


Figura 3-3. Evaluación de la permeabilidad Bendtsen (a) y densidad específica (b)

Con respecto a las propiedades fisicomecánicas del papel, la determinación del índice de estallido indica que la pasta TCF requiere mayor presión hidrostática para romper el papel, en comparación a la pasta ECF (Figura 3-4a). En este ensayo de resistencia intervienen principalmente dos factores que corresponden a la longitud de fibra y la generación de enlaces fibra-fibra (Casey, 1980); las pastas estudiadas corresponden al mismo tipo de fibra (*Eucalyptus globulus*: fibra corta), y no existen variaciones significativas en las dimensiones morfológicas de las fibras con los procesos de blanqueo, en consecuencia la diferencia máxima del 35% que se obtiene a 1500 rev. revela que la secuencia TCF presenta mayor área de enlace o zonas de contacto interfibras disponibles para un entrelazamiento fisicoquímico de las fibras celulósicas y la generación de uniones interfibrilares (Figura 3-4b).

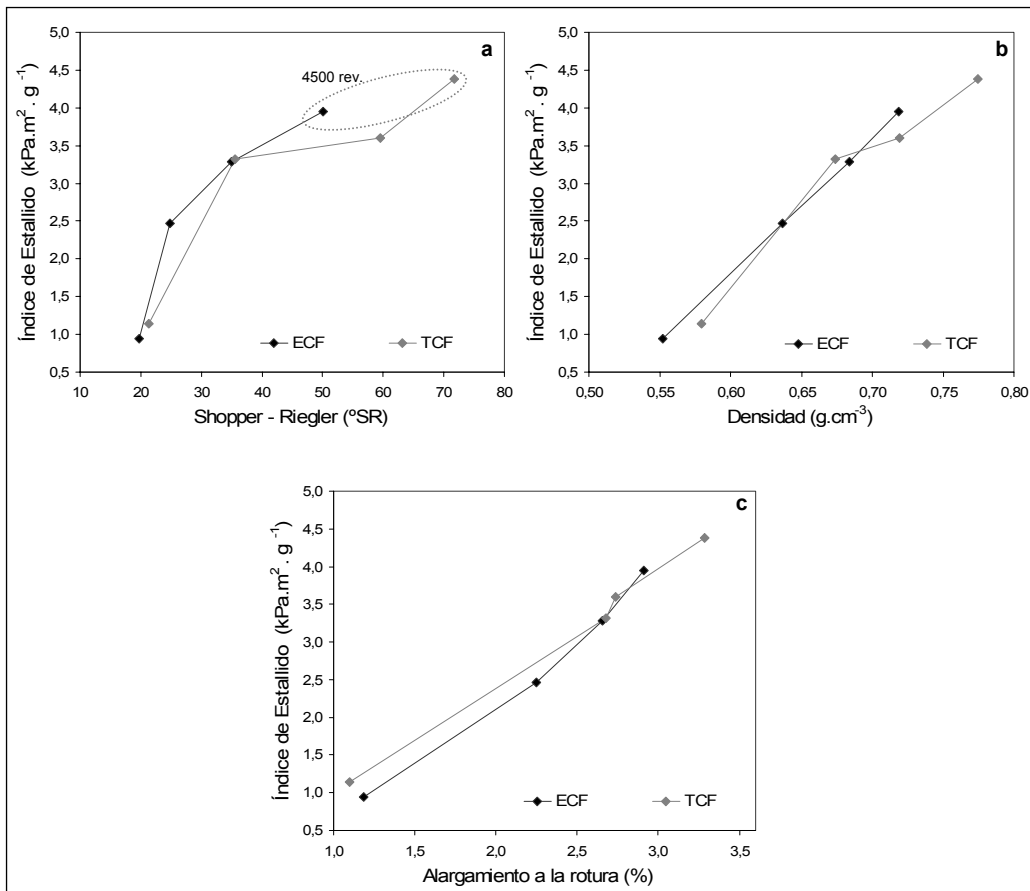


Figura 3-4. Evolución del índice de estallido con respecto al Shopper – Riegler (a), densidad (b) y alargamiento a la rotura (c).

La determinación del índice de estallido también muestra que la pasta ECF requiere mayor energía de refinado para conseguir un valor determinado en la resistencia al estallido; la relación con la resistencia al desgote ($^{\circ}\text{SR}$) pone de manifiesto que se requiere más energía -del orden de un punto de refinado- para alcanzar la resistencia obtenida con la pasta TCF. En las curvas de refinado existen dos aspectos importantes a evaluar y que corresponden a la drenabilidad y al desarrollo de resistencia; concretamente la obtención de papeles con la pasta ECF tendrá un mejor comportamiento por presentar mayor drenabilidad (menor $^{\circ}\text{SR}$) que la pasta TCF, aunque en este caso se obtienen papeles con menor resistencia al estallido.

Adicionalmente, se conoce que en un papel con anisotropía -DM/ST- (papel industrial) la rotura en el ensayo de la resistencia al estallido se produce en la dirección que presenta menor alargamiento (ensayo de tracción - alargamiento) correspondiente a la dirección máquina. En el caso de papeles que no presentan anisotropía como las hojas de laboratorio hechas en el equipo Rapid-Köthen existe una relación prácticamente lineal entre el alargamiento y el índice de estallido (Figura 3-4c); donde la pasta TCF tras un esfuerzo de tensión exhibe mayor resistencia a la rotura provocada posiblemente por una mayor flexibilidad de las fibras.

Al tomar como referencia el análisis del índice de estallido, densidad y alargamiento a la rotura, se esperaría una mayor resistencia a la tracción en la curva de refinado TCF, ya que esta propiedad se encuentra específicamente vinculada al área de enlace que se incrementa con los efectos de la fibrillación externa e interna tras la operación de refinado. En Figura 3-5a, se visualiza que el refinado de 1500 rev. es un punto diferencial entre los dos tipos de pasta, en el que se destaca mayor resistencia a la tracción para la pasta TCF con un efecto equivalente al índice de estallido, no obstante los resultados del índice de tracción a 3000 rev. (51.38 Nm/g) y 4500 rev. (59.91 Nm/g) no presentan valores superiores a los obtenidos con la pasta ECF [54.30 kN/m a 3000 rev. y 61.69 kN/m a 4500 rev.]; estos resultados pueden sugerir que al aumentar el número de revoluciones del molino PFI, además de potenciar los efectos primarios y secundarios del refinado que favorecen las propiedades fisicomecánicas, se produce un sucesivo deterioro de las fibras que provocaría una leve disminución de la resistencia intrínseca de las fibras individuales.

La relación lineal del índice de tracción y estallido (Figura 3-5b) confirma la dependencia de la resistencia con el desarrollo de las uniones interfibrilares durante el refinado, y en estas influyen las características morfológicas de las fibras que son conferidas, para un mismo tipo de fibra, durante los procesos de cocción y blanqueo (curvas ECF y TCF).

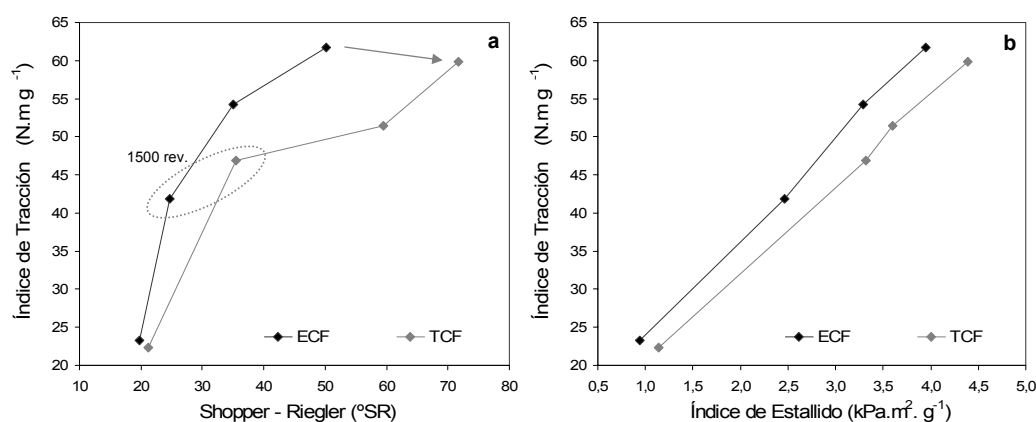


Figura 3-5. Evolución del índice de tracción con respecto al Shopper - Riegler (a) y al índice de estallido (b)

Las curvas de refinado ECF y TCF exponen un comportamiento típico y semejante en la resistencia al desgarro (Figura 3-6a). El trabajo implícito en el desgarro consiste básicamente en dos componentes: el trabajo para arrastrar las fibras desde la matriz fibrosa y el que interviene en la rotura de las fibras, siendo este último mucho menor que el primero (Casey, 1980); es por ello que la resistencia al desgarro incrementa en las primeras etapas de refinado por una mayor resistencia a la fricción entre fibras contiguas generada por las uniones interfibrilares; y un posterior descenso de la resistencia se observa al incrementar la energía de refinado, ya que la densificación impide un fácil deslizamiento entre fibras enlazadas produciendo la rotura de las mismas. Este análisis explica la evolución de las curvas ECF - TCF, donde la resistencia al desgarro llega a un máximo, y con mayor energía aplicada se experimenta un posterior descenso. En la curva ECF el punto máximo se encuentra a 3000 rev. con un valor de $11.36 \text{ mN.m}^2/\text{g}$, mientras que en la pasta TCF se ubica entre 1500 rev. ($10.54 \text{ mN.m}^2/\text{g}$) y 3000 rev. ($10.55 \text{ mN.m}^2/\text{g}$). La comparación entre los dos tipos de pastas indica que a 1500 rev. no existen diferencias notables en la resistencia al desgarro $-0.35 \text{ mN.m}^2/\text{g}$ -, por consiguiente se puede afirmar que la pasta ECF tiene un mejor comportamiento al desgarro que la pasta TCF al desarrollar resistencia con mayor drenabilidad (menor °SR) en los papeles refinados a 3000 rev. y 4500 rev.

La relación del índice de desgarro y la resistencia al plegado (Figura 3-6b), permite visualizar que la pasta TCF en los refinados de 3000 rev. y 4500 rev. presenta una resistencia al plegado ligeramente inferior a la pasta ECF (efecto similar al índice de desgarro). En la resistencia al plegado interfiere principalmente la homogeneidad de la estructura fibrosa en el papel -enlaces interfibras-, longitud de fibra, formación de finos secundarios, y en menor escala la fibrilación externa e interna; el conjunto de estos

efectos confieren resistencia a la rotura durante el ensayo físico del plegado y, según Casey (1980), esta medida es una determinación modificada de la resistencia a la tracción, con lo cual una mayor intensidad de refinado produce disminución en la resistencia; en la pasta TCF esta evolución fue observada a partir de 3000 rev. con un leve descenso de la resistencia a la tracción y plegado.

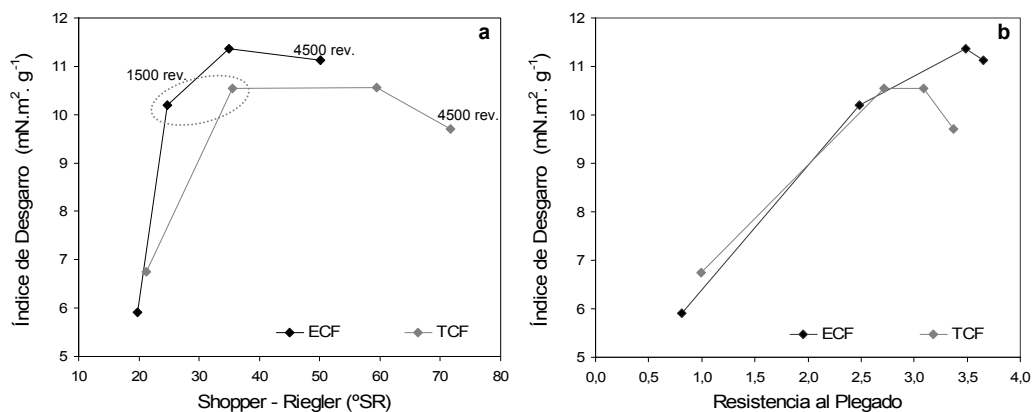


Figura 3-6. Evaluación del índice de desgarro con relación al Shopper – Riegler (a) y resistencia al plegado (b)

El incremento de energía en el refinado convencional acelera los efectos primarios; de acuerdo a los resultados presentados en el refinado de pastas ECF y TCF los efectos de fibrillación externa e interna favorecen la capacidad de enlace en el sistema fibroso y en consecuencia incrementan la resistencia a la rotura por carga o presión, estos efectos se vinculan al nivel de refinado obteniendo una mayor respuesta de las propiedades físicas y de resistencia para los puntos iniciales de las curvas de refinado; en las figuras ya presentadas se observa que en el intervalo de 0 rev. - 1500 rev. existe mayor evolución de las propiedades del papel que en el intervalo de 3000 rev. - 4500 rev. (menor pendiente), indicando que la resistencia incrementa hasta una posterior estabilización y/o posible disminución de la resistencia al incrementar el número de revoluciones en el molino PFI (caso particular de la resistencia al desgarro). Esta observación pone en evidencia la importancia de controlar la energía de refinado para no causar un deterioro de las fibras que impliquen efectos negativos sobre la resistencia intrínseca del material celulósico.

El análisis global de las propiedades de resistencia a la permeabilidad, estallido, tracción, plegado y desgarro, y el comportamiento diferencial entre las pastas ECF y TCF permiten verificar la multiplicidad de factores que intervienen en la operación de refinado; excluyendo la interferencia de variables controlables del proceso como pH,

temperatura, consistencia y presión -dado que el proceso se realiza de manera normalizada-, y tratándose del mismo tipo de fibra, se manifiesta que los procesos de cocción y blanqueo confieren diferentes características en la morfología inicial de las fibras, grado de polimerización, cristalinidad, y en la composición química (holocelulosa, lignina, extractivos, compuestos inorgánicos), que proporcionan una respuesta heterogénea en la etapa de refinado; así con la pasta TCF se obtienen papeles más cerrados (densos) con mayor resistencia a la permeabilidad al aire y al índice de estallido; y en contraste, la pasta ECF produce una mejor respuesta en la resistencia al desgarro. Los resultados de la resistencia a la tracción, plegado y desgarro a 3000 rev. y 4500 rev. de la pasta TCF despiertan especial interés, y permiten predecir que la secuencia de blanqueo TCF causa una mayor modificación o ablandamiento sobre las fibras celulósicas, de esta manera tienen una rápida y mayor evolución a la resistencia al desgote ($^{\circ}$ SR) y retención de agua (%IRA), y un exceso de energía en el refinado puede llegar a deteriorar la resistencia intrínseca de las fibras, tal como se demostró con el índice de tracción y desgarro.

El grado de polimerización de la celulosa (viscosidad específica) de la pasta TCF es inferior a la ECF, resultado que permite argumentar la severidad del proceso de obtención de pastas y blanqueo; igualmente la determinación de la cristalinidad (%CrI) por difracción de rayos X (-XRD) pone al descubierto que la pasta TCF presenta menor cristalinidad (82.2 %CrI) que la pasta ECF (83.6 %CrI) indicando la mayor modificación de la celulosa. Las reflexiones específicas de las regiones cristalinas en las dos secuencias de blanqueo son más notables en la pasta ECF que en la TCF, así lo indica la intensidad máxima (22° - 23°) y mínima (18° - 19°) de la Figura 3-7. Las zonas de elevada cristalinidad limitan el acceso de reactivos y disolventes, por el contrario las zonas amorfas (no cristalinas) son más susceptibles a todas las reacciones químicas, y que además favorecen la flexibilidad y el hinchamiento de las fibras (Annergren, 1996; García Hortal, 2007); esta hidratación puede ser relacionada con la retención de agua en la matriz interna de las fibras celulósicas, de esta forma es posible vincular el factor de cristalinidad con el índice de retención de agua (%IRA) (Inglesby and Zeronian, 1996; Öztürk et al., 2008; Weise, 1998) y consecutivamente con las propiedades de resistencia (Lenz et al., 1993).

El índice de retención de agua (%IRA) de la pasta TCF tiene un incremento del 3% con respecto a la pasta ECF, esta diferencia se va acentuando al efectuar el refinado de las pastas hasta obtener una diferencia máxima de 16 unidades %IRA a 4500 rev.; la mayor cantidad de agua ligada a las fibras y retenida en las zonas amorfas de la pasta TCF deja en evidencia la influencia de las propiedades químicas y físicas en la operación mecánica de refinado, específicamente los ácidos carboxílicos (Molin and

Teder, 2002) y el contenido de zonas amorfas (%CrI) ejercen una importante función en la formación del papel por la generación de enlaces fibra-fibra.

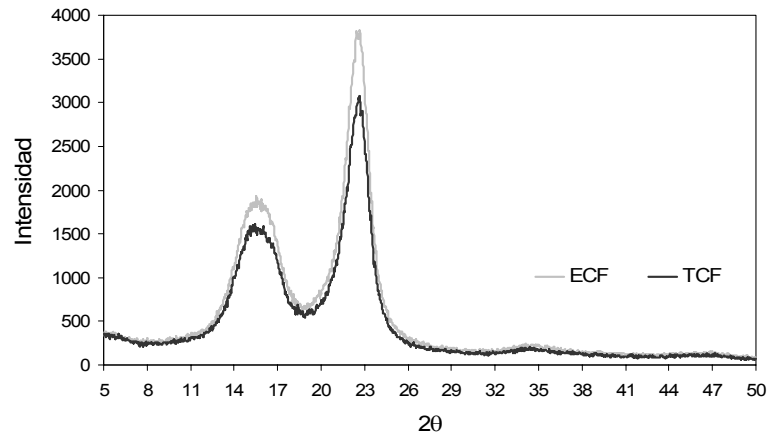


Figura 3-7. Diffractograma XRD de las pastas kraft ECF y TCF

La mayor hidratación en la secuencia TCF favorece la modificación superficial de las paredes externas de las fibras, y se manifiesta a nivel físico con la determinación del %IRA y °SR sugiriendo mayor fibrillación externa que en las pastas ECF tras la operación de refinado. La fibrillación puede ser analizada cualitativamente con imágenes de microscopía SEM, -la Figura 3-8 que presenta micrografías de las pastas refinadas TCF y ECF indican los efectos del refinado-, inicialmente en las micrografías de 0 rev. se detecta que la morfología de las fibras correspondiente a las dos secuencias de blanqueo no difieren notoriamente; el incremento de la energía de refinado (1500 rev. y 3000 rev.) provoca la liberación de fibrillas tras la eliminación parcial de las paredes secundarias de las fibras, en los dos tipos de pasta se observa este efecto, destacándose sobre la pasta TCF más uniones interfibrilares. Estas imágenes permiten comprobar que los valores obtenidos en la resistencia al desgarro para la pasta TCF son consecuencia de los mecanismos de cohesión entre las fibras contiguas.

La evolución de las pastas ECF y TCF tras la operación del refinado difieren en las propiedades fisicomecánicas; y su aplicación dependerá de los requerimientos específicos del producto papeler, tal es el caso de la pasta ECF que puede ser más interesante al obtener papeles con mayor permeabilidad que la pasta TCF, de esta forma la calidad de las pastas esta condicionada a las necesidades de los fabricantes. En referente a calidad, existe la tendencia a evaluar la aptitud al refinado de las pastas papeleras en función de la resistencia al desgote -°SR- y predecir propiedades de

resistencia con la viscosidad específica, el contraste realizado entre las secuencias ECF y TCF sugieren que una evaluación final de las pastas blanqueadas requiere la exploración de todas las variables de respuesta que se pueden obtener en la etapa de refinado.

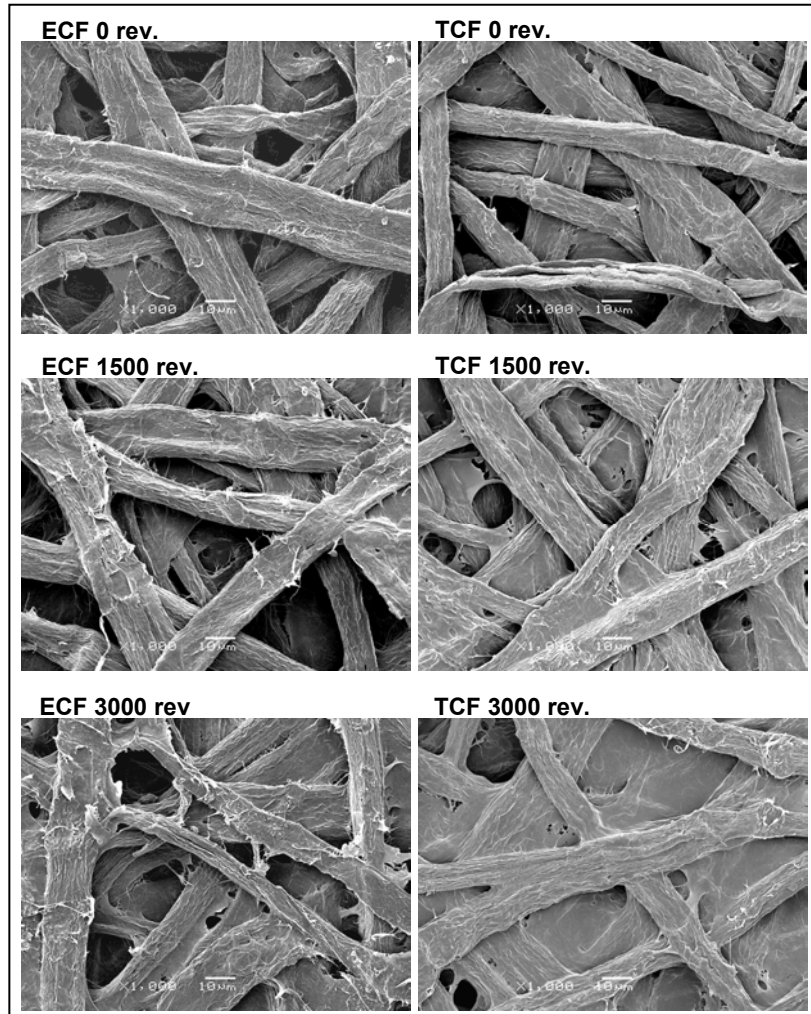


Figura 3-8. Micrografías de microscopía SEM de pastas refinadas ECF y TCF

3.4 CONCLUSIONES

La operación de refinado es fundamental, produce cambios en la morfología de las fibras que, consecuentemente en la formación del papel de las pastas ECF y TCF,

incrementan la resistencia al estallido, tracción, plegado, desgarro y permeabilidad; los efectos del refinado tanto primarios como secundarios favorecen el incremento en el área de enlace (contacto interfibras) e influyen en la consolidación del sistema fibroso en el proceso de fabricación, y consecutivamente en las propiedades fisicomecánicas de las pastas y papeles obtenidos.

Los procesos de cocción y blanqueo confieren propiedades específicas a las fibras celulósicas y, de acuerdo a las condiciones de operación, causarán mayor o menor alteración sobre la morfología de las fibras, estas alteraciones condicionan la aptitud al refinado. La comparación efectuada con el refinado de las pastas TCF y ECF, permite afirmar que la secuencia TCF causa un mayor cambio estructural en las fibras, obteniendo una respuesta rápida en la operación de refinado.

El refinado de las pastas estudiadas indica que la pasta TCF, debido a sus características fisicoquímicas como el menor grado de cristalinidad y mayor contenido de ácidos carboxílicos, presenta mayor evolución en el índice de retención de agua (%IRA) que, junto con una mayor resistencia al desgote ($^{\circ}$ SR), explican la obtención de papeles más densos con mayor resistencia al paso del flujo del aire (permeabilidad Bendtsen) y a la rotura del papel por presión.

La pasta ECF requiere mayor energía de refinado para obtener un valor específico de resistencia al estallido, pero presenta mejor drenabilidad (menor $^{\circ}$ SR) que posiblemente favorecería los sistemas de producción. Esta observación sugiere diferentes mecanismos de cohesión interfibrillares en los dos tipos de pasta, los resultados de la resistencia al desgarro lo confirma, donde la pasta ECF tiene una evolución más favorable durante el refinado: en niveles altos de energía (3000 rev. y 4500 rev.) el descenso en el desgarro es inferior a los papeles obtenidos con la pasta TCF.

Las resistencias al plegado y tracción demuestran que una secuencia de blanqueo TCF provoca mayor modificación en las fibras celulósicas en comparación a una ECF; la evolución de las propiedades ya mencionadas experimentan un notable incremento en el inicio del refinado al apreciado por la pasta ECF; al aplicar mayor energía de refinado el incremento de las resistencias es menor que en la pasta ECF, por lo que es posible que la mayor intensidad del refinado genere más cambios en la resistencia intrínseca de las fibras celulósicas TCF.

Los resultados generales de las propiedades fisicomecánicas de las pastas refinadas indican que una evaluación de las pastas papelera en relación a los efectos sobre

características físicas y de resistencia en los papeles requiere, indiscutiblemente, un análisis de todas las variables de respuesta que se obtienen en la operación del refinado; no es suficiente utilizar parámetros como la viscosidad específica, el número kappa y composición química para predecir los efectos sobre la resistencia del papel como producto final.

3.5 BIBLIOGRAFÍA

- Annergren, G.E., 1996. Strength properties and characteristics of bleached chemical and (chemi)mechanical pulps. In: *Pulp Bleaching – Principles and Practice*, Section VII: The Properties of Bleached Pulp. Tappi Press: 717-748.
- Bhardwaj, N.K., Hoang, V., Dang, V. and Nguyen, K.L., 2006. Dissolution of ionisable groups and lignocellulosic components during low-temperature kraft pulping of pinus radiata. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 290(1-3): 222-228.
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., Del Rio, J.C., Gutierrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martinez, M.J. and Martinez, A.T., 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3): 113-120.
- Casey, J.P., 1980. *Pulp and Paper: Chemistry and Chemical Technology*, vol 2. John Wiley & Sons, New York, 1446 pp.
- Costa, M.M. and Colodette, J.L., 2007. The impact of kappa number composition on eucalyptus kraft pulp bleachability. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 24(1): 61-71.
- Fuhrmann, A., Li, X.-L., Rautonen, R., Toikkanen, L., Hausalo, T. and Sagfors, P.-E., 1996. Influence of TCF and ECF bleaching chemicals on softwood kraft pulp components. *Paperi ja Puu/Paper and Timber*, 78(4): 172-179.
- García Hortal, J.A., 2007. *Fibras Papeleras*. Edicions UPC, Barcelona, 243 pp.
- García, O., Camarero, S., Colom, J.F., Martinez, A.T., Martinez, M.J., Monje, R. and Vidal, T., 2003. Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung*, 57(5): 513-519.
- Hietanen, S. and Ebeling, K., 1990. Fundamental aspects of the refining process. *Paperi ja Puu/Paper And Timber*, 72(2): 158-170.
- Higgins, H.G. and de Yong, J., 1962. The beating process: Primary effects and their influence on pulp and paper properties. The formation and structure of paper. Technical Section, British Paper and Board Makers' Association, 2: 651-697.

- Inglesby, M. and Zeronian, S., 1996. The accessibility of cellulose as determined by dye adsorption. *Cellulose*, 3(1): 165-181.
- ISO-5264:2002 Pulps - Laboratory beating. Part 2: PFI mill method.
- Kerekes, R.J., 2005. Characterizing refining action in PFI mills. *Tappi Journal*, 4 (3): 9 - 14.
- Kerekes, R.J. and Schell, C.J., 1995. Effects of fiber length and coarseness on pulp flocculation. *Tappi Journal*, 78(2): 133-139.
- Lenz, J., Schurz, J. and Wrentschur, E., 1993. Properties and structure of solvent-spun and viscose-type fibres in the swollen state. *Colloid and Polymer Science*, 271(5): 460-468.
- Li, J. and Gellerstedt, G., 1998. On the structural significance of the kappa number measurement. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 13(2): 153-158.
- Lindholm, C.-A., 1990. Effect of pulp consistency and pH in ozone bleaching, Part 6. Strength properties. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 5(1): 22-27.
- Lumiainen, J., 2000. Papermaking Part 1, Stock Preparation and Wet: Refining of chemical pulp. Paulapuro, H. Papermaking Science and Technology. Helsinki: FAPET & TAPPI, Book 8 - Vol 2.
- Mohlin, U.B. and Miller, J., 1995. Industrial refining - effects of refining conditions on fibre properties. *Proc. 3rd International Refining Conference, Atlanta*. (4): 1-13 pp.
- Mokfienski, A. and Demuner, B.J., 1994. Pilot plant experience with ozone in TCF bleaching of eucalypt pulp. *Tappi Journal*, 77(11): 95-103.
- Moldes, D. and Vidal, T., 2008. Laccase-HBT bleaching of eucalyptus kraft pulp: Influence of the operating conditions. *Bioresource Technology*, 99(18): 8565-8570.
- Molin, U. and Teder, A., 2002. Importance of cellulose/hemicellulose-ratio for pulp strength. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 17(1): 14-19.
- Nanko, H., Ohsawa, J. and Okagawa, A., 1989. How to see interfibre bonding in paper sheets. *Journal of Pulp and Paper Science*, 15(1): 17-23.
- Öztürk, H., Potthast, A., Rosenau, T., Abu-Rous, M., MacNaughtan, B., Schuster, K., Mitchell, J. and Bechtold, T., 2008. Changes in the intra- and inter-fibrillar structure of lyocell (TENCEL®) fibers caused by NaOH treatment. *Cellulose*, doi: 10.1007/s10570-008-9249-x.
- Page, D.H., 1989. The beating of chemical pulps. The action and the effects. 9th Fundamental Research Symposium Fundamentals of Papermaking. Cambridge, 1-38 pp.

- Rautonen, R., Rantanen, T., Toikkanen, L. and Malinen, R., 1996. TCF bleaching to high brightness - bleaching sequences and pulp properties. *Journal of Pulp and Paper Science*, 22(8): 306-314.
- Reinstaller, A., 2008. The technological transition to chlorine free pulp bleaching technologies: lessons for transition policies. *Journal of Cleaner Production*, 16(1): 133-137.
- 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. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.
- Roncero, M.B., Colom, J.F. and Vidal, T., 2003a. Cellulose protection during ozone treatments of oxygen delignified Eucalyptus kraft pulp. *Carbohydrate Polymers*, 51(3): 243-254.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. and Vidal, T., 2003b. TCF bleaching of wheat straw pulp using ozone and xylanase. Part A: Paper quality assessment. *Bioresource Technology*, 87(3): 305-314.
- Seth, R.S., 1999. Beating and refining response of some reinforcement pulps. *Tappi Journal*, 82(3): 147-155.
- Smook, G.A., 2002. *Handbook for Pulp & Paper Technologists*. Angus Wilde Publications, Vancouver, 425 pp.
- Stoere, P., Nazhad, M.M. and Kerekes, R.J., 2001. An experimental study of the effect of refining on paper formation. *Tappi Journal*, 84(7): 1-9.
- Stone, J.E., Scallan, A.M. and Abrahamson, B., 1968. Influence of Beating on Cell Wall Swelling and Internal Fibrillation. *Svensk Papperstidning*, 71(19): 687-694.
- Torres López, A.L., 1988. Últimos avances en la tecnología del refinado. Introducción al refinado: Aspectos generales. Tecnología Papelera E.T.S.E.I.A.T. Universidad Politécnica de Cataluña, Terrassa.
- Van Lierop, B., Berry, R.M. and Roy, B.R., 1997. High-brightness bleaching of softwood kraft pulps with oxygen, ozone and peroxide. *Journal of Pulp and Paper Science*, 23(9): 428-432.
- Wang, X., Maloney, T.C. and Paulapuro, H., 2006. Improving the properties of never-dried chemical pulp by pressing before refining. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 21(1): 135-139.
- Weise, U., 1998. Hornification - mechanisms and terminology. *Paperi ja Puu/Paper and Timber*, 80(2): 110-115.

CAPÍTULO 4.

Aplicación de celulasas Cel9B. Biorefinado de pastas papeleras ECF

En esta investigación se estudia la influencia de la enzima celulasa -Cel9B- del tipo 1,4-β endoglucanasa de Paenibacillus barcinonensis sobre el refinado de una pasta kraft ECF de Eucalyptus globulus, en busca de respuestas sobre los posibles efectos enzimáticos para obtener papeles resistentes con menor energía de refinado. La evaluación de propiedades físicas como la resistencia al desgote (°SR) y retención de agua (%IRA) revelan que la enzima Cel9B modifica la morfología de las fibras celulósicas confiriendo una mayor capacidad de hidratación en la matriz interna de las fibras; acelera los efectos del refinado produciendo incrementos en las propiedades de los papeles analizados, de esta manera es posible minimizar el consumo de energía en el refinado para alcanzar determinados valores de resistencia. Existe un efecto de biorefinado, respuesta que permite catalogar a la enzima Cel9B como coadyuvante del refinado al actuar como un biocatalizador altamente eficiente y específico implicando degradación o transformación de componentes celulósicos a determinadas condiciones de presión, temperatura y pH.

4.1 INTRODUCCIÓN

El principal objetivo de la operación de refinado en la fabricación del papel es preparar las fibras para conferir resistencia; su acción mecánica sobre las fibras causa efectos primarios y secundarios, modifica la morfología de las fibras eliminando parcialmente las paredes primaria y secundaria externa provocando una rotura de enlaces de hidrógeno intrafibra, acortamiento de la fibra, formación de finos, fibrillación interna y externa, aumento sensible de la superficie y volumen específico (incremento de los puntos de contacto en la formación del papel) entre otros efectos que favorecen el incremento en las propiedades fisicomecánicas del papel.

El consumo energético requerido por los equipos de refinado implica elevados costos de operación; es indiscutible la búsqueda de alternativas que permitan minimizar el consumo de energía en este proceso. Amplias investigaciones se orientan a incrementar los efectos y la eficiencia del refinado con el diseño y optimización de los parámetros de operación; otro campo de estudio introduce el uso de enzimas como alternativa biotecnológica para incrementar los mecanismos de cohesión entre las fibras en la formación del papel, específicamente la aplicación de celulasas y hemicelulasas se han convertido en objeto de estudio para modificar la morfología de las fibras, el drenaje o resistencia al desgote de las pastas (Cherry and Fidantsef, 2003; Kirk et al., 2002; Percival Zhang et al., 2006), disminuir el consumo de energía en el proceso de refinado convencional e incrementar las propiedades de resistencia en el papel (García et al., 2002).

Las primeras investigaciones relacionadas con la aplicación de enzimas en la modificación de pastas madereras datan del año 1942; una patente revela que la introducción de hemicelulasas remueve o disuelve parcialmente el material no celulósico generando variación en la velocidad de hidratación de las fibras (Diehm, 1942). Este estudio podría ser un antecedente del uso de enzimas enfocados a la modificación de las paredes celulares de las fibras que permitan favorecer los mecanismos de hidratación y potenciar efectos provocados por la operación de refinado. La aplicación de celulasas y hemicelulasas antes del proceso de refinado pueden mejorar la respuesta al refinado o modificar las características de las fibras (Bhat, 2000). Además los tratamientos podrían aumentar el área de enlaces entre fibras, mejorando algunas propiedades de resistencia del papel (Mansfield and Saddler, 1999).

En los años 60 se plantea mejorar la fibrillación y flexibilidad de las fibras con celulasas de *Aspergillus niger* (Bolaski and Gallatin, 1962) y nuevas celulasas de *Trametes suaveolens* de hongos de podredumbre blanca fueron aplicadas en pastas blanqueadas kraft; la acción de estas enzimas incrementan la resistencia al drenaje de acuerdo a la evaluación mediante el Canadian Standard Freeness -CSF- (Yerkes, 1968). La aplicación de este último tipo de enzimas en la obtención de pasta mecánica generó una respuesta positiva, al disminuir el consumo de energía necesaria para el refinado de astillas madereras (Akhtar, 1994; Leatham et al., 1990).

A finales de los años 80, se afirma la posibilidad de aumentar la velocidad de drenaje de pastas recicladas con la aplicación de una mezcla enzimática comercial de *Trichoderma reesei* (Pommier et al., 1989); estos resultados fueron confirmados por distintos autores (Bhat, 1991; Jackson et al., 1993; Pala et al., 2001; Stork, 1995)

reportando que las endoglucanasas mejoran el drenaje en los procesos de obtención de papel recuperado, no obstante los efectos enzimáticos sobre las pastas recicladas varían de acuerdo a la secuencia experimental; y en pastas vírgenes el efecto de las celulasas sobre el incremento en la drenabilidad no fue observado, la aplicación de celulasas CelB causa incremento en la resistencia al desgote [mayor °SR] (García *et al.*, 2002)

Posteriores investigaciones se orientaron a determinar el tipo de celulasa responsable de la modificación morfológica de las fibras celulósicas. Se examinaron cuatro tipos de celulasas: endoglucanasas (EG I y II) y celobiohidrolasas (CBH I y II), observándose que las endoglucanasas causan una eficiente liberación de azúcares e implican pérdidas en las propiedades fisicomecánicas del papel (Pere *et al.*, 1995); este efecto negativo en particular en el índice de tracción y desgarro, fue confirmado en pastas blanqueadas de coníferas (Oksanen *et al.*, 1997). La aplicación de celulasas comerciales (Novozyme SP de *Humicola insolens*) sobre diferentes fracciones de pasta kraft (abeto de Douglas) reportó disminución de las propiedades de resistencia de las fibras a diferentes dosis de aplicación (Mansfield *et al.*, 1997). En otras investigaciones se reporta que la aplicación de endoglucanasas (CelB de *Paenibacillus* s.p. BP-23) mejora el índice de tracción y el índice de estallido, permitiendo ahorros en la energía de refinado, y su uso puede ser muy prometedor a partir de fibras secundarias debido a la posibilidad de compensación del efecto de cornificación (García *et al.*, 2002). Los resultados encontrados, aparentemente contradictorios pueden ser justificados por el tipo de pasta y celulasa utilizadas.

En general las investigaciones realizadas con la aplicación de celulasas en la fabricación de papel reportan la posibilidad de modificar la resistencia al drenaje y por consiguiente la productividad en la fabricación del papel; sin embargo, no todos los estudios concuerdan en sus posibles efectos relacionados con el drenaje y el desarrollo de propiedades de resistencia en el papel. El entendimiento detallado de la acción de celulasas o la modificación enzimática sobre diferentes pastas es importante para evaluar la eficiencia de las celulasas según el tipo y origen de las pastas papeleras.

En esta investigación, la aplicación de celulasas Cel9B del tipo 1,4-β endoglucanasa de *Paenibacillus barcinonensis* en pastas kraft ECF de *Eucalyptus globulus* genera expectativas para obtener papeles resistentes con menor energía de refinado; una respuesta positiva permitiría catalogar a las celulasas como “coadyuvantes del refinado de pastas”. La relevancia de esta investigación radica en la utilización de nuevas celulasas modificadas en laboratorio.

4.1.1 Celulasas y sus mecanismos de acción

Las celulasas pertenecen al grupo de las O-glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.x) que hidrolizan oligosacáridos y/o polisacáridos con la ruptura de los enlaces $\beta(1-4)$ glucosídicos de la celulosa. Esta hidrólisis se puede efectuar mediante inversión o retención de la configuración final del carbono anomérico; los dos tipos de hidrólisis emplean dos ácidos carboxílicos en el centro activo, uno actúa como donador de protones y otro como base nucleofílica (Davies and Henrissat, 1995; McCarter and Withers, 1994).

En el proceso de degradación de la celulosa nativa a glucosa esta ampliamente aceptado la interferencia o acción sinérgica y secuencial de un sistema enzimático formado principalmente por tres tipos de enzimas (Figura 4-1): (a) endoglucanasas o endo-1,4- β glucanasas (EC 3.2.1.4) que rompen al azar los enlaces internos $\beta(1,4)$ de la molécula de celulosa, y actúan preferentemente en las regiones amorfas generando oligosacáridos de longitudes variables y nuevos extremos hidrolizables; (b) exoglucanasas o 1,4- β celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) que actúan gradualmente sobre los extremos reductores o no reductores de la cadena de celulosa liberando subunidades de celobiosas, y presentan actividad sobre la celulosa cristalina y amorfa; (c) celobiasas o β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) que finalizan el proceso hidrolítico e impiden la acumulación de celobiosa, catalizan celobiosa y celodextrinas de bajos peso molecular a glucosa (Lynd et al., 2002; Teeri, 1997).

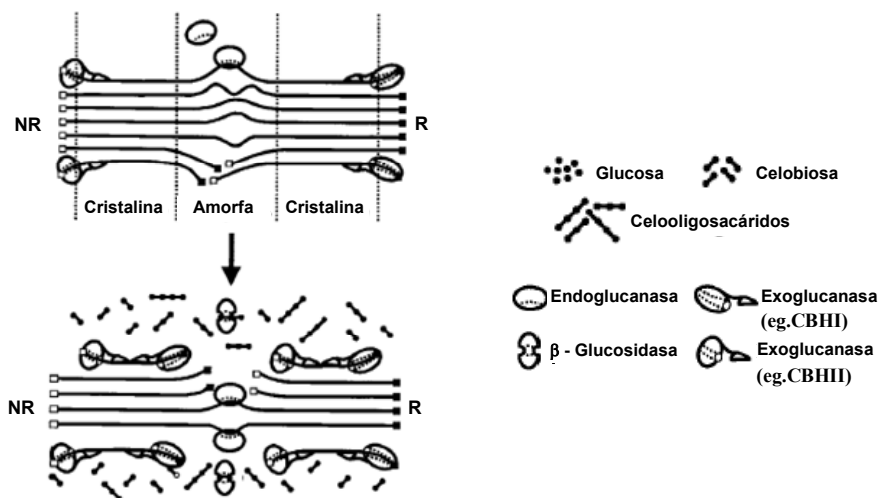


Figura 4-1. Acción del sistema celulolítico en celulosa microcristalina y amorfa. Extremos reductores -R- y extremos no reductores -NR- (adaptado de Lynd et al., 2002).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio inicial de aplicación de celulasas, su acción enzimática y efecto en el proceso de refinado es estudiado en pasta kraft ECF (*Eucalyptus globulus*) de procedencia industrial, con una blancura del 89.5 %ISO y viscosidad de 858 mL/g como características iniciales.

La enzima utilizada en esta investigación corresponde a una celulasa Cel9B del tipo 1,4- β endoglucanasa de *Paenibacillus barcinonensis*, clonada y caracterizada por el grupo investigador *Enzimas microbianas de aplicación industrial* del Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona. Cel9B presenta actividad de endoglucanasa típica: hidrólisis rápida y eficiente sobre celulosa amorfa y baja actividad sobre celulosa cristalina. En ensayos previos relacionados a la actividad enzimática se define aplicar Cel9B a pH 6.0, temperatura 45 °C y 2500 IU/kg p.s.

El tratamiento de la pasta ECF con la enzima Cel9B se desarrolla de acuerdo al procedimiento experimental representado en la Figura 4-2; y se define tres tipos de tratamientos que corresponden a:

- ✓ PI: refinado convencional [pasta ECF, sin tratamiento enzimático]
- ✓ Cel9B: aplicación de la enzima Cel9B + refinado convencional
- ✓ k: tratamiento control, pasta sometida a las condiciones de operación requeridas por la enzima Cel9B + refinado convencional [sin aplicación enzimática]

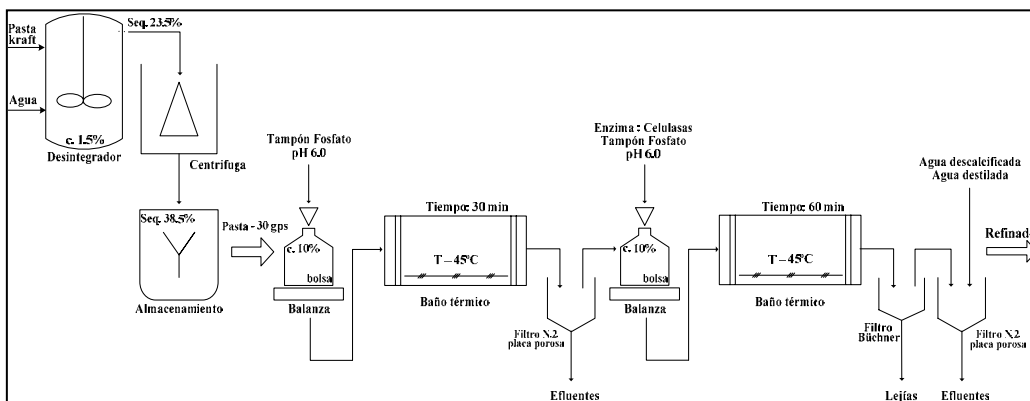


Figura 4-2. Procedimiento de aplicación enzimática de Cel9B en pastas papeleras.

La secuencia experimental definida para la aplicación de Cel9B (Figura 4-2) permite visualizar las etapas de preparación, preacondicionamiento de la pasta y aplicación enzimática. La preparación de la pasta consiste en la desintegración (ISO-5263) o

individualización de las fibras, filtración y centrifugación. Del lote de pasta preparada se distribuyen 30 g p.s (cantidad requerida para un punto de refinado) en bolsas de polietileno. El pre-acondicionamiento tiene por objetivo garantizar las condiciones de operación de la enzima, por consiguiente cada bolsa de pasta es ajustada al 10% de consistencia con la solución tampón (pH 6.0) e introducida en el baño termostático (45 °C) durante 30 minutos a presión atmosférica. En la aplicación enzimática la pasta pre-acondicionada es nuevamente ajustada al 10% de consistencia con el tampón (pH 6.0) y la dosis de enzima, la hidrólisis se realiza en el baño termostático (45 °C) durante una hora. El tratamiento enzimático finaliza con el lavado de la pasta tratada y la recolección de lejías para posterior análisis por cromatografía en capa fina -TLC-.

Al finalizar la aplicación de Cel9B, la pasta tratada es refinada en el molino PFI (ISO-5264). El refinado se realiza en cuatro puntos que corresponden a 0 - 1500 - 3000 y 4500 rev.; seguidamente se realizan hojas de papel a un gramaje $75 \pm 2 \text{ g/m}^2$ en el equipo Rapid-Köthen (ISO-5269). La caracterización física de la pasta incluye análisis de viscosidad (ISO-5351), grado Schopper-Riegler -°SR- (ISO-5267), índice de retención de agua -%IRA- (ISO-23714; Merkblatt-IV/33/57), longitud de fibra (Tappi-322), cristalinidad de la celulosa (XRD) y análisis morfológico de las fibras con imágenes de apariencia tridimensional obtenidas por el método de microscopía electrónica de barrido (scanning electron microscopy, SEM).

La caracterización física de las hojas de papel incluye la determinación del gramaje (ISO-536), espesor, densidad y volumen específico (ISO-534). Como propiedades de resistencia se determina el índice de tracción (ISO-1924), índice de estallido (ISO-2758), índice de desgarrado (ISO-1974), resistencia al plegado (ISO-5626) y permeabilidad al aire Bendtsen (ISO-5636).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Influencia enzimática de “Cel9B” en la operación de refinado

El comportamiento de la pasta kraft ECF (*Eucalyptus globulus*) tras la operación del refinado convencional [PI] (0 - 1500 - 3000 - 4500 rev.) es el esperado. Las propiedades fisicomecánicas evolucionan de acuerdo a la energía aplicada en el molino PFI, sirviendo como patrón para la comparación con un biorefinado (Cel9B - tratamiento enzimático con celulasa y refinado posterior). Igualmente, los resultados obtenidos en el tratamiento anexo llamado control [k] (realizado para determinar la

influencia de las variables de operación que intervienen en el procedimiento experimental de aplicación de celulasas) son evaluados conjuntamente con la aplicación de la enzima Cel9B.

El análisis de las propiedades físicas de la pasta [Cel9B] -%IRA y °SR- tras el refinado mecánico revelan el efecto de la aplicación enzimática (Figura 4-3). Cel9B causa mayor modificación morfológica en las fibras y los resultados sugieren una deslaminación de las capas externas -o bien podríamos referirnos a un ablandamiento de la fibra- que, junto con la operación de refinado favorece la eliminación parcial de la capa primaria de la fibra, y como consecuencia se mejora la accesibilidad de moléculas de agua a sus capas internas favoreciendo la formación de enlaces secundarios celulosa-agua-celulosa.

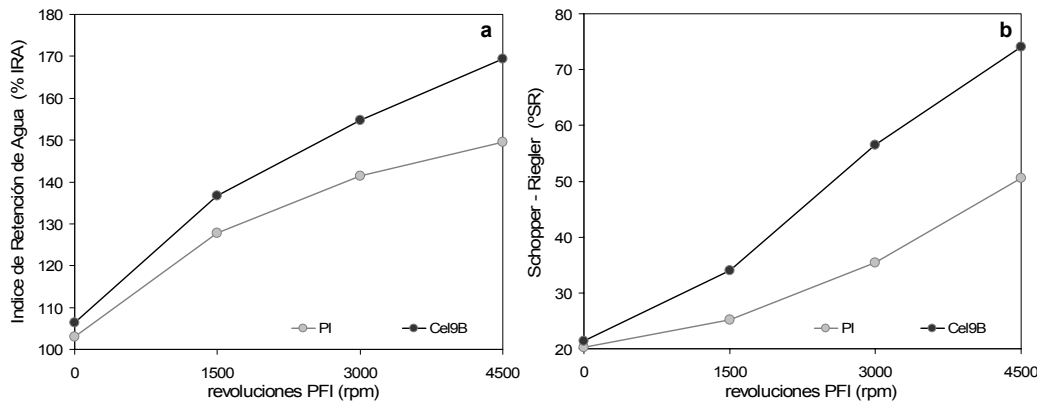


Figura 4-3. Evolución del índice de retención de agua -%IRA- (a) y grado Shopper-Riegler -°SR- (b) con respecto al nivel de refinado

La hidratación y retención del agua en la matriz celulósica se observa tras un centrifugado enérgico en la determinación del %IRA, en este parámetro la cantidad de agua que no está directamente ligada a la fibra es eliminada y únicamente se cuantifica la cantidad de agua que está fuertemente asociada a las fibras. El resultado del %IRA es un parámetro que describe directamente la capacidad de hidratación (Milichovsky and Adamkova, 1996) e incremento en la superficie específica de las fibras, efectos que también se correlacionan con el °SR.

El efecto de la enzima Cel9B sobre el refinado de la pasta, inicialmente caracterizada a través del %IRA y °SR, indica una aceleración en la modificación de la estructura interna y externa de la fibra. La celulosa estudiada incrementa el índice de retención de agua -%IRA- hasta un 13% y la resistencia al drenaje -°SR- hasta un 47% con

respecto al refinado de la pasta inicial, los resultados más acentuados corresponden a 3000 rev. y 4500 rev. (Figura 4-3).

La enzima Cel9B del tipo 1,4-β endoglucanasa de *Paenibacillus barcinonensis*, incrementa la resistencia al drenaje, efecto atribuido a una mayor hidratación y fibrillación (externa - interna) que implican la liberación de fibrillas y producción de microfibrillas, dando como resultado a un aumento de la superficie específica de las fibras refinadas. El incremento del °SR, permite contrarrestar lo manifestado por algunos autores (Pomier, 1989) que aseguran mejoras en la drenabilidad de las pastas con la aplicación de celulasas y corroborar resultados con investigaciones previas (García *et al.*, 2002; Kamaya, 1996; Kim *et al.*, 2006; Oksanen *et al.*, 1997).

De acuerdo con los mecanismos de operación del refinado la suspensión fibrosa situada entre el estator y rotor sufre un efecto de cortadura, aplastamiento y fricción entre sí y contra las guarniciones del equipo; el conjunto de estos efectos mecánicos incrementa la resistencia al drenaje por la pérdida de longitud de fibra y formación de finos. Las partículas pequeñas (finos) desprendidas de las capas externas de las fibras son partículas con mayor porcentaje de grupos –OH libres y por consiguiente son partículas más hidrofílicas, estos parámetros poseen decisiva influencia en la resistencia al desgote. De esta manera los resultados sugieren lanzar la hipótesis de que Cel9B causa mayor formación de finos y acortamiento de fibra sin embargo el análisis de longitud de fibra (Tabla 4-1) realizado en el equipo Kajaani no manifiesta ningún cambio entre la pasta inicial y la tratada enzimáticamente en los mismos puntos de refinado.

Tabla 4-1. Efecto de aplicación Cel9B sobre la longitud de fibra

	PFI (rev)	D1	Q1	Q2	Q3	D9	Av
PI	0	0,14	0,31	0,54	0,73	0,89	0,54
	1500	0,14	0,31	0,55	0,74	0,90	0,54
	3000	0,14	0,32	0,56	0,76	0,92	0,56
	4500	0,15	0,33	0,56	0,77	0,94	0,57
Cel9B	0	0,15	0,32	0,53	0,72	0,88	0,54
	1500	0,14	0,31	0,54	0,76	0,92	0,55
	3000	0,15	0,33	0,56	0,76	0,93	0,56
	4500	0,16	0,33	0,57	0,77	0,94	0,57

* Q: cuartil D: decil Av: longitud media aritmética

La estructura, longitud media y las características superficiales de la fibra pueden ser deducidas a través del grado de drenabilidad, como una indicación general (Dienes *et al.*, 2005), sin embargo es una medida insuficiente para la caracterización del refinado, el incremento en la drenabilidad no significa un mejoramiento en el refinado, para

llegar a esta conclusión es necesario el análisis global de los efectos producidos en las propiedades fisicomecánicas del papel.

La composición química (hemicelulosa, holocelulosa, lignina, grupos funcionales) y la morfología de la fibra condicionan los tratamientos químicos y mecánicos en las diferentes etapas del proceso de producción de pasta - papel y son determinantes en las interacciones o atracciones fisicoquímicas de las fibras en el proceso de formación del papel. La aplicación enzimática realizada en la pasta kraft ECF (*Eucalyptus globulus*) potencia estas interacciones y las cohesiones intrafibrilares - extrafibrilares, la modificación superficial sobre las fibras se refleja en la evolución de las propiedades del papel tras el refinado mecánico en el molino PFI.

Los resultados de las propiedades físicas de resistencia y permeabilidad procedentes del refinado de la pasta inicial [PI], refinado de la pasta tratada con celulasas [Cel9B] y el refinado que incluye la evaluación del procedimiento experimental de la aplicación Cel9B en pastas papeleras [k] se presentan en la Figura 4-4. La confrontación de las propiedades fisicomecánicas permite visualizar de forma general un marcado efecto de la aplicación enzimática sobre las características físicas del papel. Las propiedades de resistencia (estallido, tracción, doble pliegue, desgarro) y permeabilidad (Bendtsen) evolucionan de acuerdo al número de revoluciones aplicadas en el molino PFI; a nivel general, la curva de refinado para Cel9B tiene un comportamiento similar a los refinados PI y k, con el distintivo o particularidad de obtener una mayor respuesta al trabajo mecánico realizado en la operación de refinado, de esta manera con la aplicación de Cel9B se obtiene un efecto de biorefinado.

Tal como se observa en la Figura 4-4, la aplicación de Cel9B permite obtener papeles más densos con respecto a la pasta inicial [PI]; los mecanismos de cohesión fibra-fibra se fortalecen causando resultados positivos en la caracterización de las propiedades físicas de las hojas de papel obtenidas en el equipo Rapid-Köthen a partir de las diferentes pastas refinadas. El índice de tracción, estallido, desgarro y permeabilidad son las propiedades de resistencia más destacables en la aplicación de Cel9B con respecto a la pasta inicial y al tratamiento control. Los resultados también indican influencia de las variables operacionales del tratamiento control [k] en las propiedades fisicomecánicas, concretamente en la permeabilidad Bendtsen.

El análisis de la permeabilidad Bendtsen destaca la acción enzimática de la celulasa Cel9B sobre las fibras celulósicas, la resistencia al paso de flujo del aire incrementa notablemente con mayor efecto a 3000 rev. y 4500 rev. (variaciones superiores al 50% con respecto a una pasta refinada sin tratamiento enzimático [PI]).

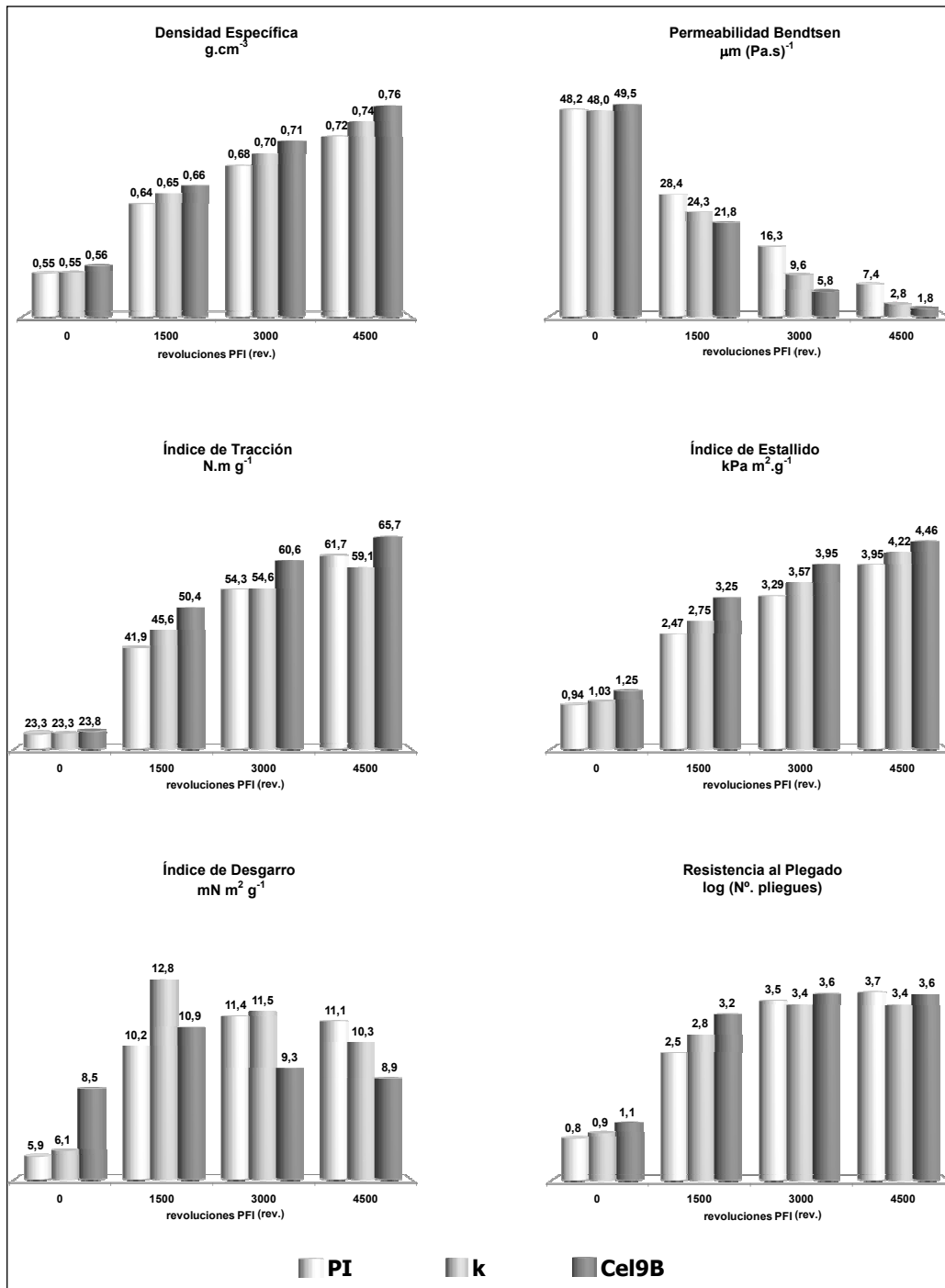


Figura 4-4. Evolución de propiedades fisicomecánicas del papel en el refinado de la pasta ECF [PI], tratamiento control [k] y tratamiento enzimático [Cel9B]

La relación entre la permeabilidad Bendtsen con la densidad específica del papel y el °SR presentada en la Figura 4-5 permite deducir el efecto de Cel9B; la hidrólisis enzimática causa una reducción del espacio interfibrillar debido a la generación de enlaces fibra-fibra, de esta forma la compactación en la estructura del papel y formación de nuevos enlaces reducen el paso al flujo aire (Bendtsen), a menor porosidad mayor resistencia a la permeabilidad.

Cel9B acelera los efectos secundarios sobre las propiedades del papel; la tendencia de las curvas Cel9B y PI en la representación de la permeabilidad con la densidad (Figura 4-5a) y permeabilidad con el grado Schopper-Riegler (Figura 4-5b) es equivalente o tienen un comportamiento análogo, sin embargo se resalta los incrementos obtenidos con la aplicación de Cel9B. En el refinado convencional se consigue el papel más cerrado (mayor densidad) a 4500 rev., y con la acción de Cel9B este valor es posible conseguirlo a 3000 rev. (Figura 4-5a). De igual forma se observa que la resistencia a la permeabilidad de la curva Cel9B sobrepasa los límites generados por el refinado de la pasta inicial [PI].

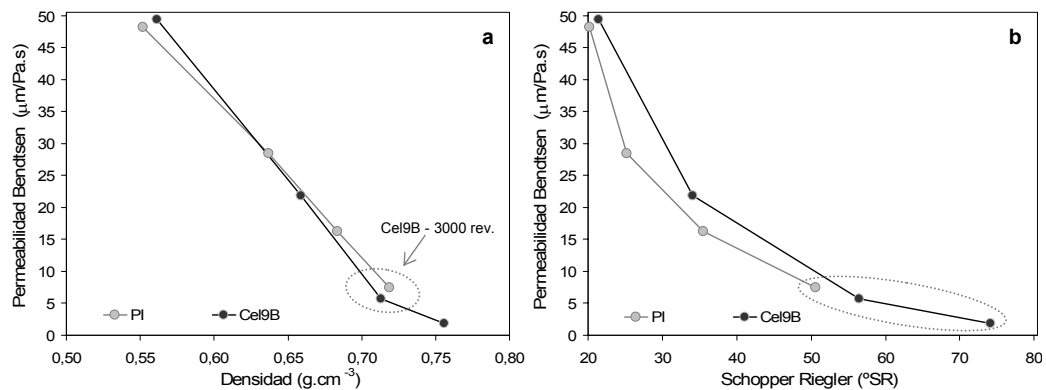


Figura 4-5. Evolución de la permeabilidad Bendtsen con respecto a la densidad específica (a) y grado Schopper-Riegler -°SR- (b)

La optimización de la técnica de refinado busca producir el máximo cambio en las propiedades de la pasta para un valor específico en el desgote -Schopper Riegler- (Smook, 2002); con la aplicación de Cel9B este valor específico de °SR se consigue a menor número de revoluciones; con base a los resultados obtenidos, para alcanzar 50 °SR se debe refinar la pasta ECF [PI] a 4500 rev., en cambio con la aplicación de la celulasa Cel9B el resultado propuesto se obtendría a 2700 rev.

Para estas propiedades es posible conseguir un ahorro de energía superior a 1500 rev., sin embargo se debe tener en cuenta la influencia de las variables de operación

que intervienen en el proceso de aplicación de Cel9B, esta influencia es analizada con el tratamiento anexo llamado control [k]. En los resultados del tratamiento k se encuentra un descenso de la permeabilidad Bendtsen con respecto a la pasta inicial [PI] (Figura 4-6a), la pasta sometida a las condiciones requeridas por la enzima Cel9B causa interferencia en la permeabilidad, la mayor modificación se encuentra a 3000 y 4500 rev.; la identificación de las variables responsables de esta interferencia conllevan a un estudio adicional que es presentado en el apartado 4.3.4.

La confrontación realizada entre los resultados del tratamiento control y el tratamiento enzimático (Figura 4-6b) indica que la curva k no enmascara la acción de la enzima Cel9B, y en ella se verifica claramente el ahorro de energía que supone la utilización de celulasas en la operación del refinado.

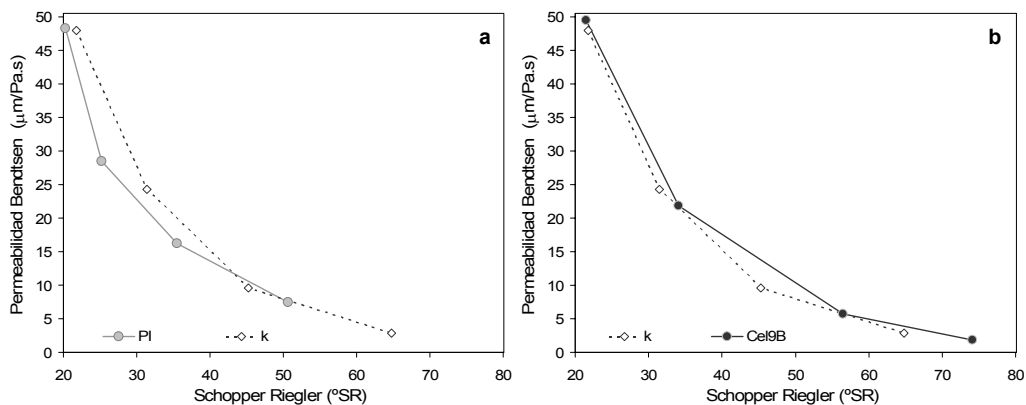


Figura 4-6. Influencia del tratamiento control en la permeabilidad Bendtsen

El análisis del índice de tracción y doble pliegue con relación al grado Schopper-Riegler generan resultados positivos (Figura 4-7). La pasta tratada con la enzima Cel9B permite conseguir mayor resistencia en el papel con menor trabajo mecánico, tal es el caso del índice de tracción donde el máximo valor en la curva de refinado se obtiene a 4500 rev. [61.69 Nm/g] para la pasta inicial y con la aplicación enzimática este máximo se alcanza a 3000 rev. [60.57 Nm/g] (Figura 4-7a); el desarrollo del índice de tracción se atribuye principalmente a la generación de enlaces y por tanto a la fibrillación interna e hinchamiento de la fibra.

La modificación adicional de la morfología de la fibra con la aplicación de la enzima Cel9B también favorece la formación del papel y confiere homogeneidad a la estructura fibrosa, estos efectos contribuyen a la resistencia; concretamente la buena formación del papel se suele relacionar directamente con la resistencia al plegado

(Casey, 1980; Torres López, 1988). De acuerdo a los resultados, la celulasa Cel9B proporciona mayor resistencia a la rotura del papel mediante este ensayo de fatiga a menor número de revoluciones. En la curva correspondiente a PI la mayor resistencia al plegado se consigue a 4500 rev., con la aplicación enzimática es posible disminuir la cantidad de energía aplicada en el molino PFI (Figura 4-7b).

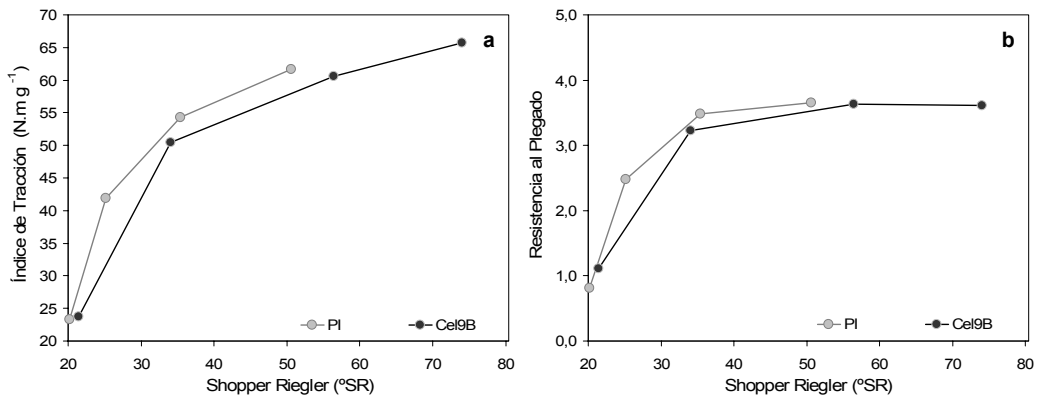


Figura 4-7. Propiedades de resistencia. Índice de tracción (a) y doble pliegue (b) vs. °SR

La evaluación de la Figura 4-8a revela la actuación de la enzima Cel9B como agente catalizador en el refinado de las pastas papeleras, los resultados de las pastas refinadas tras el tratamiento enzimático [Cel9B] siguen la tendencia de las curvas de refinado de la pasta inicial [PI] con un incremento en las propiedades físicas del papel, este efecto permite catalogar a la enzima Cel9B como coadyuvante del refinado. La relación del índice de estallido con la resistencia a rotura por tracción (Figura 4-8a) sustenta que la dosis de enzima aplicada en este estudio actúa como coadyuvante del refinado en la modificación de la pasta ECF, con el cual es posible reducir el número de revoluciones del molino PFI (disminución de energía en el refinado) para conseguir un valor determinado de resistencia en el papel.

El efecto catalizante se observa con mayor claridad en la resistencia al desgarro (Figura 4-8b); con el aumento de la energía de refinado la resistencia al desgarro evoluciona hasta llegar a un punto máximo; en la pasta inicial [PI] la máxima resistencia se obtiene a 3000 rev. y con la aplicación de la celulasa el valor óptimo se consigue con menor energía de refinado. El efecto de Cel9B supone adelantar el valor máximo hacia los 1500 rev., este efecto y el descenso rápido de resistencia podría ser relacionado con cierta fragilidad de la fibra (debilitamiento de la fuerza intrínseca de la fibra) generada por la aplicación de Cel9B. La longitud de fibra es un parámetro que tiene marcada influencia en la resistencia al desgarro, en este estudio la aplicación de

Cel9B no modifica la longitud media aritmética de la fibra por consiguiente se excluye su interferencia en la resistencia al desgarro.

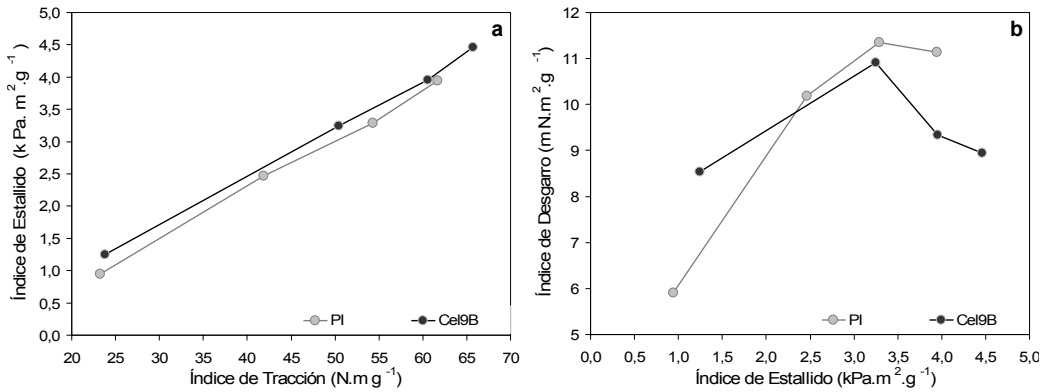


Figura 4-8. Propiedades de resistencia. Índice de estallido, tracción y desgarro

Los resultados de resistencia a la tracción, estallido, plegado y desgarro del tratamiento control [k] comprueban la veracidad de la enzima Cel9B en la pasta kraft ECF (*Eucalyptus globulus*); en la Figura 4-9 se observa la evolución del índice de estallido y plegado con respecto al índice de tracción, la curva k finaliza a 4500 rev. con valores equivalentes a un refinado de 3000 rev. efectuado con la pasta sometida a hidrólisis enzimática (curva Cel9B). La confrontación realizada entre el tratamiento Cel9B y pasta inicial [PI] es válido para demostrar el efecto de un tratamiento enzimático ya que las variables que posiblemente tienen influencia en la aplicación de Cel9B no encubren los efectos enzimáticos (apartado 4.3.4).

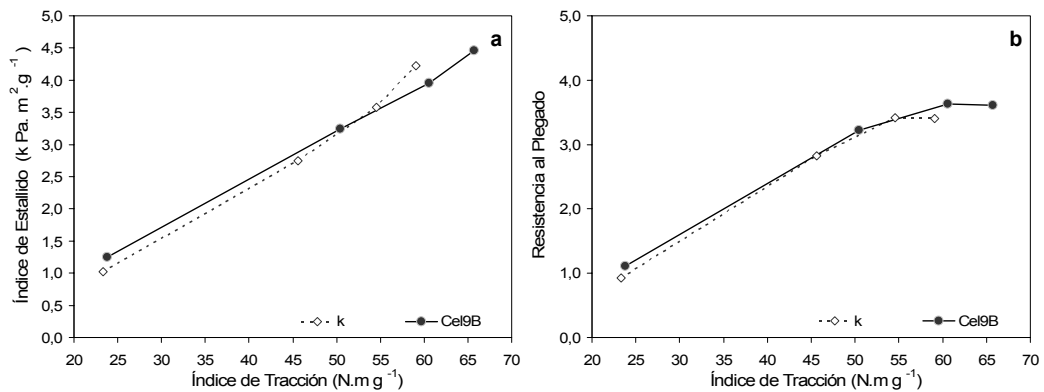


Figura 4-9. Índice de estallido (a) y resistencia al plegado (b) vs. índice de tracción. Aplicación de Cel9B y tratamiento control [k]

En esta investigación, el análisis global de las propiedades físicas de las pastas tratadas con la celulasa Cel9B indica el efecto enzimático sobre la morfología de la fibra, las celulasas aceleran el desarrollo de la resistencia del papel. Las propiedades físicas que más evolucionan con la aplicación de celulasas corresponden a: la permeabilidad Bendtsen, con incrementos en resistencia hasta de un 75%, y en los índices de estallido, tracción y resistencia al plegado los resultados demuestran incrementos situados entre un 32% y 37% con respecto al refinado de la pasta inicial. Los resultados obtenidos en las propiedades fisicomecánicas del papel contrastan con lo manifestado por algunos autores, que indican incrementos de la resistencia al drenaje y una disminución en la resistencia a la tracción con la aplicación de endoglucanasas (Oksanen et al., 1997).

4.3.2 Influencia de la enzima Cel9B en la morfología de las fibras

La longitud de fibra, diámetro, espesor de pared, masa lineal entre otras características básicas de las fibras celulósicas, sirven de orientación para predecir comportamientos físicos relativos a la formación del papel; las propiedades del papel están estrechamente relacionadas con las propiedades de las fibras, ellas afectan a la formación y consolidación de la estructura del papel en el proceso de fabricación (García Hortal, 2007); también las propiedades cualitativas relativas a la superficie fibrosa dan información sobre la transformación morfológica de las fibras tras efectuarse tratamientos químicos (pasteado, blanqueo) y mecánicos (desintegración, refinado, secado) necesarios para la obtención, preparación e incorporación como materia prima en los procesos papeleros. Para el caso de las etapas mecánicas como la operación de refino, el análisis superficial de la fibra genera gran interés, la acción mecánica del equipo sobre las fibras puede ser visualizada y estudiada con análisis microscópicos.

De acuerdo a los resultados expuestos en la sección anterior, la enzima Cel9B acelera los efectos del proceso de refinado, la introducción de una etapa biotecnológica previa al refinado de la pasta genera cambios substanciales en la morfología de la fibra, una herramienta fundamental para comprobar tales efectos corresponde al análisis superficial de las fibras con micrografías tridimensionales de alta resolución obtenidas con la técnica de microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM).

En la Figura 4-10 se muestran micrografías que corresponden a la pasta kraft inicial [PI] sin refinar (0 rev.) y refinada a 4500 rev.; el contraste entre las imágenes expuestas (aumentos 500x - 3000x) permite visualizar claramente la acción mecánica

del molino PFI sobre las fibras. La pasta sin refinar no presenta modificación superficial en las paredes externas de la fibra, en ella no se aprecia una fibrillación externa (Figura 4-10A) por consiguiente la formación del papel carece de uniones interfibrilares (Figura 4-10C) generando una superficie abierta, porosa y de acuerdo a los resultados experimentales, un papel con poca resistencia. Como contraste, en la pasta refinada, el tratamiento mecánico modifica la estructura externa de las fibras e incrementa la superficie específica debido a la liberación de fibrillas (fibrillación externa) e hidratación (Figura 4-10B), estos efectos favorecen la formación de enlaces y permiten obtener un papel más compacto, denso y resistente (Figura 4-10D), la modificación morfológica de las fibras se encuentra directamente relacionada con las propiedades físicas de la pasta ($^{\circ}\text{SR}$ - $\% \text{IRA}$) y son un indicador de la caracterización fisicomecánica de los papeles obtenidos.

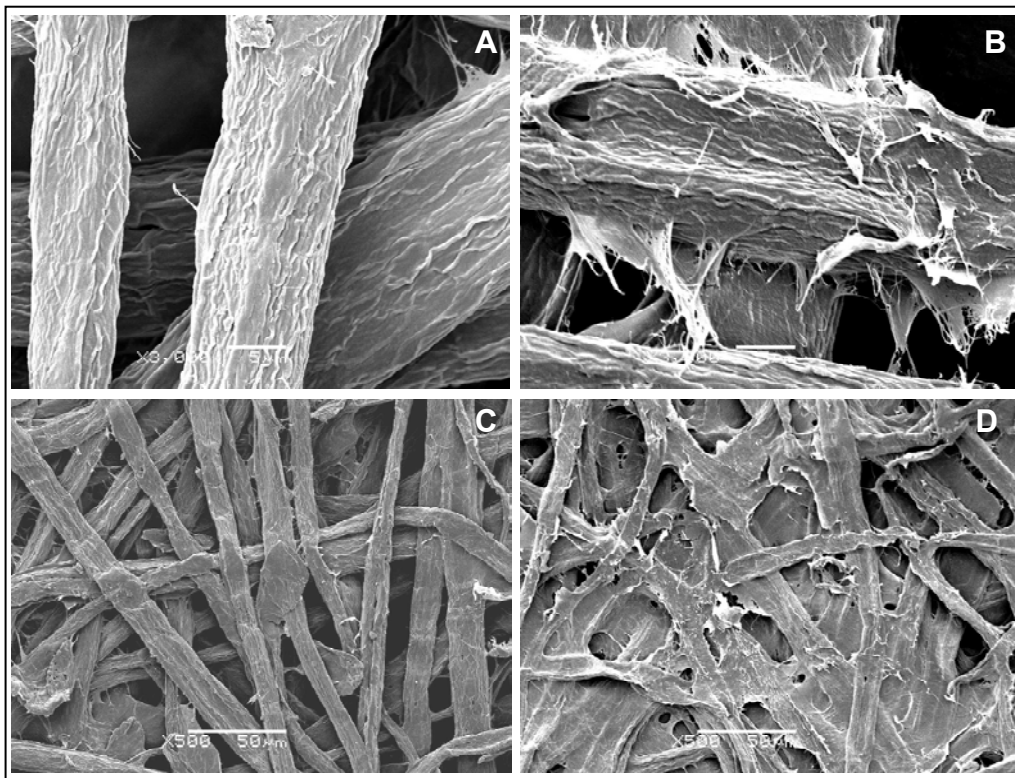


Figura 4-10. Micrografías de microscopía SEM de pasta ECF inicial [PI]: A - C pasta sin refinar [0 rev.]; B - D pasta refinada [4500 rev.]

La transformación que efectúa la aplicación de celulasas en las fibras se puede observar en la Figura 4-11, las micrografías revelan que la hidrólisis enzimática acelera los cambios morfológicos en las fibras como flexibilidad, rotura y

desprendimiento de las paredes externas generando fibrillación externa (fibra deshilachada) que potencian la capacidad de enlace entre fibras contiguas, y la uniformidad en la distribución de fibras permite obtener una superficie fibrosa más cerrada y compacta, efectos visibles en la micrografía Cel9B [3000 rev.]. Estas imágenes proporcionan una explicación al incremento de la resistencia al paso del flujo del aire en las pastas tratadas enzimáticamente y a las características físicas del papel relacionadas con el área enlazada (índices de tracción y estallido). El contraste entre las micrografías correspondientes a PI [0 rev.] y Cel9B [0 rev.] no revelan efectos significativos en la modificación superficial y fibrillación, de esta forma se concluye que Cel9B por si sola no causa un efecto de refinado, y no reemplaza la operación mecánica, el efecto de biorefinado se refiere a la acción conjunta entre el tratamiento mecánico y biológico.

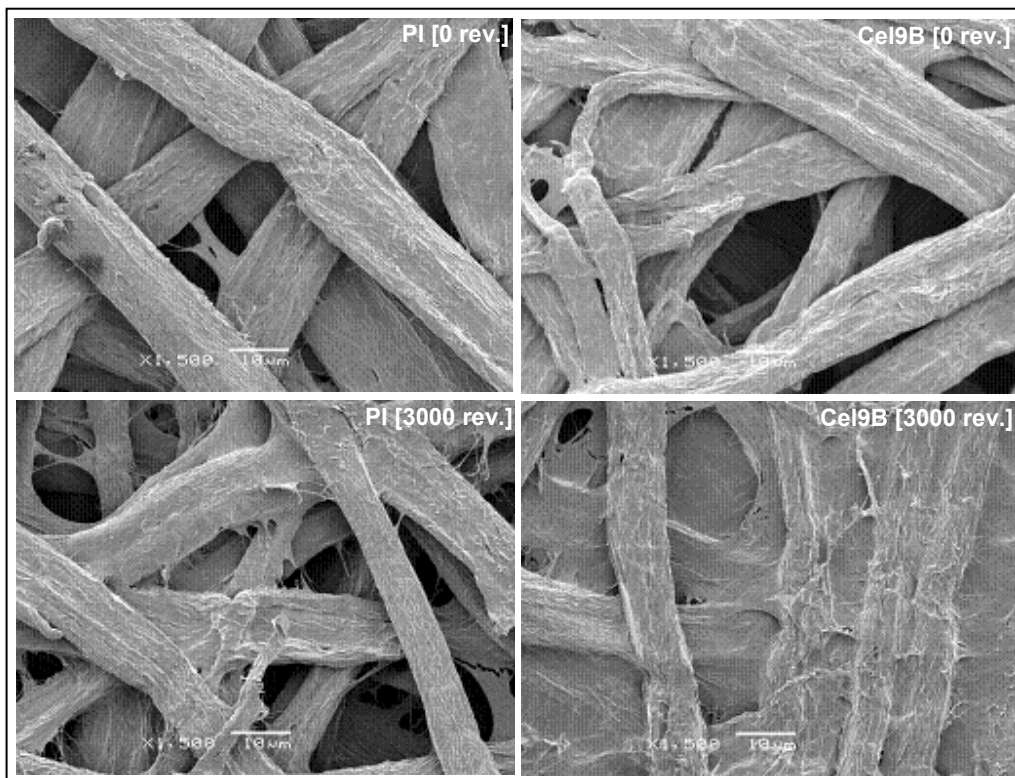


Figura 4-11. Micrografías de microscopía SEM de pasta ECF refinada con tratamiento enzimático [Cel9B] y pasta inicial [PI].

Para mayor ampliación de la hidrólisis enzimática, en las micrografías de la Figura 4-12 se observa uno de los cambios más destacables en la morfología de la fibra que corresponde a la fibrillación externa, este efecto es claramente visualizado en la

imagen de microscopía óptica (Figura 4-12A) donde se resalta la liberación de fibrillas y microfibrillas. Los fenómenos observados en las imágenes confirman que la acción de Cel9B conjuntamente con los esfuerzos mecánicos que intervienen en la operación de refinado son los responsables del desgarro y deslaminación de las paredes externas de la fibra, como consecuencia se potencian los efectos primarios y secundarios del refinado generando gran incremento de los puntos de contacto para la formación de enlaces fibra - fibra, por consiguiente en la formación y secado de las hojas de papel se obtiene una superficie compacta, cerrada y más densa (Figura 4-12B - micrografía SEM). Las observaciones realizadas en la superficie fibrosa respaldan los valores obtenidos en la caracterización fisicomecánica del papel, Cel9B acelera el efecto del refinado, modifica la morfología de las fibras y confiere propiedades de resistencia.

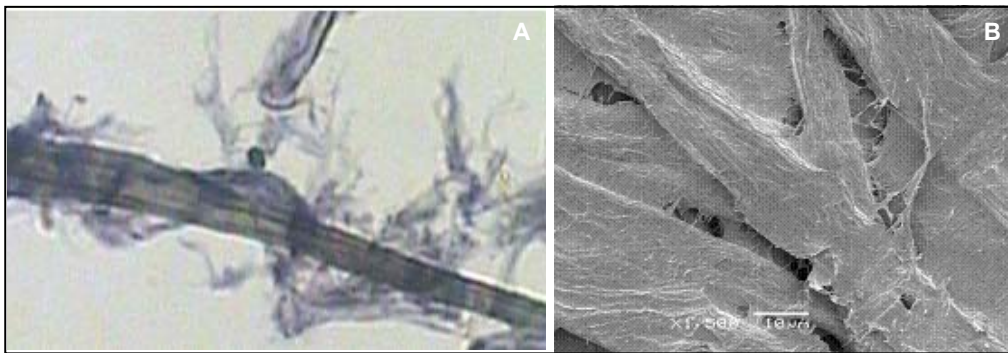


Figura 4-12. Micrografías de pasta ECF con tratamiento enzimático [Cel9B] y refinado a 4500 rev. A: microscopía óptica. B: Microscopía SEM

4.3.3 Capacidad de hidrólisis de la celulasa Cel9B

En los mecanismos de hidrólisis catalítica, las celulasas producen la rotura del enlace β -1,4-glucosídico del polímero celulósico, generando oligosacáridos de longitudes variables. El análisis cualitativo de cromatografía en capa fina (TLC) sobre los efluentes de los tratamientos enzimáticos (lejías) permite detectar la capacidad de hidrólisis de la enzima Cel9B sobre el sustrato de celulosa (pasta ECF) para una incubación de 2500 IU/kg p.s durante una hora de hidrólisis a 45 °C.

El cromatograma presentado en la Figura 4-13 utiliza como patrón una solución de glucosa - celobiosa [G] y las muestras inyectadas corresponden a los efluentes de los tratamientos enzimáticos. El revelado del cromatograma indica la presencia de celobiosa y celotriosa como productos de biodegradación; de acuerdo a la intensidad de las marcas se puede observar trazas de glucosa y sin detección de ningún tipo de

celooligosacáridos (celotetraosa, celopentaosa). La generación de oligosacáridos demuestra que la celulasa Cel9B rompe al azar los enlaces internos β -(1,4) de la molécula de celulosa y que actúan preferentemente en las regiones amorfas.

Se confirma la especificidad de la enzima por el sustrato celulósico, y los resultados inducen a relacionar la biodegradación de la pasta ECF con un posible ablandamiento de la fibra, permitiendo que el trabajo mecánico realizado por el molino PFI sea más eficiente para una dosis de aplicación Cel9B de 2500 IU/kg p.s. La fibrillación externa y la evolución de las propiedades fisicomecánicas del papel demuestran la influencia de la celulasa sobre el refinado de la pasta kraft y es importante mencionar que la dosis de enzima aplicada en la experimentación modifica la fibra sin ocasionar pérdidas en el grado de polimerización de la celulosa; tras la hidrólisis enzimática el valor de la viscosidad específica no presenta ninguna alteración con respecto al valor inicial de la pasta ECF sin tratamiento enzimático (858 mL/g). En contraste a otros estudios en que la aplicación de celulasas causa decremento en la viscosidad inclusive a bajas dosis de aplicación, y es causa del descenso en las propiedades de resistencia como el índice de tracción (Pere et al., 1995; Rahkamo et al., 1996). La dosis enzimática es un factor importante para limitar la degradación celulósica y con esta evitar pérdidas drásticas en la resistencia de las pastas.

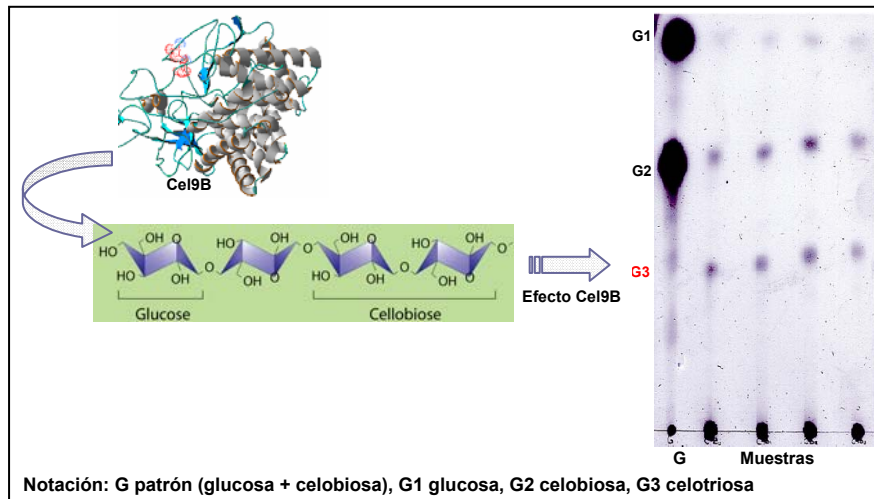


Figura 4-13. Análisis de cromatografía de capa fina (TLC) - productos liberados en efluentes de los tratamientos enzimáticos con "Cel9B" en pasta ECF.

El valor constante de la viscosidad específica de la pasta ECF tras el tratamiento enzimático, genera hipótesis sobre la accesibilidad de las celulasas a los componentes celulósicos para causar una modificación interna de la celulosa,

concretamente referenciados a la cristalinidad. Las estructuras de celulosa presentan conformaciones o zonas moleculares altamente ordenadas, estables y resistentes a la penetración de disolventes, las zonas amorfas son más susceptibles a las reacciones químicas, un tratamiento biológico o químico puede alterar la relación de las zonas cristalinas y amorfas.

La técnica de difracción de rayos X (XRD) permite calcular el porcentaje de cristalinidad (CrI) y con estos resultados determinar la influencia del tratamiento enzimático sobre las pastas kraft. En la Figura 4-14 se presenta el difractograma XRD donde se hace la confrontación entre la pasta inicial y la pasta sometida al tratamiento enzimático con Cel9B, los resultados demuestran que no hay variación en los índices de cristalinidad -CrI (%)- y permiten concluir que la modificación morfológica encontrada en este estudios no implica la modificación interna de la celulosa.

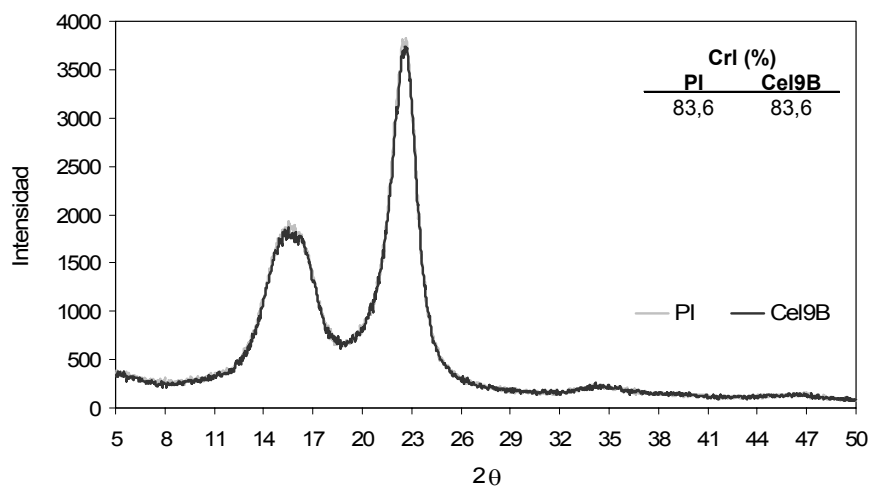


Figura 4-14. Difractograma XRD de la pasta kraft ECF. Tratamiento enzimático [Cel9B] y pasta inicial [PI]

4.3.4 Estudio del tratamiento control

El tratamiento anexo llamado “control [k]”, se realiza con el objetivo de verificar si la pasta sufre algún cambio al ser sometida a las condiciones requeridas por la enzima, tales como pH, temperatura, consistencia, tiempo y tampón.

Los resultados de la caracterización final de la pasta y papel presentados en la sección 4.3.1 indican la influencia del tratamiento control [k] sobre la permeabilidad Bendtsen en los refinados correspondientes a 3000 rev. y 4500 rev.; es importante

determinar las causas que influyen en la respuesta del control ya que pueden enmascarar los resultados de la acción enzimática.

En el tratamiento “control”, la pasta está sometida a una influencia química (tampón fosfato), térmica (45 °C) y operacional (desintegración, filtración, lavado), estas variables pueden interferir sobre las propiedades de la pasta ECF. Inicialmente se especula sobre una posible influencia química; la presencia de reactivos químicos altera el pH de la suspensión fibrosa e interfiere en la operación de refinado. En la literatura se encuentra que la variación del pH modifica el potencial electrocinético y la tensión superficial, mayores niveles de pH (superiores a 7.0) provocan un refinado más rápido por el hinchamiento de la celulosa en medio alcalino (Casey, 1980; Smook, 2002).

El procedimiento experimental utilizado en la aplicación de celulasas requiere un pH 6.0 en la suspensión fibrosa, el medio es de carácter ácido y es posible que dificulte el hinchamiento de las fibras, por otro lado la presencia del fosfato de sodio como solución tampón puede actuar como secuestrante de cationes y alterar el proceso del refinado. Para eliminar la influencia química en el tratamiento control se decide reemplazar la solución tampón (fosfato) por ácido sulfúrico, el pH de la suspensión fibrosa y las variables del proceso se mantienen fijas, de acuerdo al procedimiento experimental de aplicación enzimática en pastas (Figura 4-2) se realiza el tratamiento control para un punto de refino equivalente a 3000 rev.

La confrontación del tratamiento control con ácido sulfúrico [k-AS] y el tratamiento control realizado con el tampón fosfato de sodio [k] (Tabla 4-2) indican que las propiedades de resistencia (desgarro, plegado, estallido) no varían significativamente, y se destaca el valor obtenido en la permeabilidad Bendtsen, el tratamiento control [k] y [k-AS] incrementan la resistencia a la permeabilidad con respecto al valor de la pasta inicial [PI].

Tabla 4-2. Propiedades fisicomecánicas. Efecto del tratamiento “k” en la pasta ECF

PFI/ 3000 rev.	PI	k	k-AS
<i>Densidad, g cm⁻³</i>	0,68 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,72 ± 0,01
<i>Volumen, cm³ g⁻¹</i>	1,46 ± 0,02	1,43 ± 0,02	1,40 ± 0,03
<i>P. Bendtsen, μm (Pa.s)⁻¹</i>	16,3 ± 0,4	9,6 ± 0,2	8,2 ± 0,3
<i>I. Desgarro, mN m² g⁻¹</i>	11,36 ± 0,51	11,54 ± 1,01	11,42 ± 0,39
<i>I. Plegado, log(Nº. Pliegues)</i>	3,49 ± 0,22	3,41 ± 0,17	3,35 ± 0,13
<i>I. Estallido, kPa m² g⁻¹</i>	3,29 ± 0,12	3,57 ± 0,19	3,76 ± 0,10

Estos resultados permiten descartar la influencia del fosfato de sodio en la operación de refinado; para reforzar esta suposición se realiza un nuevo tratamiento que consiste en eliminar totalmente el efecto del pH y la interferencia de un reactivo químico (fosfato de sodio, ácido sulfúrico) en el refinado de la pasta y en la modificación de la permeabilidad. La presencia del agente químico en el tratamiento control se excluye al reemplazar la solución tampón (fosfato de sodio) por agua destilada [k-W]. Las propiedades fisicomecánicas de este tratamiento [k-W] indican un comportamiento similar a los resultados expuestos en la Tabla 4-2; específicamente en la permeabilidad Bendtsen se obtiene un valor equivalente a $8.7 \pm 0.2 \mu\text{m} (\text{Pa}\cdot\text{s})^{-1}$; de esta forma se verifica y concluye que la solución tampón no interfiere en la operación de refinado.

La permeabilidad Bendtsen evoluciona con la energía aplicada en el molino PFI; los efectos primarios como fibrillación externa y la producción de finos son los principales responsables del incremento de la resistencia a la permeabilidad. En este estudio, los análisis de longitud de fibra realizados en la pasta inicial [PI] y pasta control [k] permiten eliminar la influencia de estas variables; los resultados obtenidos en el equipo Kajaani no presentan variación en el porcentaje de finos y en la longitud media aritmética de las fibras.

Excluida la influencia química, la investigación se enfoca a las variables operacionales y térmicas; de acuerdo al esquema presentado en la Figura 4-2, las variables operacionales corresponden a las etapas de desintegración, filtración y lavado. La influencia térmica y operacional de las etapas del proceso es estudiada mediante la modificación del tratamiento control, inicialmente se plantean nuevos tratamientos en los que se cambia el tiempo de residencia de la suspensión fibrosa en el baño térmico y la etapa de filtrado-lavado es eliminada; con estas modificaciones se realizan dos ensayos a temperatura constante (45 °C) y ajuste de la consistencia con agua destilada para un tiempo de residencia de la pasta ECF en el baño térmico de 30 min [k-30] y 120 min [k-120].

La Figura 4-15 presenta los resultados de la permeabilidad Bendtsen para cada modificación del tratamiento control. Las pruebas realizadas no difieren significativamente en las propiedades de resistencia (estallido, desgarró y doble pliegue), sin embargo en el análisis de permeabilidad se encuentra que en los procedimientos [k-30] y [k-120] hay una disminución en la resistencia a la permeabilidad comparada con los tratamientos control (k, k-AS, k-W), la eliminación de una de las variables operacionales genera resultados análogos a los obtenidos con

la pasta inicial [PI], de esta forma se concluye que la variación de la permeabilidad se debe principalmente a la operación de filtrado - lavado.

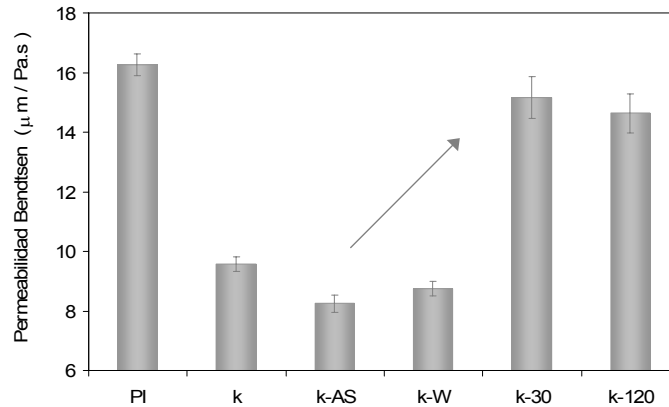


Figura 4-15. Efecto del tratamiento control en pasta ECF. Resultados de Permeabilidad Bendtsen a 3000rev. de: PI (pasta inicial), k (control), k-AS (k - ácido sulfúrico), k-W (k - agua destilada), k-30 (k - 30 min en baño térmico), k-120 (k - 120 min en baño térmico)

La etapa de filtrado - lavado modifican la permeabilidad Bendtsen, los argumentos utilizados para explicar este fenómeno son desconocidos; y se intuye que la operación del lavado causa una eliminación de compuestos inorgánicos y/o residuos sólidos inherentes al proceso de obtención de pasta, es posible que las impurezas adheridas a la pasta influyan en la porosidad del papel.

Para contrastar la anterior hipótesis, se propone realizar un punto de refino en el molino PFI a 3000 rev. con una pasta previamente lavada con agua descalcificada y destilada [L], este procedimiento tiene por objetivo retirar las impurezas adheridas a las fibras. Los resultados del refinado convencional de una pasta lavada [L] son comparados con el tratamiento control [k]; el contraste realizado no presenta variación significativa en las propiedades del papel, y concretamente en la permeabilidad Bendtsen se obtuvo un valor de $8.7 \pm 0.2 \mu\text{m} (\text{Pa.s})^{-1}$, resultado equivalente al tratamiento control; de esta forma se demuestra que la operación de lavado influye sobre las propiedades finales de permeabilidad del papel al seguir el procedimiento experimental propuesto en el tratamiento control.

Para comprobar la posible eliminación de compuestos inorgánicos y/o residuos sólidos se realiza una determinación del contenido en cenizas de la pasta inicial [PI] y pasta lavada [L] con una incineración a elevada temperatura ($575^\circ \pm 25^\circ\text{C}$). En este ensayo no se obtuvo diferencias significativas en la cantidad del residuo sólido de ignición al

realizar un lavado a la pasta inicial; esta técnica indica que no hay remoción de residuos sólidos, de esta manera se intuye que la operación de lavado puede ocasionar un efecto físico sobre las fibras el cual puede variar según la presión de lavado. Al mismo tiempo los resultados sugieren realizar análisis más precisos en la determinación de compuestos inorgánicos como la utilización de técnicas espectroscópicas.

4.3.4.1 Modificación experimental en la aplicación de la enzima Cel9B

En este apartado, se verifica el efecto de la enzima Cel9B en la pasta ECF tras la modificación de la secuencia experimental. Los resultados obtenidos en el estudio del tratamiento control permitieron identificar la etapa de filtrado - lavado como principal causa de la variación en la permeabilidad del papel, así surge un interrogante sobre la actuación de las enzimas: ¿es posible que la aplicación de Cel9B sobre “pastas lavadas” realice mayor efecto en la operación de refinado?; la expectativa a esta incógnita requiere otras pruebas de refinado.

En las nuevas aplicaciones de la celulasa Cel9B en la pasta ECF se mantienen constantes las condiciones de operación requeridas por la enzima (pH, temperatura, tiempo) y con base al procedimiento de aplicación enzimática (Figura 4-2) se realiza los siguientes tratamientos:

- ✓ Cel9B: Aplicación de la enzima Cel9B sin variación de la metodología experimental.
- ✓ Cel9B-SL: Aplicación de la enzima Cel9B con eliminación de la etapa de filtrado y lavado -finalizada la hidrólisis enzimática la pasta tratada pasa directamente a la operación de refinado-.
- ✓ Cel9B-L: Utilización de pasta lavada en la aplicación enzimática.

La evaluación de los efectos ocasionados por la modificación del proceso experimental en la aplicación de la celulasa Cel9B se realiza con la caracterización de las propiedades fisicomecánicas del papel para un refinado correspondiente a 3000 rev. La comparación de los resultados obtenidos (Tabla 4-3) indica que la eliminación de la etapa de lavado tras la finalización de la hidrólisis enzimática [Cel9B-SL] influye significativamente en la resistencia al paso del flujo de aire en la determinación de la permeabilidad Bendtsen.

El incremento de la permeabilidad de Cel9B-SL con respecto a Cel9B y Cel9B-L coincide con el efecto observado en las pruebas del tratamiento control (k-30 y k-120)

y se destaca que este incremento podría significar un mayor volumen específico, sin embargo los resultados no lo manifiestan; al tratarse de una celulasa Cel9B no purificada se intuye que los componentes del preparado enzimático retenidos en el papel pueden influir en la porosidad del papel y la etapa de lavado no influye en la densidad y volumen específico del papel.

Tabla 4-3. Propiedades fisicomecánicas. Aplicación de Cel9B

PFI/ 3000 rev.	Cel9B	Cel9B-SL	Cel9B-L
<i>Densidad, g cm⁻³</i>	0,71 ± 0,01	0,73 ± 0,01	0,72 ± 0,01
<i>Volumen, cm³ g⁻¹</i>	1,40 ± 0,02	1,38 ± 0,03	1,39 ± 0,02
<i>P. Bendtsen, μm (Pa.s)⁻¹</i>	5,8 ± 0,3	8,4 ± 0,3	5,6 ± 0,2
<i>I. Desgarro, mN m² g⁻¹</i>	9,33 ± 0,26	9,21 ± 0,40	9,86 ± 0,33
<i>I. Plegado, log(Nº. Pliegues)</i>	3,63 ± 0,10	3,27 ± 0,14	3,25 ± 0,14
<i>I. Estallido, kPa m² g⁻¹</i>	3,95 ± 0,23	4,04 ± 0,14	3,78 ± 0,16

El tratamiento enzimático realizado con pasta lavada [Cel9B-L] proporciona papeles con menor resistencia al índice de estallido y plegado con respecto a [Cel9B], disminución que puede ser provocada por la pérdida de finos en las dos etapas de lavado (una realizada en la preparación de la pasta inicial y la siguiente en la finalización de la hidrólisis enzimática). Con respecto a la resistencia al desgarro se observa mayor resultado para el tratamiento [Cel9B-L], incremento que también puede ser atribuido al porcentaje o contenido de los finos.

Este estudio permite asegurar que la aplicación de la enzima Cel9B sobre las fibras celulósicas es efectiva, y de acuerdo a la secuencia experimental que se realice se puede obtener pequeñas variaciones en las propiedades de resistencia. Los resultados presentados en la Tabla 4-3 permiten concluir que la metodología experimental del tratamiento [Cel9B] es la más apropiada, el efecto observado prácticamente es independiente de la interferencia realizada por la etapa de lavado, de esta forma se sustenta que la confrontación entre las curvas de refinado [Cel9B] y [PI] es válida.

4.4 CONCLUSIONES

Los resultados de la caracterización final tras la operación de refinado de las pastas tratadas con las celulasas Cel9B, pastas sometidas a un tratamiento control [k] y las pastas iniciales [PI] indican un incremento en las propiedades fisicomecánicas cuando la pasta es tratada con la enzima Cel9B del tipo β -1,4-endoglucanasa. La confrontación de las diferentes pastas refinadas permite verificar que el tratamiento enzimático implica una modificación tanto en propiedades de la pasta ($^{\circ}$ SR, %IRA - %WRV-) como del papel (densidad, permeabilidad y resistencias al estallido, desgarró, plegado y tracción).

El tratamiento enzimático no altera el grado de polimerización de la pasta ECF, sin embargo se confirma que la especificidad de la enzima Cel9B por el sustrato celulósico genera oligosacáridos de longitudes variables: celobiosa, celotriosa y glucosa, estos productos de biodegradación se relacionan directamente con el ablandamiento de las fibras.

La celulasa Cel9B interfiere en la operación de refinado, incrementa la resistencia al drenaje y la capacidad de hidratación de las fibras, resultados que sugieren deslaminación y/o eliminación parcial de las capas externas de la fibra que como consecuencia mejora la accesibilidad de moléculas de agua a sus capas internas favoreciendo la formación de enlaces secundarios celulosa-agua-celulosa y los mecanismos de cohesión fibra-fibra.

Los resultados son promisorios, la enzima Cel9B actúa como agente catalizador al acelerar la modificación de la pasta en la etapa del refinado, de esta forma las curvas de refinado de la pasta tratada con la enzima Cel9B requieren menos energía mecánica que las refinadas convencionalmente. El resultado más sobresaliente de la aplicación de Cel9B indica que para determinados valores de densidad se obtienen mayores índices de tracción, estallido y resistencia al plegado, y una notable disminución de la permeabilidad Bendtsen; de esta manera es posible la disminución de energía de refinado requerida para alcanzar valores concretos en las propiedades físicas. Así el uso de Cel9B con la dosis estudiada puede generar ahorros en la energía del refinado.

El incremento de las propiedades físicas de los papeles elaborados con las pastas tratadas con la enzima Cel9B permite catalogar a la enzima Cel9B como coadyuvante del refinado y su acción se relaciona directamente con la modificación superficial de las fibras, efectos como la fibrillación externa fueron observados con el análisis de

microscopía óptica y SEM. Las micrografías de las pastas refinadas sin tratamiento y las pastas refinadas con aplicación de Cel9B, permiten reforzar las teorías sobre la influencia enzimática en el refinado de pastas papeleras y que la enzima Cel9B no reemplaza la operación mecánica, el efecto de biorefinado se refiere a la acción conjunta entre el tratamiento mecánico y biológico.

El estudio realizado con el tratamiento control y el análisis global de los resultados admite incorporar el método biotecnológico en el proceso de refinado sin causar modificación en la cristalinidad y en el grado de polimerización de la pasta; de esta manera el efecto enzimático sobre la pasta kraft ECF (*Eucalyptus globulus*) es considerado como una etapa de biorefinado.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

- Akhtar, M., 1994. Biomechanical Pulping of Aspen Wood Chips With 3 Strains of *Ceriporiopsis subvermispora*. *Holzforschung*, 48(3): 199-202.
- Bhat, G.R., Hettmann, J. A., Joyce, T. W., 1991. Novel techniques for enhancing the strength of secondary fiber. *Tappi Journal*, 74(9): 151-157.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5): 355-383.
- Bolaski, W.A. and Gallatin, J.C., 1962. Enzymatic conversion of cellulosic fibers. U.S. pat. 3041246.
- Casey, J.P., 1980. *Pulp and Paper: Chemistry and Chemical Technology*, vol 2. John Wiley & Sons, New York, 1446 pp.
- Cherry, J.R. and Fidantsef, A.L., 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4): 438-443.
- Davies, G. and Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9): 853-859.
- Diehm, R.A., 1942. Process of manufacturing paper. U.S. pat. 2280307.
- Dienes, D., Kemeny, S., Egyhazi, A. and Reczey, K., 2005. Improving the capability of the Schopper-Riegler freeness measurement. *Measurement*, 38(3): 194-203.
- García Hortal, J.A., 2007. *Fibras Papeleras*. Edicions UPC, Barcelona, 243 pp.
- García, O., Torres, A.L., Colom, J.F., Pastor, F.I.J., Diaz, P. and Vidal, T., 2002. Effect of cellulase-assisted refining on the properties of dried and never-dried eucalyptus pulp. *Cellulose*, 9(2): 115-125.

- ISO-534:1995 Paper and board - Determination of thickness, density and specific volume.
- ISO-536:1995 Paper and board - Determination of grammage.
- ISO-1924:1994 Paper and board - Determination of tensile properties. Part 1: Constant rate of loading method.
- ISO-1974:1990 Paper - Determination of tearing resistance (Elmendorf method).
- ISO-2758:2001 Paper - Determination of bursting strength.
- ISO-5263:2004 Pulps - Laboratory wet disintegration. Part 1: Disintegration of chemical pulps.
- ISO-5264:2002 Pulps - Laboratory beating. Part 2: PFI mill method.
- ISO-5267:1999 Pulps - Determination of drainability. Part 1: Schopper-Riegler method.
- ISO-5269:2004 Pulps - Preparation of laboratory sheets for physical testing. Part 2: Rapid-Köthen method.
- ISO-5351:2004 Pulps - Determination of limiting viscosity number in cupri-ethylenediamine (CED) solution.
- ISO-5626:1993 Paper - Determination of folding endurance.
- ISO-5636:1992 Paper and board - Determination of air permeance (medium range). Part 3: Bendtsen method.
- ISO-23714:2007 Pulps - Determination of water retention value (WRV).
- Jackson, L.S., Heitmann, J.A. and Joyce, T.W., 1993. Enzymatic Modifications Of Secondary Fiber. *Tappi Journal*, 76(3): 147-154.
- Kamaya, Y., 1996. Role of endoglucanase in enzymatic modification of bleached kraft pulp. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(6): 549-553.
- Kim, H.J., Jo, B.M. and Lee, S.H., 2006. Potential for energy saving in refining of cellulase-treated kraft pulp. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 12(4): 578-583.
- Kirk, O., Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C., 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4): 345-351.
- Leatham, G.F., Myers, G.C. and Wegner, T.H., 1990. Biomechanical pulping of aspen chips - Energy savings resulting from different fungal treatments. *Tappi Journal*, 73(5): 197-200.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Willem, H.Z. and Pretorius, I.S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 66(3): 506-577.

- Mansfield, S.D., De Jong, E., Stephens, R.S. and Saddler, J.N., 1997. Physical characterization of enzymatically modified kraft pulp fibers. *Journal of Biotechnology*, 57(1-3): 205-216.
- Mansfield, S.D. and Saddler, J.N., 1999. Sheet properties of Douglas-fir kraft pulp after selective treatments of different fibre length fractions with cellulases. *Journal of Pulp and Paper Science*, 25(3): 84-89.
- McCarter, J.D. and Withers, S.G., 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 4(6): 885-892.
- Merkblatt-IV/33/57, Bestimmung des Wasserückhatevermögens von Zellstoffen.
- Milichovsky, M. and Adamkova, G., 1996. Kinetic evaluation of the hydration processes during pulp beating and refining. *Cellulose Chemistry and Technology*, 30(1-2): 151-160.
- Oksanen, T., Pere, J., Buchert, J. and Viikari, L., 1997. The effect of *Trichoderma reesei* cellulases and hemicellulases on the paper technical properties of never-dried bleached kraft pulp. *Cellulose*, 4(4): 329-339.
- Pala, H., Pinto, R., Mota, M., Duarte, A.P. and Gama, F.M., 2001. Enzymatic upgrade of old paperboard containers. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(4-5): 274-279.
- Percival Zhang, Y.H., Himmel, M.E. and Mielenz, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24(5): 452-481.
- Pere, J., Siikaaho, M., Buchert, J. and Viikari, L., 1995. Effects of purified *Trichoderma* cellulases on the fiber properties of kraft pulp. *Tappi Journal*, 78(6): 71-78.
- Pommier, J.-C., Fuentes, J.-L. and Goma, G., 1989. Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry. Part 1. The basic laboratory work. *Tappi Journal*, 72(6): 187-191.
- Rahkamo, L., Siika-Aho, M., Vehviläinen, M., Dolk, M., Viikari, L., Nousiainen, P. and Buchert, J., 1996. Modification of hardwood dissolving pulp with purified *Trichoderma reesei* cellulases. *Cellulose*, 3(1): 153-163.
- Smook, G.A., 2002. *Handbook for Pulp & Paper Technologists*. Angus Wilde Publications, Vancouver, 425 pp.
- Stork, G., Pereira, H., Wood, T. M., Dusterhoft, E. M., Toft, A., Puls, J., 1995. Upgrading Recycled Pulps Using Enzymatic Treatment. *Tappi Journal*, 78(2): 79-88.
- Tappi-322, cm-01 Fiber length of pulp by projection.
- Teeri, T.T., 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15(5): 160-167.

Torres López, A.L., 1988. Últimos avances en la tecnología del refinado. Introducción al refinado: Aspectos generales. Tecnología Papelera E.T.S.E.I.A.T. Universidad Politécnica de Cataluña, Terrassa.

Yerkes, W.D., 1968. Process for the digestion of cellulosic material by enzymatic action of *Trametes suaveolens*. U.S. pat. 3406089.

CAPÍTULO 5.

Evaluación de la celulasa Cel48C, sinergismo endo-exo (Cel9B + Cel48C) en la pasta ECF y efecto de biorefinado con Cel9B en la pasta TCF

La endocelulasa Cel9B actúa como coadyuvante del refinado en las pastas kraft ECF y TCF de Eucalyptus globulus, la efectividad de la enzima Cel9B sobre el sustrato celulósico permite obtener un biorefinado en dos tipos de pastas, revelando un gran potencial para ser aplicable en otros tipos de fibras para la obtención de papeles especiales con menor energía de refinado. El efecto de biorefinado puede ser favorecido con tratamientos combinatorios entre celulasas endo-exo; ya que en la naturaleza la degradación de la celulosa se efectúa por un mecanismo sinérgico, principalmente entre enzimas endoglucanasas, exoglucanasas y celobiosas, igualmente con una aplicación combinada de enzimas podría obtenerse mayor efecto de biorefinado que el obtenido con Cel9B. En este sentido se evalúa el posible efecto sinérgico endo-exo en la pasta kraft ECF con la celulasa Cel9B y una celulasas Cel48C que corresponde a una enzima de topología estructural a una exoglucanasa. El efecto sinérgico se obtendría si existe un grado de actividad superior a la suma de los efectos individuales de Cel9B y Cel48C. Inicialmente la aplicación de la enzima Cel48C en la pasta ECF modifica ligeramente las propiedades del %SR, %IRA y el índice de estallido; y los tratamientos endo-exo [Ce9B+Cel48C] no revelan un efecto superior al biorefinado conseguido con la enzima Cel9B.

5.1 INTRODUCCIÓN

La aplicación de enzimas son una fuente potencial para obtener modificaciones en las propiedades de las pastas papeleras (Oksanen et al., 1997). Las enzimas hidrolíticas como las celulasas actúan sobre el área superficial de las fibras y en las capas

internas que constituyen a las fibras celulósicas (Suurnakki et al., 2003); su efectividad permite ser aplicada en los sistemas papeleros para la obtención de papeles especiales con menor consumo de energía en la etapa de refinado (Cadena et al., 2007; Cadena et al., 2008); el tipo de celulasa, dosis, medio de aplicación y tipo de fibra celulósica condicionan la hidrólisis de la celulosa (Pere et al., 1995) y por consiguiente su aplicación enfocada a la operación del refinado para modificar la drenabilidad de las pastas en la formación del papel (Dienes et al., 2005), mejorar la resistencia (Dienes et al., 2004; Oksanen et al., 2000; Pala et al., 2002), compensar los efectos de cornificación (García et al., 2002) y reducir los consumos de energía en el proceso de fabricación (Bhardwaj et al., 1996). En las aplicaciones realizadas para modificar las fibras celulósicas se encuentra que las endoglucanasas (EG I y II) producen una eficiente liberación de azúcares en comparación a las exoglucanasas (CBH I y II) y generan pérdidas en las propiedades fisicomecánicas del papel (Oksanen et al., 1997; Pere et al., 1995).

Las celulasas son catalizadores proteicos que hidrolizan la celulosa, generalmente son clasificadas según su modo de acción en la ruptura de los enlaces β -(1-4) glucosídicos de la celulosa; una hidrólisis completa de la celulosa requiere la interacción de las endoglucanasas, exoglucanasas y celobiasas (Lynd et al., 2002) existiendo un sinergismo en la degradación del sustrato celulósico (Henrissat, 1994), este fenómeno se refiere a la acción combinada de dos o más enzimas que da lugar a un grado de actividad superior a la suma de sus acciones individuales. En las celulasas se han descrito un sinergismo endo-exo entre endoglucanasas y exoglucanasas, sinergismo exo-exo entre exoglucanasas actuando desde extremos reductores y no reductores, sinergismo entre exoglucanasas y β -glucosidasas, sinergismo entre dominios catalíticos y dominios de unión a celulosa de una misma proteína (Lemos et al., 2003; Lynd et al., 2002; Teeri, 1997); el sinergismo resulta ser muy interesante en los complejos enzimáticos capaces de hidrolizar tanto la celulosa amorfa como la cristalina, en este sentido la presencia de una exoglucanasa es fundamental debido a su capacidad para degradar la celulosa cristalina (Boisset et al., 2001; Mansfield et al., 1999). La mezcla enzimática que incluye endoglucanasas y exoglucanasas proporcionan un gran efecto sinérgico endo-exo según investigaciones realizadas sobre la degradación de papel de filtro (Fierobe et al., 2002; Nidetzky et al., 1995; Sánchez et al., 2004).

El efecto sinérgico observado entre celulasas Cel9B (endoglucanasa) y Cel48C (exoglucanasa) de *Paenibacillus barcinonensis* sp. BP-23 (Sánchez et al., 2004) podría ser interesante para realizar aplicaciones en los procesos papeleros, ya que

con la aplicación de la enzima individual Cel9B de *Paenibacillus barcinonensis* se obtiene una etapa de biorefinado que permite la obtención de papeles más resistentes junto con un ahorro de energía en el proceso del refinado (Cadena et al., 2008), con un posible efecto sinérgico se incrementarían los efectos de la etapa de “biorefinado” ya obtenida con la celulasa Cel9B; es así como esta investigación se enfoca a verificar un posible efecto sinérgico sobre pastas papeleras de *Eucalyptus globulus* tras la aplicación de tratamientos combinados Cel9B+Cel48C (sinergismo endo-exo). Igualmente la evaluación de una exoglucanasa (Cel48C) en el refinado permite determinar su efectividad en la modificación de las fibras celulósicas.

El biorefinado se ha observado en pastas kraft ECF, dado que este resultado no garantiza que los tratamientos con la enzima Cel9B causen una respuesta positiva en otro tipo de materia prima, en esta investigación se comprueba su efecto en el refinado de pastas kraft de *Eucalyptus globulus* blanqueadas con una secuencia TCF.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se realizan tratamientos enzimáticos sobre las pastas kraft ECF y TCF de *Eucalyptus globulus*. En la pasta ECF se aplica la celulasa Cel48C de *Paenibacillus barcinonensis*, que presenta homología estructural y de secuencia con las celobiohidrolasas (exoglucanasas) de la familia 48 de glicosil hidrolasas; y el estudio del efecto sinérgico entre las enzimas Cel9B y Cel48C denominado como tratamiento combinatorio endo-exo [Cel9B+Cel48C] se efectúa con las dosis especificadas en la Tabla 5-1. Ambas enzimas clonadas y caracterizadas por miembros del grupo investigador *Enzimas microbianas de aplicación industrial* del Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona.

Tabla 5-1. Condiciones de aplicación enzimática de Cel9B y Cel48C

	Celulasas	
	Cel9B	Cel48C
Dosis, IU/g p.s.	2,5	0,343
pH	6	6
Temperatura, °C	45	45
Tiempo, horas	1	1

Adicionalmente a la aplicación de la enzima Cel48C y tratamiento combinado [Cel9B+Cel48C] se realizan tratamientos con la enzima Cel9B sobre la pasta kraft TCF, para verificar el efecto del biorefinado en una pasta diferente a la ya estudiada (ECF), en estos tratamientos se aplica Cel9B siguiendo la dosis y condiciones de operación descritas en la Tabla 5-1.

La aplicación de la enzima Cel48C, el tratamiento combinado Cel9B+Cel48C y la aplicación de Cel9B se realiza sobre 30 g p.s. siguiendo la secuencia experimental propuesta en materiales y métodos (Capítulo 2.). Adicional a los biotratamientos se realiza un control [k] para verificar si las condiciones de aplicación enzimática modifican la morfología de las fibras celulósicas.

Las pastas sometidas a los tratamientos enzimáticos son refinadas hasta 4500 rev. con intervalos de 1500 rev.; la caracterización de la pasta se realiza con el análisis de viscosidad (ISO-5351), grado Schopper-Riegler -°SR- (ISO-5267), índice de retención de agua -%IRA- (ISO-23714; Merkblatt-IV/33/57); el análisis físico de las hojas de papel incluye la determinación del gramaje (ISO-536), espesor, densidad y volumen específico (ISO-534), y como propiedades físico-mecánicas o de resistencia se determinan el índice de tracción (ISO-1924), índice de estallido (ISO-2758), índice de desgarrado (ISO-1974), resistencia al plegado (ISO-5626) y permeabilidad al aire Bendtsen (ISO-5636).

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Influencia enzimática de “Cel48C” en refinado de las pastas ECF

La evaluación de la resistencia al drenaje (°SR) y el índice de retención de agua (%IRA) (Tabla 5-2) de los tratamientos realizados con la enzima Cel48C indican que esta celulosa no modifica significativamente la morfología de las fibras como el efecto obtenido con la celulosa Cel9B. En la comparación del tratamiento Cel48C con el control [k] no se visualiza incrementos del °SR en todos los puntos de refinado, únicamente en 3000 rev. y 4500 rev. hay una diferencia de 2 y 5 unidades respectivamente, estos valores no son representativos, además si existiera alguna influencia sobre los efectos primarios del refinado también debería modificar la capacidad de hidratación de las fibras, y según los resultados del %IRA el tratamiento Cel48C genera valores equivalentes o inferiores (1500 rev. y 3000 rev.) al control.

No obstante, en el anterior capítulo se mencionó que en el tratamiento control [k] la etapa de lavado del procedimiento experimental interfiere en el refinado modificando las propiedades fisicomecánicas del papel y de la pasta, encontrándose diferencias entre el tratamiento control [k] y el refinado de la pasta inicial [PI], el estudio del tratamiento control también permitió demostrar que el efecto enzimático de la celulasa Cel9B en el refinado es independiente de la etapa de lavado, este estudio admite comparar los tratamientos enzimáticos con la pasta inicial, y en el caso de la enzima Cel9B se estableció un biorefinado en referencia a la pasta inicial como en el control; específicamente la aplicación de la enzima Cel48C en comparación al control no genera incrementos en las propiedades de la pasta, y con respecto a la pasta inicial se presenta una variación máxima del 37% en la resistencia al desgote -°SR- y en el índice de retención de agua -%IRA- las variaciones se ubican alrededor del 7%, estos resultados indican que puede existir una posible actuación de la exocelulasa Cel48C en la modificación de las propiedades superficiales de las fibras celulósicas.

Tabla 5-2. Evaluación de las propiedades físicas de la pasta refinada

PFI/rev.	Shopper-Riegler (°SR)			I. Retención de agua (%IRA)		
	PI	k	Cel48C	PI	k	Cel48C
0	20	21	21	103	105	106
1500	25	31	33	128	135	133
3000	35	45	47	142	147	147
4500	50	64	69	150	166	161

En el desarrollo de la resistencia con el refinado se encuentra que la enzima Cel48C en referencia a la pasta inicial ECF [PI] no modifica significativamente la densidad del papel (Tabla 5-3), es posible que la efectividad de la enzima sobre el sustrato no sea la requerida para realizar una eliminación de parcial de las paredes externas de la fibra y permitir la liberación de fibrillas que posteriormente participarían en la formación de enlaces para densificar el papel. En la determinación de la permeabilidad Bendtsen los refinados de 0 rev. y 1500 rev. indican que los valores obtenidos coinciden con el efecto de la densidad, en estos puntos no se visualiza que la aplicación de Cel48C genere una estructura más cerrada que obstaculice el paso del flujo del aire, en los refinados de 3000 rev. y 4500 rev. se presenta una reducción hasta del 50% en comparación a la pasta inicial indicando que la acción de Cel48C sobre las fibras celulósicas depende de la intensidad del refinado, sin embargo el efecto de Cel48C

queda opacado por el tratamiento control, al no obtener valores diferenciales con este tratamiento.

En las propiedades de resistencia como el índice de estallido se obtiene un incremento significativo de 0.71 kPa.m²/g a 1500 rev. (resultado con una desviación estándar de 0.08 kPa.m²/g), este resultado muestra que Cel48C influye en los efectos del refinado facilitando la formación de enlaces y confiriendo resistencia al papel, no obstante en el índice de tracción hay un descenso de la resistencia a la rotura por carga, únicamente se visualiza un incremento a 1500 rev., dada la disminución de los otros puntos de refinado no se generaliza que la enzima Cel48C beneficie la resistencia a la tracción, esta disminución puede relacionarse con posibles impurezas de la enzima Cel48C cuyas incrustaciones no permiten una óptima formación de enlaces fibra-fibra -esta propiedad se encuentra específicamente vinculada al área de enlace que se incrementa con los efectos de la fibrillación externa e interna tras la operación de refinado-; dado que el índice de estallido si experimenta cambios y su evolución depende del desarrollo de uniones interfibrilares no se puede eliminar la acción de Cel48C sobre el refinado y se mantiene que pueden existir impurezas que interfieran negativamente en el desarrollo de otras propiedades fisicomecánicas.

Tabla 5-3. Propiedades fisicomecánicas de la pasta ECF tratada con la celulasa Cel48C

PFI/rev.	PI				k				Cel48C			
	0	1500	3000	4500	0	1500	3000	4500	0	1500	3000	4500
Densidad, g cm ⁻³	0,55	0,64	0,68	0,72	0,55	0,65	0,70	0,74	0,56	0,65	0,71	0,74
Volumen, cm ³ g ⁻¹	1,81	1,57	1,46	1,39	1,81	1,54	1,43	1,36	1,78	1,53	1,42	1,35
Pb Bendtsen, μm (Pa.s) ⁻¹	48,2	28,4	16,3	7,4	48,0	24,3	9,6	2,8	46,8	22,3	8,8	2,8
I. Desgarro, mN m ² g ⁻¹	5,91	10,19	11,36	11,13	6,12	12,77	11,54	10,32	6,79	13,39	11,18	10,29
R. Plegado, log(Nº.Pliegues)	0,81	2,48	3,49	3,65	0,92	2,83	3,41	3,41	1,12	2,89	3,37	3,53
I. Estallido, kPa m ² g ⁻¹	0,94	2,47	3,29	3,95	1,03	2,75	3,57	4,22	1,22	3,18	3,79	4,09
I. Tracción, Nm g ⁻¹	23,27	41,90	54,30	61,69	23,30	45,63	54,57	59,08	21,54	46,30	50,68	56,38

En la resistencia al plegado, la exocelulasa Cel48C causa una disminución de la resistencia a la rotura en los puntos de 3000 rev. y 4500 rev., coincidiendo con el efecto visualizado en el índice de tracción; generalmente en el desarrollo de la resistencia al plegado tiene gran interferencia la homogeneidad de la estructura fibrosa en el papel -enlaces interfibras-, longitud de fibra, formación de finos secundarios, y en menor escala la fibrillación externa e interna. De acuerdo a los resultados de las propiedades físicas de las pastas (°SR, %IRA) existe una

modificación en la fibra, pero no es suficiente para generar enlaces interfibrilares que permitan obtener papeles con una estructura homogénea, con lo cual estos resultados inducen a declarar que la enzima Cel48C no tiene un efecto equivalente al observado con la enzima Cel9B, su acción como coadyuvante del refinado es descartada. Además la evolución de la resistencia al desgarramiento indica que el punto máximo que se presenta a 1500 rev. en el tratamiento Cel48C es superior al de la pasta inicial, es decir que las uniones interfibrilares en comparación al efecto de la enzima Cel9B no es significativo.

5.3.2 Sinergismo “endo-exo”, aplicación enzimática de Cel9B+Cel48C

El efecto sinérgico existe si la acción combinada de las celulasas Cel9B (endoglucanasa) y Cel48C (exoglucanasa) genera un efecto superior a la suma individual de cada enzima en el refinado. El estudio del sinergismo endo-exo [Cel9B+Cel48C] revela que en la evaluación de la resistencia al desgote (°SR) (Figura 5-1) no se presenta un efecto sinérgico, los resultados de la aplicación Cel9B+Cel48C son análogos al tratamiento realizado con la enzima Cel9B; el efecto combinado endo-exo no presenta resultados relevantes, por consiguiente se descarta que la combinación de las celulasas endo-exo incrementen los efectos del refinado como la fibrillación externa e interna.

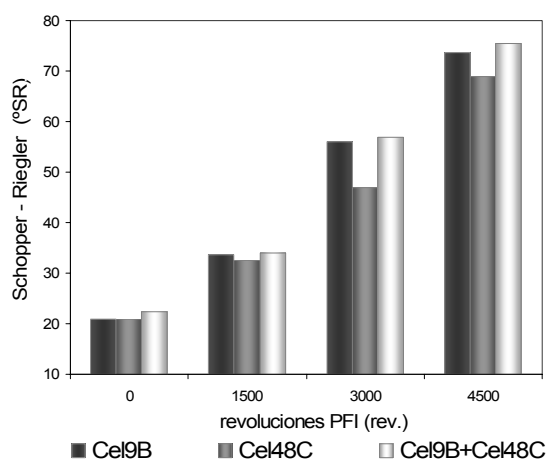


Figura 5-1. Evolución de la resistencia al desgote (°SR) en el refinado de pastas ECF con tratamientos enzimáticos

La capacidad de hidratación de las fibras incrementa con el refinado y con la acción de la enzima Cel9B el efecto es mayor, con un efecto sinérgico se obtendría mayor absorción del agua a la matriz interna de las fibras, pero de acuerdo a los resultados

del índice de retención de agua (%IRA) (Figura 5-2) con la acción individual de Cel48C y la aplicación de Cel9B+Cel48C no se obtienen valores superiores al efecto de Cel9B; a 3000 rev. y 4500 rev. el tratamiento combinado Cel9B+Cel48C genera un índice de retención de agua ligeramente inferior a Cel9B. En las propiedades de la pasta (°SR, %IRA) se descarta un sinergismo que provoque cambios en la morfología de las fibras y potencie los efectos ya obtenidos con la enzima Cel9B; estos resultados sugieren que el efecto sinérgico se podría presentar con una purificación de la enzima Cel48C.

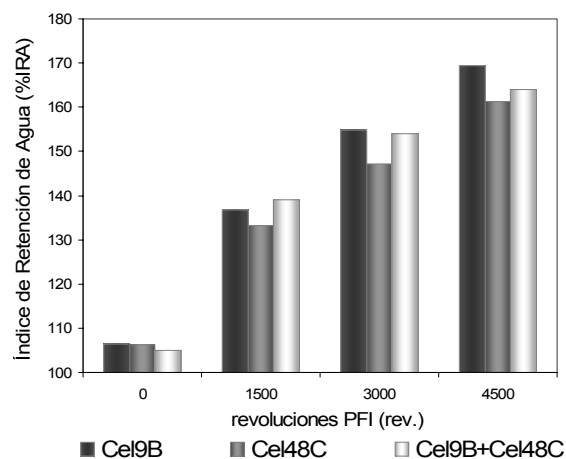


Figura 5-2. Evolución del índice de retención de agua (%IRA) en el refinado de pastas ECF con tratamientos enzimáticos

Las propiedades de la pasta (°SR, %IRA) son un indicador de los fenómenos que realiza el refinado sobre las fibras celulósicas, con estas propiedades ya se deduce que el tratamiento combinado Cel9B+Cel48C no potencia la fibrillación externa como en la aplicación de la enzima Cel9B; la fibrillación externa cumple una importante función en los mecanismos de cohesión entre fibras contiguas, su efecto permite obtener papeles más cerrados o menos porosos. Tal como se observa en la Figura 5-3a la evolución de la permeabilidad Bendtsen con el número de revoluciones indica que el tratamiento Cel9B+Cel48C coincide con los resultados de la enzima Cel9B y, por tanto, no existe la esperada interacción con la enzima Cel48C. Al comparar los efectos enzimáticos en la permeabilidad Bendtsen también se observa que los resultados de Cel48C son superiores al efecto de la enzima Cel9B, con la exocelulasa se obtienen papeles más porosos y consecuentemente con menor densidad (Figura 5-3b); con el sistema combinatorio Cel9B+Cel48C sobresale el resultado de la densidad específica en el punto equivalente a 3000 rev. pero al no presentarse un efecto similar en los otros puntos de refino se descarta el sinergismo.

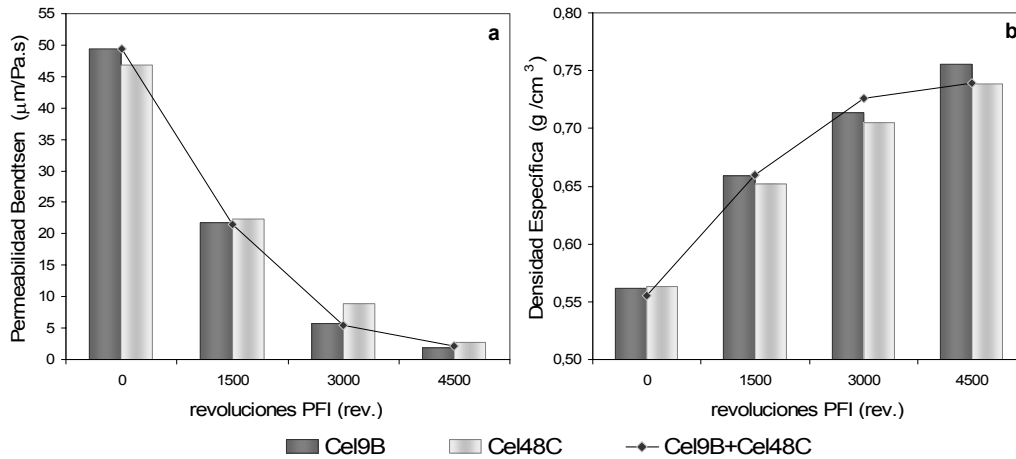


Figura 5-3. Evolución de la permeabilidad Bendsen (a) y densidad específica con respecto al número de revoluciones del molino PFI.

El efecto de los tratamientos enzimáticos sobre las propiedades de resistencia como el índice de estallido y tracción se presenta en la Figura 5-4; la enzima Cel9B que es coadyuvante del refinado tiene una mejor respuesta en la resistencia por presión y carga. La acción de la enzima Cel48C es inferior a Cel9B, y su aplicación requiere mayor energía de refinado para alcanzar un valor específico de resistencia en comparación a la endocelulasa; con el tratamiento endo-exo se visualiza que la curva Cel9B+Cel48C sigue una tendencia superior a las enzimas individuales, esto se debe a los resultados de 0 rev. y 1500 rev. que presentan mayor resistencia al estallido, sin embargo estos valores no tienen relevancia ya que a niveles superiores de refinado se obtienen resultados equivalentes a Cel9B pero con mayor energía de refinado.

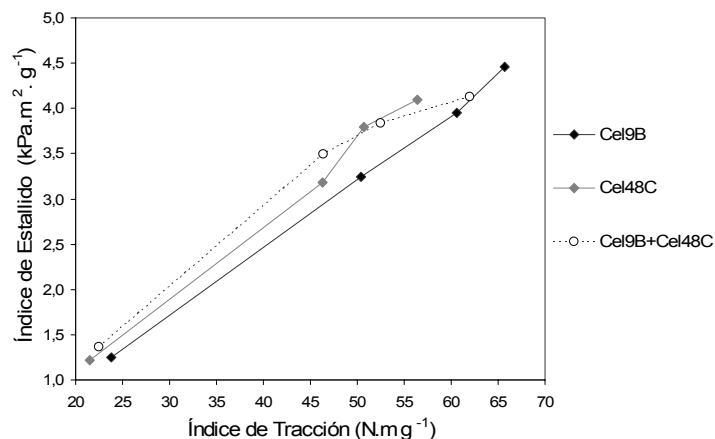


Figura 5-4. Evaluación del índice de estallido con respecto al índice de tracción

En el índice de tracción y resistencia al plegado (Figura 5-5) se observa que el tratamiento combinado [Cel9B+Cel48C] genera papeles con menor resistencia a la tracción, valores inferiores al biorefinado de la enzima Cel9B con igual resistencia al drenaje. Entre Cel9B y Cel9B+Cel48C existe una diferencia máxima de 8.1 Nm/g, este resultado indica una posible inhibición de la endocelulasa con la enzima Cel48C en los efectos del refinado; teóricamente las exocelulasas exhiben acción sinérgica altamente cooperativa en presencia de endoglucanasas, pero en esta aplicación y de acuerdo a la evolución de la resistencia a la tracción y plegado se demuestra que la aplicación enzimática a la dosis estudiada y condiciones operativas (temperatura y pH) no es posible obtener una etapa de biorefinado superior a Cel9B.

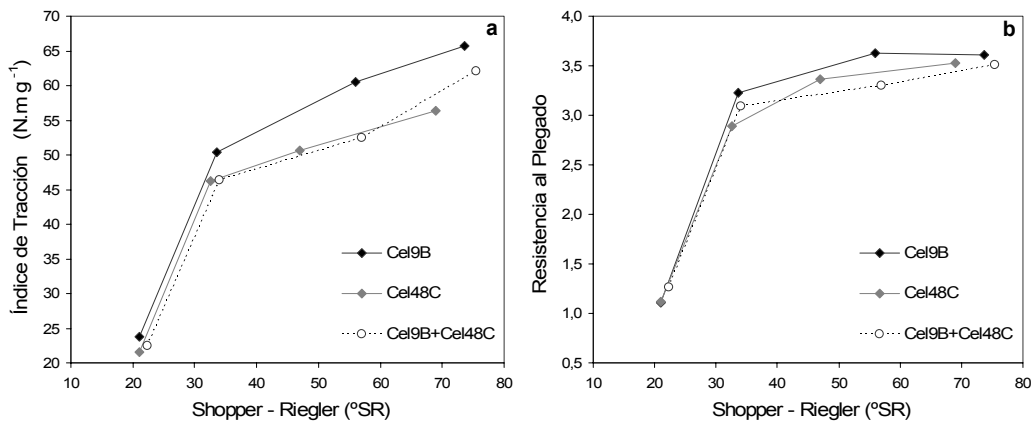


Figura 5-5. Evolución del índice de tracción (a) y la resistencia al plegado (b) con respecto al Schopper - Riegler

En la resistencia al desgarro también se verifica que Cel9B+Cel48C no genera variación significativa a los efectos ya obtenidos con la enzima individual Cel9B. La enzima Cel48C presenta mayor resistencia al desgarro en comparación a la enzima Cel9B y al tratamiento combinado endo-exo [Cel9B+Cel48C] (Figura 5-6); el punto máximo en la resistencia al desgarro es visualizado a 1500 rev. para los tres tipos de tratamientos, destacándose que la celulasa Cel9B y la aplicación Cel9B+Cel48C realizan una mayor modificación en las fibras favoreciendo los enlaces interfibrilares y la densificación del papel, este efecto impide un fácil deslizamiento entre fibras enlazadas produciendo la rotura de las mismas y provocando una menor respuesta en la resistencia al desgarro. El biorefinado acelera los efectos primarios y secundarios del refinado, por tanto en la evolución de la resistencia al desgarro el punto máximo se consigue a menor número de revoluciones del molino PFI, este efecto se obtiene con el tratamiento Cel9B+Cel48C que sigue la misma tendencia del tratamiento realizado con la endocelulasa Cel9B.

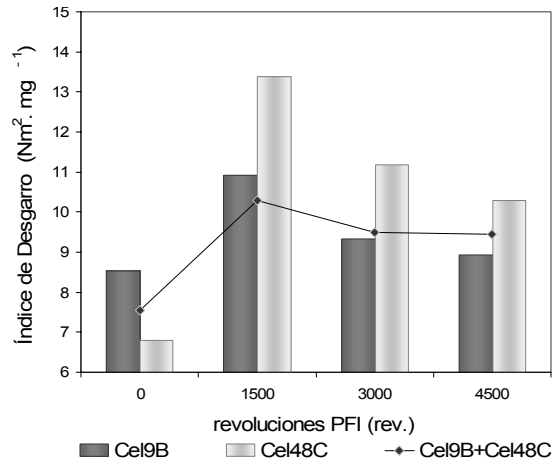


Figura 5-6. Evolución del índice de desgarro con respecto al número de revoluciones del molino PFI

El análisis del grado de polimerización de la celulosa (viscosidad específica) revela que el tratamiento combinatorio endo-exo [Cel9B+Cel48C] no realiza cortes en la cadena celulósica (840 mL/g), obteniendo valores similares a la aplicación de la enzima Cel9B (859 mL/g) y al valor de la pasta inicial ECF (858 mL/g).

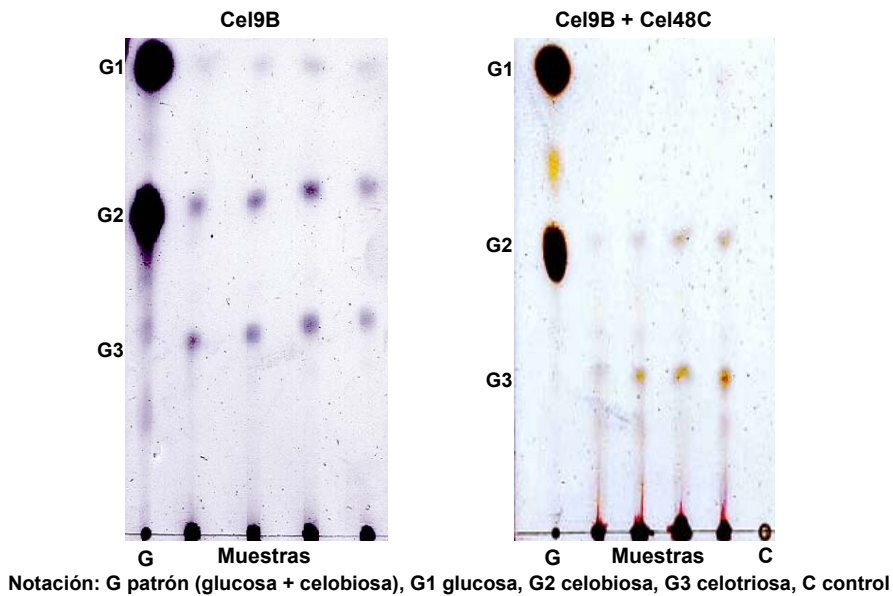


Figura 5-7. Análisis de cromatografía de capa fina (TLC) - productos liberados en efluentes de los tratamientos enzimáticos con "Cel9B" y "Cel48C" en pasta ECF

Igualmente en el análisis de los efluentes por cromatografía de capa fina (TLC) (Figura 5-7) se observa que Cel9B+Cel48C genera oligosacáridos de longitudes variables (celobiosa G2 y celotriosa G3) como productos de la biodegradación de la celulosa, en comparación a la enzima Cel9B la aplicación de Cel9B+Cel48C no evidencia rastros de glucosa, con lo cual se afirma que el tratamiento combinatorio tiene menor efectividad sobre la celulosa y se descarta el sinergismo endo-exo.

5.3.3 Aplicación de la enzima Cel9B en pastas TCF

En este apartado se estudia la etapa de biorefinado con la enzima Cel9B en la pasta TCF, el interés de aplicar un tratamiento enzimático en este tipo de pasta tiene por objetivo incrementar las propiedades fisicomecánicas de la pasta y los papeles obtenidos con ella y de esta forma incentivar su uso en la fabricación de papel por ser una pasta más amigable con el medio ambiente. En la pasta TCF se omite la aplicación de Cel48C y el tratamiento combinado Cel9B+Cel48C debido a que estos tratamientos en la pasta ECF no genera una influencia superior a la encontrada con la celulasa Cel9B.

La comparación de las propiedades de la pasta TCF (°SR - %IRA) (Figura 5-8) del tratamiento Cel9B y el refinado de la pasta inicial TCF [PI] indica que la enzima Cel9B incrementa la resistencia al desgote y el índice de retención de agua, estos resultados confirman la acción de la enzima Cel9B como etapa de biorefinado en las pastas papeleras, la hidrólisis que efectúa la endocelulasa en el refinado es positiva y como se observó en el anterior capítulo esta aplicación biotecnológica revela un valor añadido para obtener ahorros de energía en el proceso de fabricación.

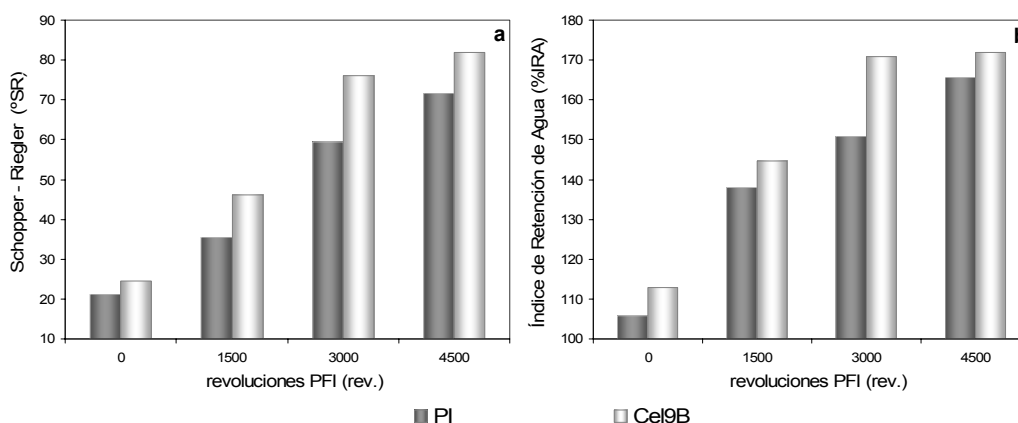


Figura 5-8. Propiedades físicas de la pasta TCF con tratamiento enzimático Cel9B. Shopper – Riegler -°SR- (a) y índice de retención de agua -%IRA- (b)

La enzima Cel9B genera notables diferencias en los cuatro puntos de refino obteniéndose la máxima diferencia en la resistencia al drenaje a 3000 rev. donde la pasta tratada enzimáticamente sobrepasa el valor de la pasta inicial hasta con 16 °SR; igualmente en la capacidad de retención de agua se obtiene una diferencia de 20 %IRA. Estos valores revelan la capacidad de la enzima -Cel9B- del tipo 1,4-β endoglucanasa de *Paenibacillus barcinonensis* para hidrolizar las fibras celulósicas de las pastas químicas TCF y ECF de *Eucalyptus globulus* y generar un “ablandamiento” que facilite la operación del refinado.

Para otros tipos de pastas (coníferas, fibras no madereras) su efectividad no puede ser predecible; las propiedades químicas y físicas de las pastas condicionan la aplicación de cualquier tipo de tratamiento biotecnológico; por ejemplo, el contenido de lignina es posible que influya negativamente en la acción de la enzima Cel9B puesto que limitaría la accesibilidad de Cel9B al sustrato celulósico. Con el mismo tipo de fibra como las pastas ECF y TCF que únicamente difieren en el proceso de blanqueo se presentan variaciones en la acción de Cel9B en la etapa del refinado; la resistencia al drenaje tiene mayor incremento en la pasta ECF con una diferencia máxima entre el tratamiento enzimático y la pasta inicial ECF de 24 °SR, y en el índice de retención de agua los mayores efectos los realiza en la pasta ECF. Inicialmente se intuye que en la pasta TCF se obtiene una respuesta ligeramente inferior a la secuencia de blanqueo ECF debido al número kappa (NK 5.0) que representa el contenido de lignina residual, pero se descarta porque en su determinación existe la influencia de estructuras oxidables que reportan un valor erróneo del contenido de lignina residual; por otro lado desde el análisis del refinado inicial de la pasta TCF y ECF (Capítulo 3.) se observa que la secuencia de blanqueo TCF realiza mayor modificación a las fibras y, por consiguiente, se obtiene una rápida respuesta al trabajo mecánico realizado por el molino PFI generando mayor resistencia en el papel. Al aplicar mayor energía de refinado (superior a 4500 rev.) es posible que la resistencia intrínseca de las fibras disminuya por un debilitamiento de las paredes externas generando disminuciones en la resistencia del papel, así mismo puede suceder con la enzima Cel9B que al incrementar el efecto del refinado también provoque una disminución de las propiedades de resistencia.

En los resultados presentados existen efectos positivos y a partir de los mismos se puede afirmar que el efecto de Cel9B en la pasta TCF es inferior a la ECF, porque la severidad del tratamiento de blanqueo en esta pasta provoca un “preablandamiento” de la fibra y, en consecuencia, una hidrólisis la puede deteriorar disminuyendo las propiedades fisicomecánicas para “altos niveles de refinado”. En la pasta TCF las mayores variaciones se presentan a 3000 rev., mientras que en la pasta ECF ocurre a

4500 rev. -indicador de que en la pasta ECF la enzima Cel9B puede seguir modificando la fibra para una respuesta positiva en el refinado-. En la Figura 5-9 se visualiza que la enzima Cel9B presenta más cambios en la pasta ECF [Cel9B_ECF] que en la pasta TCF [Cel9B_TCF].

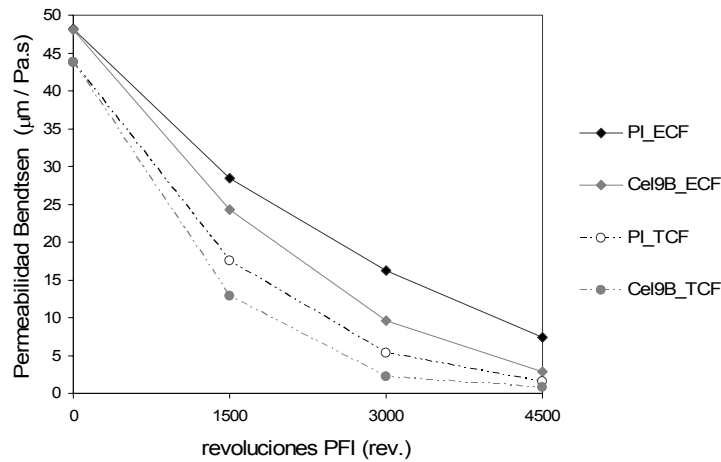


Figura 5-9. Biorefinado de la enzima Cel9B en pastas ECF y TCF. Permeabilidad Bendtsen

En las propiedades fisicomecánicas de la pasta TCF (Tabla 5-4) la aplicación de Cel9B modifica positivamente los valores de resistencia -en comparación al refinado de la pasta inicial TCF [PI]-, obteniéndose papeles más cerrados o densificados que producen mayor resistencia al paso del flujo del aire con un incremento máximo del 59% a 3000 rev.

Tabla 5-4. Propiedades fisicomecánicas de la pasta TCF tratada con la celulasa Cel9B

PFI/rev.	PI				Cel9B			
	0	1500	3000	4500	0	1500	3000	4500
Densidad, g cm ⁻³	0,58	0,67	0,72	0,77	0,63	0,69	0,75	0,79
Volumen, cm ³ g ⁻¹	1,73	1,48	1,39	1,29	1,59	1,46	1,33	1,27
Pb Bendtsen, µm (Pa.s) ⁻¹	43,8	17,5	5,3	1,6	43,8	12,9	2,2	0,8
I. Desgarro, mN m ² g ⁻¹	6,75	10,54	10,55	9,71	7,31	10,39	9,11	8,89
R. Plegado, log(Nº.Pliegues)	0,99	2,72	3,09	3,37	1,30	3,16	3,25	3,40
I. Estallido, kPa m ² g ⁻¹	1,14	3,32	3,60	4,39	1,55	3,67	4,17	4,71
I. Tracción, Nm g ⁻¹	22,39	46,83	51,38	59,91	26,24	48,81	55,21	65,91

La enzima Cel9B en la pasta TCF, al igual que en la pasta ECF, permite obtener mayor resistencia (índice de estallido, tracción y plegado) con mayor resistencia al desgote. Con respecto al índice del desgarrado (Figura 5-10a), la endocelulasa acelera la evolución normal del desgarrado en el refinado convencional, donde el punto máximo se obtiene a 1500 rev. para la pasta inicial y coincide para el tratamiento Cel9B, destacándose que la resistencia correspondiente a la aplicación enzimática ($10.39 \text{ mN m}^2/\text{g}$) es inferior a la pasta inicial, indicando que el punto máximo debe estar ubicado a un número de revoluciones inferior a 1500 rev., esta observación muestra que efectivamente existe la biomodificación de las fibras que proporcionan una etapa de biorefinado. Igualmente la relación de las propiedades fisicomecánicas como el índice de tracción y estallido (Figura 5-10b) dejan evidenciar los efectos de la enzima Cel9B en la pasta TCF, la celulasa acelera los efectos del refinando produciendo en las fibras mayor afinidad a la hidratación para posteriormente generar más enlaces fibra-fibra que en el papel producen resistencia.

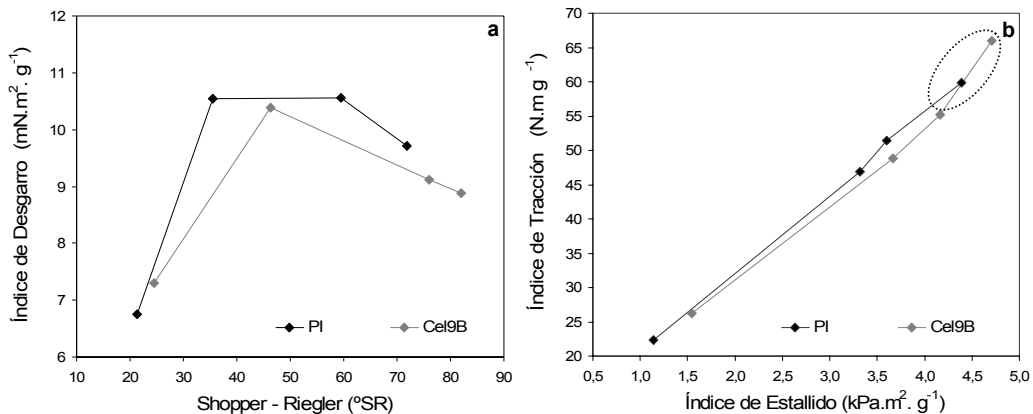


Figura 5-10. Propiedades fisicomecánicas de la pasta TCF tratada con la enzima Cel9B. Índice de tracción vs. Schopper - Riegler (a), índice de tracción vs. índice de estallido (b)

5.4 CONCLUSIONES

La aplicación de la enzima Cel48C no permite establecer una eficiente actividad sobre la operación mecánica del refinado; los tratamientos con la enzima Cel48C modifica ligeramente las fibras, efecto que conlleva a un incremento en la resistencia al drenaje (°SR) y el índice de retención de agua (%IRA). Es posible una modificación superficial de las fibras por la hidrólisis enzimática (exocelulasa) sobre el sustrato celulósico.

Con la aplicación de la enzima Cel48C se descarta una etapa de biorefinado, los efectos sobre las fibras no son suficientes para influir en las propiedades fisicomecánicas del papel; únicamente en el índice de estallido se obtiene un incremento con referencia a la pasta inicial ECF, y en los índices de tracción, plegado y desgarrar no se presentan valores que permitan catalogar a la enzima Cel48C como coadyuvante del refinado. La enzima Cel48C presenta baja actividad y, dada la disminución del índice de tracción, se entrevé que después del tratamiento enzimático queden impurezas sobre las fibras y obstruyan los mecanismos de cohesión en la formación de enlaces.

En la evaluación de un posible sinergismo endo-exo que beneficie el refinado, los resultados manifiestan que la aplicación combinada de las celulasas Cel9B+Cel48C no produce mayor efecto de biorefinado que el conseguido con la enzima individual Cel9B; además, el análisis global de las propiedades físicas de las pastas tratadas y refinadas con Cel9B+Cel48C indica que hay una tendencia equivalente al efecto individual de Cel9B. Es posible que el efecto sinérgico solo se pueda manifestar con la utilización de enzimas purificadas.

La actividad enzimática de la enzima Cel9B permite obtener un biorefinado en dos tipos de pastas que difieren únicamente en la secuencia de blanqueo (pastas ECF y TCF); el incremento de los efectos primarios y secundarios del refinado con la enzima Cel9B se presenta también en la pasta TCF.

La aplicación de la enzima Cel9B en las pastas ECF y TCF produce un efecto de biorefinado, con mayor eficiencia en la pasta ECF. Esta respuesta se vincula con las características iniciales de la fibra, donde la severidad del tratamiento químico en la pasta TCF produce un mayor ablandamiento de la fibra con respecto a la pasta ECF, ocasionando una rápida respuesta al refinado; de esta forma se considera que la enzima Cel9B produce mayores efectos en fibras celulósicas que tienen menor aptitud al refinado.

5.5 BIBLIOGRAFÍA

- Bhardwaj, N.K., Bajpai, P. and Bajpai, P.K., 1996. Use of enzymes in modification of fibres for improved beatability. *Journal of Biotechnology*, 51(1): 21-26.
- Boisset, C., Petrequin, C., Chanzy, H., Henrissat, B. and Schulein, M., 2001. Optimized mixtures of recombinant *Humicola insolens* cellulases for the

- biodegradation of crystalline cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(3): 339-345.
- Cadena, E.M., Chiriac, I.A., Vidal, T., Pastor, F.I.J., Díaz, P. and Torres, A.L., 2007. Improving mechanical properties of chemical pulps by enzymatic modification. 10th International Congress on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, 10th ICBPPI-2007, Wisconsin - Estados Unidos.
- Cadena, E.M., Chiriac, I.A., Vidal, T., Pastor, F.I.J., Díaz, P. and Torres, A.L., 2008. Aplicación de celulasas y dominios de unión a celulosa recombinantes en el refinado de la pasta kraft TCF (*Eucalyptus globulus*). V Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel, CIADICYP-2008, Guadalajara, México.
- Dienes, D., Egyhazi, A. and Reczey, K., 2004. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma cellulases*. *Industrial Crops and Products*, 20 (1): 11 - 21.
- Dienes, D., Kemeny, S., Egyhazi, A. and Reczey, K., 2005. Improving the capability of the Schopper-Riegler freeness measurement. *Measurement*, 38(3): 194-203.
- Fierobe, H.P., Bayer, E.A., Tardif, C., Czjzek, M., Mechaly, A., Belaich, A., Lamed, R., Shoham, Y. and Belaich, J.P., 2002. Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras: Substrate targeting versus proximity of enzyme components. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51): 49621-49630.
- Garcia, O., Torres, A.L., Colom, J.F., Pastor, F.I.J., Diaz, P. and Vidal, T., 2002. Effect of cellulase-assisted refining on the properties of dried and never-dried eucalyptus pulp. *Cellulose*, 9(2): 115-125.
- Henrissat, B., 1994. Cellulases and their interaction with cellulose. *Cellulose*, 1(3): 169-196.
- Lemos, M.A., Teixeira, J.A., Domingues, M.R.M., Mota, M. and Gama, F.M., 2003. The enhancement of the cellulolytic activity of cellobiohydrolase I and endoglucanase by the addition of cellulose binding domains derived from *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1): 35-40.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Willem, H.Z. and Pretorius, I.S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR, 66(3): 506-577.
- Mansfield, S.D., Mooney, C. and Saddler, J.N., 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress*, 15 (5): 804 - 816.
- Nidetzky, B., Steiner, W. and Claeyssens, M., 1995. Synergistic interaction of cellulases from *Trichoderma reesei* during cellulose degradation. American Chemical Society (ACS), Washington, 90-112 pp.
- Oksanen, T., Pere, J., Buchert, J. and Viikari, L., 1997. The effect of *Trichoderma reesei* cellulases and hemicellulases on the paper technical properties of never-dried bleached kraft pulp. *Cellulose*, 4(4): 329-339.

- Oksanen, T., Pere, J., Paavilainen, L., Buchert, J. and Viikari, L., 2000. Treatment of recycled kraft pulps with *Trichoderma reesei* hemicellulases and cellulases. *Journal of Biotechnology*, 78(1): 39-48.
- Pala, H., Mota, M. and Gama, F.M., 2002. Enzymatic modification of paper fibres. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20 (5): 353-361.
- Pere, J., Siikaaho, M., Buchert, J. and Viikari, L., 1995. Effects of purified *Trichoderma* cellulases on the fiber properties of kraft pulp. *Tappi Journal*, 78(6): 71-78.
- Sánchez, M.M., Irwin, D.C., Pastor, F.I.J., Wilson, D.B. and Diaz, P., 2004. Synergistic Activity of *Paenibacillus* sp. BP-23 cellobiohydrolase Cel48C in association with the contiguous endoglucanase Cel9B and with endo- or exo-acting glucanases from *Thermobifida fusca*. *Biotechnology and Bioengineering*, 87 (2): 161 - 169.
- Suurnakki, A., Oksanen, T., Kettunen, H. and Buchert, J., 2003. The effect of mannan on physical properties of ECF bleached softwood kraft fibre handsheets. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 18(4): 429-435.
- Teeri, T.T., 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15(5): 160-167.

CAPÍTULO 6.

Aplicación de celulasas y dominios de unión a celulosa recombinantes en el refinado de pasta kraft TCF

La demostración positiva de una etapa de biorefinado con la aplicación de la enzima Cel9B del tipo 1,4-β endoglucanasa de Paenibacillus barcinonensis, requiere una investigación adicional para profundizar e identificar en la estructura modular de la enzima Cel9B el dominio responsable de la modificación superficial de las fibras celulósicas, y así contribuir al diseño de nuevas celulasas que permitan optimizar el efecto de biorefinado. La aplicación de enzimas truncadas GH9-CBD3c, Fn3-CBD3b y CBD3b en el refinado de la pasta kraft TCF (Eucalyptus globulus) permite evaluar el efecto del dominio catalítico, dominios de unión a la celulosa y dominios de unión a la fibronectina. Los resultados de las propiedades fisicomecánicas de la pasta y del papel indican una marcada influencia del dominio catalítico (GH9-CBD3c) sobre la morfología de las fibras, su efecto contrastado con la celulasa completa Cel9B muestra una importante contribución en el incremento de la resistencia del papel tras ensayos físicos como el índice de tracción y estallido, y un resultado a resaltar corresponde a la resistencia del desgarro donde el dominio catalítico tiene una mejor respuesta en relación a la enzima Cel9B, de acuerdo a estos efectos se afirma que el dominio catalítico puede generar un biorefinado. Los dominios de unión a celulosa Fn3-CBD3b y CBD3b muestran menor actividad sobre el refinado, sin embargo hay evidencia del dominio CBD3b que realiza una modificación superficial de las fibras e influye en las propiedades de resistencia del papel.

6.1 INTRODUCCIÓN

Las celulasas son enzimas integradas principalmente por un dominio catalítico que hidroliza enlaces 1,4-β glucosídicos y otros dominios no catalíticos; entre estos últimos

se encuentran los dominios unión a fibronectina tipo III (fibronectin type 3-like domain -Fn3-) (Kataeva et al., 2002) y los llamados módulos de unión a carbohidratos [carbohydrate binding modules -CBM-] que de acuerdo a su especificidad son inicialmente conocidos como dominios de unión a celulosa [cellulose binding domains -CBD-] (Boraston et al., 2004). Los dominios catalíticos y los módulos de unión a carbohidratos se encuentran conectados por regiones separadoras flexibles [linker], estos confieren una separación espacial que permite a los dominios catalíticos y dominios de unión a celulosa (CBDs) actuar independientemente sobre la superficie de celulosa insoluble (Rabinovich et al., 2002). Los CBDs facilitan la asociación de la enzima al sustrato, lo que implica un direccionamiento al sustrato apropiado y un incremento de actividad, eficiencia y estabilidad durante una hidrólisis enzimática (Bolam et al., 1998; Carrard et al., 2000; Tomme et al., 1995).

Específicamente la celulasa Cel9B de *Paenibacillus barcinonensis* de arquitectura estructural GH9-CBD3c-Fn3-CBD3b (Pastor et al., 2001) representada en la Figura 6-1 se encuentra constituida por un péptido señal, un dominio catalítico N-terminal de la familia 9 (GH9), un dominio de unión a celulosa tipo 3c (CBD3c), dos dominios de unión a fibronectina III (Fn3) y un dominio de unión a celulosa de la familia 3 (CBD3b) en posición C-terminal (Pastor et al., 2001).

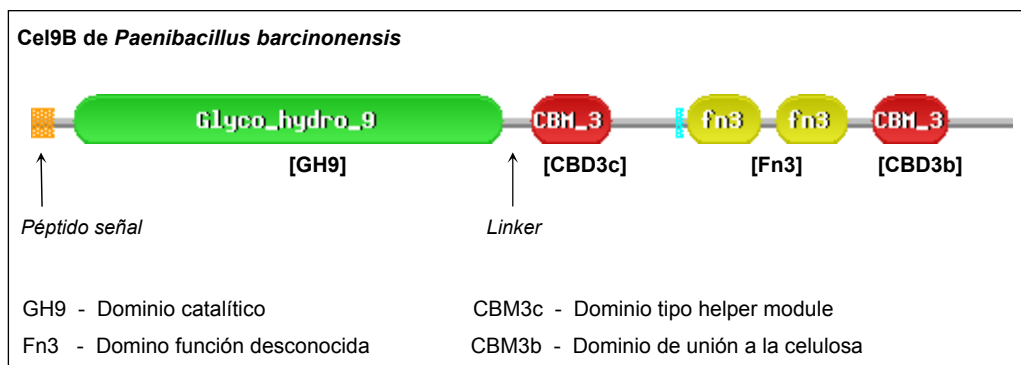


Figura 6-1. Representación de la estructura modular de Cel9B. Aplicación Pfman (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/nph-search.cgi>)

La abundante utilización de materiales celulósicos en la industria convierte a las celulasas en enzimas con gran potencial biotecnológico; concretamente la aplicación de la enzima Cel9B (1,4-β endoglucanasa de *Paenibacillus barcinonensis*) en las pastas papeleras revela un valor añadido en la operación de refinado al incrementar los mecanismos de cohesión fibra-fibra, acelerar la modificación morfológica de las fibras e incrementar propiedades de resistencia como tracción, estallido y plegado; el

conjunto de estos efectos permiten obtener importantes ahorros de energía en el proceso de refinado (Cadena et al., 2006). La efectividad de la celulasa Cel9B en la operación mecánica de refinado permite profundizar la investigación a nivel molecular para determinar la función de los respectivos dominios en la modificación morfológica de las fibras celulósicas.

Existen precedentes relacionados con la función de los dominios de unión a celulosa en la modificación de fibras. Los CBDs podrían modificar la celulosa cristalina haciendo al sustrato más accesible al ataque enzimático (Carrard et al., 2000; Irwin et al., 1998; Kataeva et al., 2002; Pages et al., 1997; Tomme et al., 1995), de esta forma la función de los CBDs no parece estar limitada a la unión de la enzima a la superficie del sustrato. Adicionalmente se ha observado un efecto sinérgico entre el CBD y el dominio catalítico, la aplicación de una celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* en presencia y ausencia de su CBD sobre papel filtro revelaron que los dominios de unión a celulosa incrementan la actividad enzimática en un 30% (Lemos et al., 2003), así mismo, el dominio de unión a fibronectina (Fn3) promueve la hidrólisis del sustrato por parte del dominio catalítico y realiza una modificación superficial en la celulosa (Kataeva et al., 2002). Según algunos autores, la presencia de CBDs en las endoglucanasas producen interferencia en las propiedades fisicomecánicas de pastas blanqueadas (Dienes et al., 2004; Suurnakki et al., 2000) y pastas recicladas (Pala et al., 2002), generando expectativas al observar una disminución en la resistencia al desgote con la aplicación directa de CBDs sobre pastas papeleras de pino y eucalipto (Pinto et al., 2004).

De acuerdo a estos antecedentes, los dominios de unión a celulosa y el dominio catalítico podrían modificar la respuesta en la operación de refinado; la aplicación de las enzimas truncadas GH9-CBD3c (dominio catalítico), Fn3-CBD3b y CBD3b (dominios de unión a celulosa) en el refinado de pastas kraft TCF (*Eucalyptus globulus*), la evaluación de propiedades físicas y de resistencia en las pastas y papeles permitirá verificar los efectos de los dominios de unión a celulosa sobre la morfología de las pastas y determinar si existe un efecto sinérgico entre los diferentes componentes de la enzima modular Cel9B.

Esta investigación se basa en la aplicación de nuevas celulasas construidas por ingeniería proteica; un posible biorefinado con la aplicación de los dominios de unión a celulosa -Fn3-CBD3b y CBD3b- y el dominio catalítico -GH9-CBD3c- posibilitan diseñar nuevas celulasas que permitan obtener un efecto de “biorefinado” superior al conseguido hasta ahora con la enzima Cel9B de *Paenibacillus barcinonensis*.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación del dominio catalítico [GH9-CBD3c] y los dominios de unión a celulosa [Fn3-CBD3b y CBD3b] en la operación de refinado se realiza en pasta kraft TCF de *Eucalyptus globulus*. La secuencia experimental de aplicación para la enzima completa Cel9B y las celulasas recombinantes (GH9-CBD3c, Fn3-CBD3b y CBD3b) consta de preparación y preacondicionamiento de la pasta, aplicación enzimática, refinado, elaboración de hojas de papel y posterior caracterización física de los respectivos tratamientos. La aplicación enzimática se basa en el procedimiento experimental descrito en los Capítulos 2 y 4 (aplicación de celulasas Cel9B); y las condiciones operativas (dosis, temperatura, pH) de la celulasas Cel9B y celulasas recombinantes se especifican en la Figura 6-2.

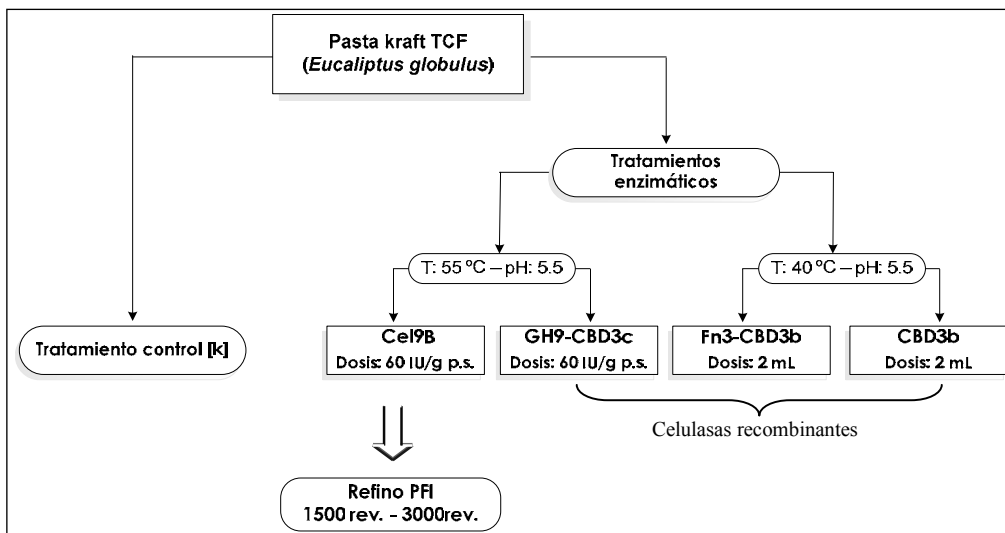


Figura 6-2. Condiciones generales de aplicación de la enzima Cel9B y celulasas recombinantes en pasta TCF

Las pastas tratadas enzimáticamente y un tratamiento anexo llamado control [k] son refinadas en el molino PFI a 1500 rev. y 3000 rev. (ISO-5264), y la evaluación física de las pastas y papeles incluye el análisis del índice de retención de agua -%IRA- (ISO-23714), resistencia al drenaje -Shopper Riegler, °SR- (ISO-5267), características morfológicas (longitud y ancho de fibra, finos) determinadas en el equipo Kajaani FS300, análisis superficial (microscopía electrónica de barrido -SEM-), viscosidad específica de la pasta (ISO-5351) y propiedades de resistencia: tracción (ISO-1924), estallido (2758), desgarro (ISO-1974), plegado (ISO-5626) y permeabilidad Bendtsen (ISO-5636). Errores experimentales, de acuerdo a las normas correspondientes.

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1 Influencia de las celulasas recombinantes en el refinado

En este estudio la actuación de la enzima Cel9B como coadyuvante del refinado (Cadena et al., 2007) se confirma, y los resultados obtenidos son utilizados como referencia máxima para evaluar la acción de los dominios que constituyen la celulasa Cel9B de *Paenibacillus barcinonensis*. El efecto de los biotratamientos en la morfología de las fibras celulósicas tras la operación de refinado se determina inicialmente con la capacidad de hidratación de las fibras (%IRA) y la resistencia al drenaje (°SR). La Tabla 6-1 presenta la caracterización de la pasta control [k], las pastas tratadas con las celulasas recombinantes y la celulasa completa Cel9B en dos puntos de refinado (1500 rev. - 3000 rev.). En el grupo de las celulasas recombinantes se encuentra el “dominio catalítico” GH9-CBD3c y los dominios Fn3-CDB3b y CBD3b identificados como “dominios de unión a celulosa”.

Tabla 6-1. Efecto de las celulasas recombinantes en propiedades de la pasta

	Índice de retención de agua (%IRA)		Schopper - Riegler (°SR)	
	1500 rev.	3000 rev.	1500 rev.	3000 rev.
k	134	149	39	61
Cel9B	143	162	49	84
GH9-CBD3c	135	156	45	77
Fn3-CBD3b	134	148	39	63
CBD3b	136	148	43	67

Los resultados del %IRA y °SR, indican que la celulasa modular -Cel9B- modifica la estructura física de las fibras, y acelera los efectos del trabajo mecánico realizado por el molino PFI ocasionando incrementos en la resistencia al drenaje y mejorando la capacidad de hidratación de las fibras. Los efectos mencionados de la enzima Cel9B pueden ser atribuidos mayoritariamente a la función del dominio catalítico GH9-CBD3c, con este dominio se obtienen incrementos significativos de un 5% en el índice de retención del agua y del 25% en la resistencia al drenaje. Los resultados de la hidrólisis enzimática sugieren que el dominio catalítico causa una deslaminación y/o ablandamiento de las paredes externas de las fibras, por consiguiente al aplicar mayor energía de refinado -3000 rev.- se obtiene incrementos superiores a los presentados con menor número de revoluciones -1500 rev.-. El dominio catalítico [GH9-CBD3c] realiza una importante contribución en la modificación superficial de las fibras; el

análisis de las propiedades fisicomecánicas de las hojas de papel permitiría comprobar su efecto como un dominio que posiblemente actúe como coadyuvante del refinado.

En contraste al dominio catalítico, los resultados indican que los dominios de unión a celulosa tienen baja influencia en la hidratación de las fibras y drenabilidad, pero no se descarta la influencia del dominio CBD3b en la modificación de las fibras al obtener incrementos del 9% y 10% en la resistencia al drenaje para los refinados de 1500 rev. y 3000 rev. respectivamente. En las características físicas de la pasta (%IRA y °SR) el dominio CBD3b tiene un efecto superior al dominio Fn3-CBD3b, la incorporación del componente Fn3 modifica la acción de CBD3b o enmascara su efecto en el refinado, obteniendo resultados similares al tratamiento control [k].

En el refinado convencional las propiedades físicas de la pasta (%IRA y °SR) evolucionan e incrementan paralelamente según el número de revoluciones aplicadas en el molino PFI, esta tendencia se ha observado con la celulosa Cel9B y el dominio catalítico realizando un biorefinado, en cambio con la aplicación de CBD3b no se detecta una relación directamente proporcional entre la hidratación y drenabilidad, este fenómeno predice que puede existir una fibrillación externa sin causar una fibrillación interna y/o suficiente deslaminación de las paredes externas de la fibra, si se tiene en cuenta que existe una correlación entre el °SR y la fibrillación externa (Wang et al., 2007). La hidratación de las fibras también depende del grado de cristalinidad del sistema celulósico, una mayor proporción de celulosa amorfa permite mayor accesibilidad de la celulosa al agua, es posible que este dominio de unión a celulosa realice una modificación superficial en las fibras sin alterar la cristalinidad.

La retención de agua y la drenabilidad son características físicas que dependen de la morfología de las fibras y en ellas intervienen efectos propios de la operación de refinado como la fibrillación externa e interna, acortamiento de las fibras, formación de finos y deslaminación de las paredes celulares (Helmer et al., 2006); una forma de profundizar en la morfología de la fibra es estudiar parámetros específicos como longitud de fibra (L), ancho de fibra (W), espesor de la pared celular y curvatura que dan información sobre la consolidación y uniformidad de la estructura fibrosa en la formación del papel (García Hortal, 2007) ya que las propiedades físicas de las pastas y papeles están fuertemente relacionadas con la morfología y resistencia intrínseca de las fibras celulósicas. De esta manera, para sustentar la influencia de las celulasas recombinantes sobre las características de las pastas se realizan análisis de la morfología de la fibra con el equipo Kajaani FS300.

El refinado de la pasta tras la aplicación de la enzima Cel9B a una dosis de 60 IU/g p.s provoca una modificación de las fibras respecto al tratamiento control [k]. En la Figura 6-3, que relaciona la longitud de fibra [Ln - media aritmética según norma ISO] y el contenido de finos con la resistencia al drenaje -°SR-, se observa la notable disminución en la longitud de fibra y la mayor generación de finos en el tratamiento Cel9B, estos parámetros explican la mayor resistencia al desgote (Mohlin, 1997) e inducen a confirmar que la enzima completa produce desprendimientos de pequeños fragmentos provenientes de las paredes externas de la fibra.

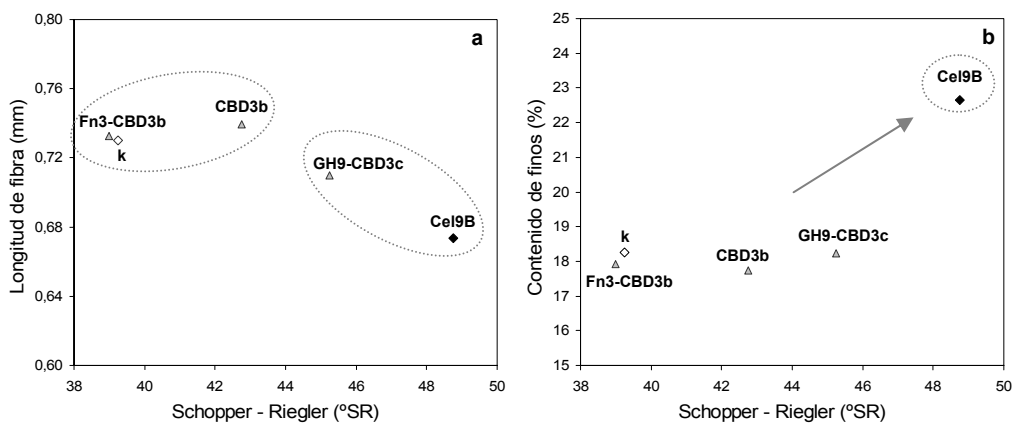


Figura 6-3. Efecto de la enzima Cel9B y celulasas recombinantes en la longitud de fibra (a) y contenido de finos (b). Refinado a 1500 rev.

Los dominios cumplen una función específica en la hidrólisis de la celulosa donde la acción global de cada componente enzimático de Cel9B acelera el trabajo mecánico del molino PFI en el refinado de las pastas madereras. Del grupo de las celulasas recombinantes el dominio catalítico [GH9-CBD3c] sigue la tendencia de un biorefinado al conseguir un incremento del 15.3% en la resistencia al drenaje con disminución en la longitud de fibra (Figura 6-3a), su efecto es significativo con relación a los resultados derivados con la enzima completa Cel9B; la reducción de la longitud de fibra obtenida con el dominio catalítico GH9-CBD3c no implica un incremento en el porcentaje de finos tal como se observa en la Figura 6-3b en el refinado de 1500 rev. Con respecto a los dominios de unión a celulosa se encuentra que el dominio CBD3b aumenta la resistencia al drenaje con un máximo del 8.9% sin modificar la longitud de la fibra y generar finos, de acuerdo a estos resultados se manifiesta que la resistencia al drenaje no depende únicamente del contenido de finos y longitud de fibra, existen otros factores que intervienen en la drenabilidad como la fibrillación externa e interna. La fibrillación incrementa la capacidad de hidratación y el área superficial de las fibras,

características que contribuyen a incrementar los puntos o zonas de contacto interfibrillares.

Los resultados que corresponden al refinado de 1500 rev. (Figura 6-3) acentúan la acción de la enzima Cel9B, de los dominios GH9-CBD3c y CBD3b, y a mayor número de revoluciones (3000 rev.) se detectan efectos equivalentes relacionados con la longitud de fibra sobresaliendo la acción de Cel9B al causar reducciones en longitud del 8% y 7% con respecto al tratamiento control [k]. Entre los refinados 1500 rev. y 3000 rev. existen efectos opuestos correlacionados con la generación de finos secundarios y el efecto del dominio catalítico, el análisis de la Figura 6-3 menciona que la aplicación del dominio catalítico GH9-CBD3c no causa incrementos en la cantidad de finos a 1500 rev., sin embargo a mayor número de revoluciones -3000 rev.- se presenta generación de finos con un aumento del 3.73% con respecto al control.

Para mayor ilustración de las diferencias obtenidas en los puntos de refino se representa la longitud de fibra (Tappi-271) en términos de distribución ponderada en longitud $-L_L-$ (Figura 6-4), esta distribución permite eliminar parcialmente la influencia de los finos y fibras cortas en el análisis de longitud de fibra (Pulkkinen et al., 2006) y con ella verificar el efecto de la enzima Cel9B y del dominio catalítico GH9-CBD3c en los refinados de 1500 rev. (Figura 6-4a) y 3000 rev. (Figura 6-4b). Las curvas de la enzima Cel9B a 1500 rev. y 3000 rev. difieren del tratamiento control [k] demostrando la efectividad de la hidrólisis enzimática sobre las fibras celulósicas. Con respecto al dominio catalítico [GH9-CBD3c] se observa que tiene un comportamiento similar al tratamiento control en el refinado correspondiente a 1500 rev., en el siguiente punto de refino (3000 rev.) las diferencias son apreciables, concretamente el análisis de la longitud de fibra en una zona inferior a 0.5 mm revela una tendencia al efecto obtenido con la enzima Cel9B indicando que el dominio catalítico GH9-CBD3c modifica la morfología de las fibras y que es capaz de realizar un ablandamiento de la estructura celulósica, de esta manera la generación de finos con el dominio catalítico [GH9-CBD3c] depende de la intensidad aplicada en el molino PFI.

A 1500 rev. el dominio catalítico [GH9-CBD3c] no genera una cantidad superior de finos, por consiguiente no existe una mayor contribución de grupos -OH a la capacidad hidrofílica e hidratación de las fibras, tal como evidencian los resultados equivalentes del índice de retención de agua [%IRA] al tratamiento control (Tabla 6-1); este punto de refinado ha permitido comprobar la contribución de los elementos finos ($L \leq 0.2$ mm) en la hidratación y retención de agua en la matriz interna de las fibras.

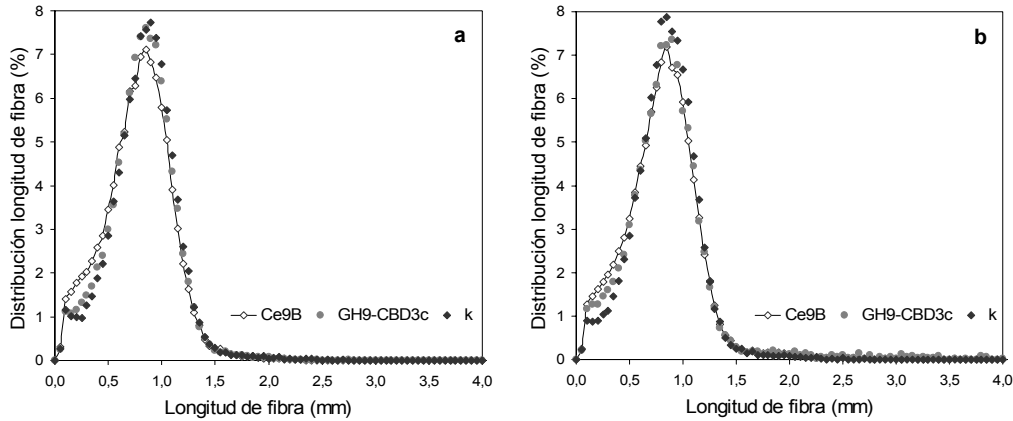


Figura 6-4. Influencia de la enzima Cel9B y el dominio catalítico en la longitud de fibra. Refinado 1500 rev. (a) - Refinado 3000 rev. (b)

El índice de retención de agua es una propiedad que involucra parámetros químicos y físicos de las fibras, como consecuencia su valor depende principalmente del contenido de hemicelulosas y de la morfología de las fibras; la operación de refinado a nivel físico incrementa la afinidad hidrofílica como consecuencia de la modificación física de las fibras, una respuesta superior a la retención de agua en la matriz interna de las fibras la producen los tratamientos enzimáticos (celulasa Cel9B, dominio catalítico GH9-CBD3c) generando expectativas en la potenciación de enlaces interfibrilares.

La relación de la longitud de fibra (L_n) con el índice de retención de agua (Figura 6-5) provee una importante información sobre la evolución morfológica de las fibras en la operación de refinado tras los tratamientos con la celulasa Cel9B y las celulasas recombinantes. La disminución en la longitud de fibra experimentada con la aplicación de la enzima Cel9B en el refinado de 1500 rev. y 3000 rev. coincide con la capacidad de hidratación de las fibras, y se potencian los efectos del refinado como la deslaminación de las capas externas y fibrillación confiriendo a las fibras mayor accesibilidad del agua con referencia al refinado del tratamiento control. Del grupo de las celulasas recombinantes resaltan los resultados del dominio catalítico GH9-CBD3c sobre el %IRA y la longitud de fibra. Generalmente el %IRA es un indicador de las características finales del papel, con este resultado se intuye mayor resistencia en el papel para los tratamientos realizados con la enzima Cel9B y el dominio catalítico GH9-CBD3c, sin embargo el efecto sobre la longitud de fibra no permite garantizar esta resistencia debido a que la disminución de la longitud de fibra es catalogada como un efecto negativo del refinado, aunque para algunos investigadores en la

operación de refinado es más crítico las deformaciones en la fibra que la disminución de longitud (Mohlin and Miller, 1995).

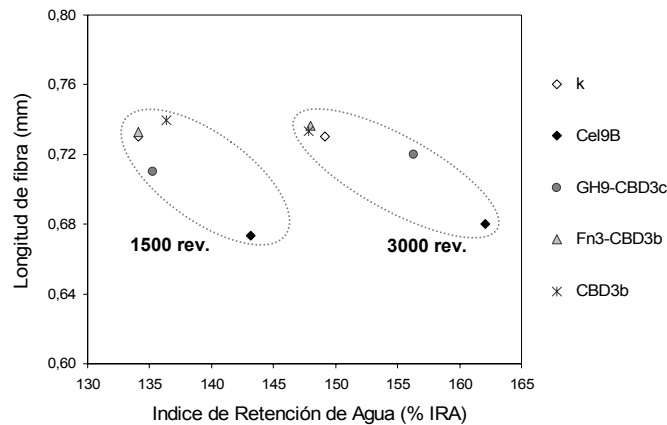


Figura 6-5. Influencia de la longitud de fibra en el índice de retención de agua

El incremento de la fibrillación que se consigue con los tratamientos enzimáticos (celulasas) puede ser relacionado con otras características morfológicas de las fibras celulósicas como el ancho de fibra (*fiber width*); este parámetro incrementa con el nivel de energía aplicado en la operación de refinado (Helmer et al., 2006), de esta forma el análisis del ancho de fibra también permitirá determinar los efectos enzimáticos sobre el refinado y proporcionará información sobre la morfología y deslaminación de las paredes secundarias de las fibras.

En la Figura 6-6 se presenta la distribución del ancho de fibra ponderado en longitud (W_L) según los resultados obtenidos en el equipo Kajaani FS300 para los diferentes tratamientos y refinado a 1500 rev. La pasta de referencia [k] indica que el mayor porcentaje de fibras (60%) se localiza en un ancho de fibra comprendido entre 8 μm y 16 μm , porcentaje que se reduce en un 2% al aplicar mayor energía de refinado (3000 rev.) y con incrementos del ancho de fibra en los rangos superiores (16 - 32 μm) como consecuencia de la fricción de las fibras entre las guarniciones del molino PFI; de acuerdo a este análisis la enzima Cel9B y dominio catalítico GH9-CBD3c pueden modificar el ancho de fibra al acelerar los efectos de la operación de refinado.

La influencia de los dominios de unión a celulosa [Fn3-CBD3b y CBD3b] en el ancho de fibra (Figura 6-6a) no es significativo y los resultados corresponden a un refinado convencional (y/o equivalentes al tratamiento control); en contraste a los dominios de unión de celulosa se encuentran los tratamientos con la enzima Cel9B y el dominio

catalítico [GH9-CBD3c] que si modifican el ancho de la fibra, de manera que el porcentaje de fibras con un ancho ubicado entre 8 μm y 16 μm es menor con respecto al tratamiento control (Figura 6-6b) y mayor en rangos superiores (16 - 32 μm), existiendo una diferencia notable entre el control y los tratamientos enzimáticos (Cel9B, GH9-CBD3c). Estos resultados verifican el efecto de biorefinado tanto de Cel9B como del dominio catalítico GH9-CBD3c. Los cambios morfológicos que incrementan el ancho de fibra tras la operación de refinado son producto de la rotura y aplastamiento de la pared de la fibra durante el refinado, exponiendo sus partes internas a mayor hidratación e hinchamiento.

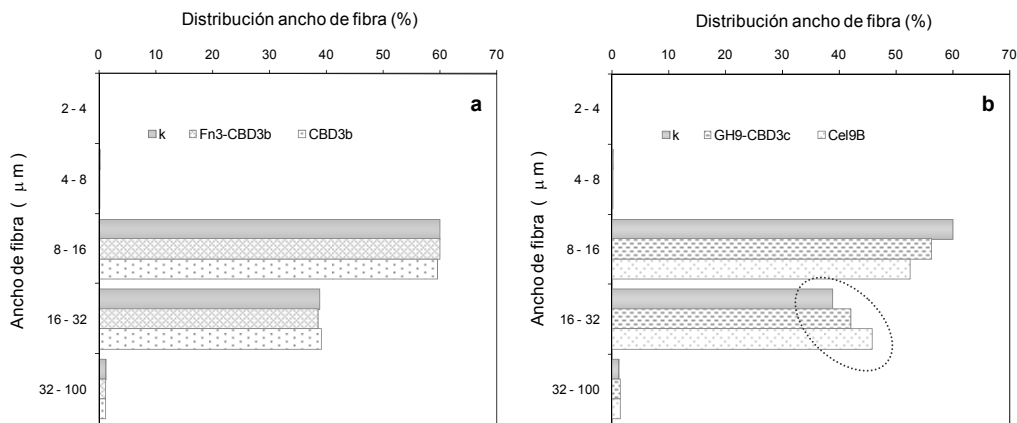


Figura 6-6. Efecto de la enzima Cel9B y celulasas recombinantes en el ancho de fibra. Refinado a 1500 rev.

6.3.2 Efecto de las celulasas recombinantes en la resistencia del papel

Las propiedades fisicomecánicas de los papeles dependen ampliamente de la morfología de las fibras; la evaluación de permeabilidad y resistencia en los papeles obtenidos con las pastas tratadas y refinadas permitirán comprobar la influencia de las celulasas recombinantes en la operación mecánica de refinado.

La Figura 6-7 indica la evolución de la permeabilidad Bendtsen en función de la drenabilidad ($^{\circ}\text{SR}$), el efecto de la enzima Cel9B sobre las fibras en la operación de refinado es mayor en comparación al tratamiento control y las celulasas recombinantes; Cel9B da origen a una mayor consolidación de las fibras en la formación del papel, se reduce la porosidad y como consecuencia incrementa la resistencia al paso del flujo del aire. Del grupo de las celulasas recombinantes el dominio catalítico [GH9-CBD3c] causa una variación notable en la permeabilidad del papel con incrementos en la resistencia al paso del flujo del aire del 19% y 51% en los

refinados de 1500 rev. y 3000 rev. La influencia del dominio de unión a celulosa [CBD3b] en la permeabilidad del papel es baja con respecto al efecto del dominio catalítico [GH9-CBD3c] y la enzima completa [Cel9B] (presenta variaciones del 3% y 10% con respecto al control [k] en los dos puntos de refinado), este efecto coincide con el incremento en la resistencia al drenaje ($^{\circ}$ SR). Los parámetros morfológicos como longitud de fibra, generación de elementos finos y fibrillación externa visualizados en los tratamientos enzimáticos, explican la mayor cohesión entre las superficies fibrosas y, que son responsables de la disminución en la porosidad del papel.

Los resultados de la permeabilidad marcan la influencia del dominio de unión a celulosa CBD3b; dado que la aplicación de este dominio en la pasta y su posterior refinado no produce una disminución en la longitud de fibra ni incrementa el contenido de finos, se puede interpretar que este dominio ejerce una función importante en la modificación superficial de las fibras, de esta manera su principal contribución en la morfología de las fibras se correlacionaría con la fibrillación externa.

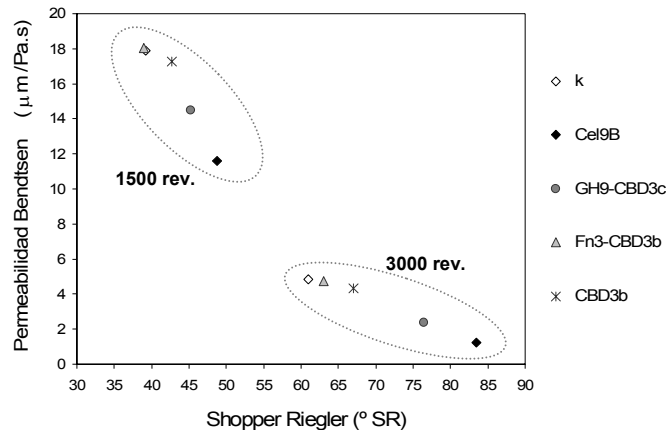


Figura 6-7. Influencia de las celulasas recombinantes en la permeabilidad del papel

El incremento de la capacidad de enlace o cohesión entre las fibras con la aplicación de Cel9B, GH9-CBD3c y CBD3b y sus efectos sobre la morfología de las fibras efectuará una influencia en las propiedades de resistencia. La relación del índice de tracción con la resistencia al drenaje (Figura 6-8a) indica que la aplicación de Cel9B permite conseguir una mayor resistencia a la rotura por tracción (62.18 N.m/g) en el refinado de 1500 rev. seguido de una respuesta positiva del dominio catalítico GH9-CBD3c y el dominio de unión a celulosa CBD3b. A mayor número de revoluciones (3000 rev.) el efecto del dominio catalítico [GH9-CBD3c] es equivalente al conseguido

con la enzima Cel9B (75 N.m/g) y es un resultado a resaltar si se correlaciona con el °SR; entre la enzima Cel9B y el dominio catalítico [GH9-CBD3c] a 3000 rev. hay una diferencia de 7 °SR, existe la viabilidad de conseguir alta resistencia a la tracción con menor resistencia al drenaje, a nivel industrial el dominio catalítico GH9-CBD3c posiblemente favorecería los sistemas de producción.

Los dominios de unión a celulosa CBD3b y Fn3-CBD3b en el refinado a 3000 rev. producen incrementos en la resistencia a la tracción del 4% y 7% con respecto al tratamiento control; este punto de refinado permite obtener más diferencias entre las aplicaciones enzimáticas, a 1500 rev. el dominio Fn3-CBD3b se enmascara con el tratamiento control (Figura 6-8a), por consiguiente el segundo refinado admite concluir que el dominio de unión a celulosa Fn3-CBD3b si tiene efecto sobre el refinado de las pastas y el resultado también dependerá de la intensidad aplicada en el molino PFI; además se pone al descubierto que el componente Fn3 es inestable y puede causar efectos opuestos en relación al dominio CBD3b.

Los factores que intervienen en el índice de tracción corresponden principalmente a las características morfológicas de la fibra (longitud, curvatura, flexibilidad) y a la cantidad de finos presentes en las pastas (Retulainen and Nieminen, 1996), además los finos contribuyen a la consolidación de las hojas de papel (Kerekes, 2005) y a la distribución de las fuerzas de tensión (Ferreira et al., 1999). La generación de finos secundarios en la aplicación de la enzima Cel9B y dominio catalítico [GH9-CBD3c] contribuyen a incrementar la resistencia a la tracción con respecto al tratamiento control tal como se observa en el refinado a 3000 rev. (Figura 6-8b).

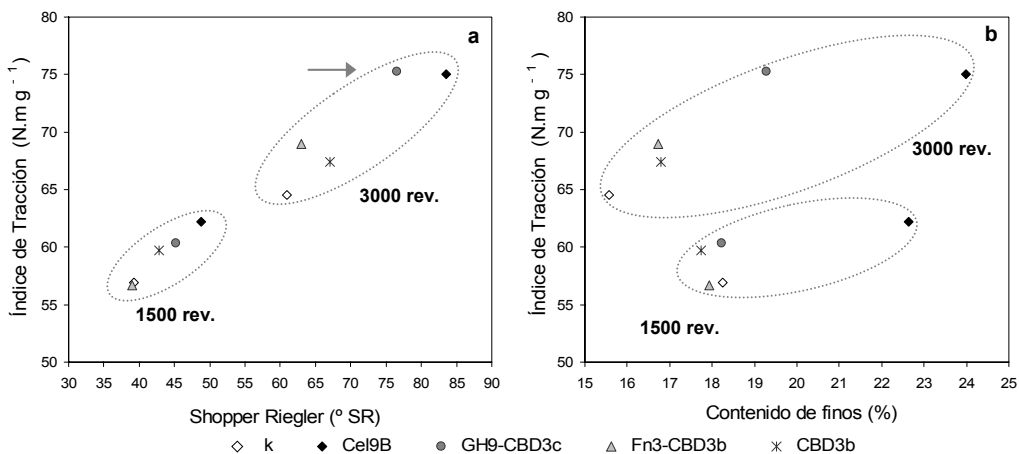


Figura 6-8. Evolución del índice de tracción con respecto al grado Schopper-Riegler °SR- (a) y contenido de finos (b)

Otro efecto encontrado tras la aplicación de la enzima Cel9B corresponde a la resistencia al desgarro; su aplicación produce una disminución notable en esta propiedad con respecto al control [k] (Figura 6-9a), con variaciones máximas desde el 42% y 46% en los refinados de 1500 rev. y 3000 rev. respectivamente; el dominio catalítico GH9-CBD3c sigue la tendencia de la enzima completa Cel9B obteniendo disminuciones comprendidas entre 24% y 27%. En el refinado convencional la evolución de las curvas de refino indican que el desgarro llega a un máximo valor y a un posterior descenso, este comportamiento se observa en la pasta control [k] (Figura 6-9) con un máximo a 1500 rev. y un descenso del 10% a mayor refinado. La enzima Cel9B y el dominio GH9-CBD3c acentúan este efecto e intervienen en la etapa de refinado al acelerar la respuesta inicial del tratamiento control.

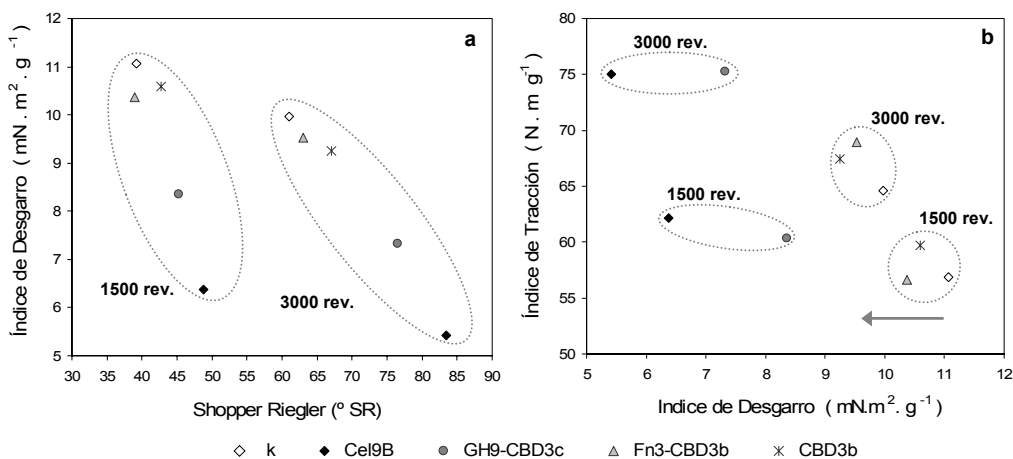


Figura 6-9. Evaluación del índice de desgarro con respecto al grado Schopper-Riegler - °SR- (a) y índice de tracción (b)

Con respecto a los CBDs, existe cierta influencia del dominio CBD3b en los dos puntos de refinado, con una disminución en la resistencia al desgarro comprendida entre el 4% y 7%; esta interferencia no es notable con respecto al efecto del dominio catalítico GH9-CBD3c y a la enzima completa Cel9B, sin embargo estos resultados permiten comprobar que los CBDs no se limitan a la unión de la enzima a la superficie del sustrato; y causan una modificación morfológica en la superficie fibrosa sin implicar una reducción de longitud de fibra y formación de finos. Igualmente la evaluación del dominio Fn3-CBD3b sobre el desgarro no permite descartar la influencia del componente Fn3 sobre las propiedades fisicomecánicas de los papeles obtenidos. En la Figura 6-9b, con los refinados de 1500 rev. y 3000 rev. se visualiza claramente una fluctuación en la respuesta del dominio CBD3b y Fn3-CBD3b sobre el índice de tracción y desgarro, este fenómeno sugiere inestabilidad a las condiciones del

tratamiento enzimático, y dados los resultados del dominio CBD3b se podría afirmar que el componente Fn3 altera el efecto del dominio CBD3b.

La relación entre el índice de tracción y desgarró (Figura 6-9b) marca un resultado promisorio enfocado a optimizar los efectos de la operación de refinado; el dominio catalítico GH9-CBD3c produce alta resistencia a la tracción con menor pérdida de resistencia al desgarró que el producido por la enzima Cel9B; este fenómeno permite dar un valor añadido al dominio catalítico [GH9-CBD3c] que actúa como coadyuvante del refinado modificando la morfología de las fibras para conferir propiedades de resistencia con menor alteración del desgarró. En la resistencia al desgarró intervienen los finos y la longitud de fibra; la presencia de finos depositados entre las fibras reduce la energía del desgarró (Ferreira et al., 1999); los tratamientos enzimáticos con el dominio catalítico [GH9-CBD3c] generan menor cantidad de finos con relación a la enzima Cel9B, por consiguiente el desgarró es mayor que el obtenido con la enzima completa. De igual forma la resistencia al desgarró se relaciona con la longitud y resistencia intrínseca de la fibra (Retulainen, 1996), en este caso la longitud de fibra es mayor para el dominio catalítico, resultado que sustenta parcialmente la respuesta en la resistencia ya que la rotura en el desgarró es controlada por el número de enlaces que se rompen a lo largo de la fibra.

El efecto de biorefinado permite predecir que la enzima Cel9B y el dominio catalítico GH9-CBD3c favorecen la resistencia al estallido, los valores presentados en la Tabla 6-2 lo confirman. A 1500 rev. los tratamientos Cel9B y GH9-CBD3c, producen notable resistencia al estallido con respecto al control, sin observar ningún efecto con los dominios de unión a celulosa; sin embargo a 3000 rev. se encuentra un apreciable incremento del estallido con el dominio CBD3b (3.90 kPa.m²/g), resultado que puede considerarse análogo al efecto del dominio catalítico GH9-CBD3c (3.82 kPa.m²/g) y al de la enzima completa Cel9B (3.93 kPa.m²/g); menor es la influencia del dominio Fn3-CBD3b con respecto a las celulasas recombinantes ya analizadas.

El contraste entre los dominios CBD3b y Fn3-CBD3b admite una vez más mencionar que el dominio de unión a fibronectina tipo III [Fn3] enmascara la acción del dominio CBD3b, por el leve incremento observado con respecto al control no se descarta un efecto sobre la modificación de las fibras y, en consecuencia, en las propiedades de resistencia del papel. Los resultados del índice de estallido también inducen a confirmar que los efectos de las celulasas recombinantes y en especial el de los CBDs se acentúan a mayor energía de refinado donde los dominios de unión a celulosa efectúan un ablandamiento en las superficies celulósicas, que al incrementar el

número de revoluciones en el molino PFI potenciarán fenómenos como la fibrillación externa.

Con respecto a la resistencia al plegado (Tabla 6-2) se obtiene que a 1500 rev. el efecto de Cel9B y del dominio catalítico GH9-CBD3c es superior al tratamiento control y a los CBDs, con cierta influencia del dominio CBD3b; y sin diferencias entre el tratamiento control [k] y el dominio Fn3-CBD3b. Un efecto opuesto se visualiza a 3000 rev. donde la enzima Cel9B produce una respuesta inferior a la pasta control [k]; este resultado permite lanzar una hipótesis inicial referente a la pérdida de resistencia intrínseca de las fibras por la mayor modificación morfológica y al mayor contenido de finos secundarios tras la aplicación de Cel9B, sin embargo la estabilidad del índice de tracción a 3000 rev. no permite asegurar una alteración en la resistencia intrínseca, además la resistencia al plegado está directamente vinculada con la homogeneidad de la hoja de papel y dado que la enzima Cel9B realiza mayor compactación del sistema fibroso favoreciendo la cohesión entre fibras y reduciendo la porosidad del papel; por consiguiente, la respuesta a la resistencia al plegado (3000 rev.) con la aplicación Cel9B se considera como un comportamiento anómalo. Con respecto a las celulasas recombinantes se obtiene un ligero incremento, donde la influencia del dominio catalítico y los CBDs realizan un efecto equivalente sobre la resistencia al plegado.

Tabla 6-2. Efecto de las celulasas recombinantes en propiedades de resistencia

	<i>Índice de Estallido</i> <i>kPa m² g⁻¹</i>		<i>Resistencia al Plegado</i> <i>log(N °. Pliegues)</i>	
	<i>1500 rev.</i>	<i>3000 rev.</i>	<i>1500 rev.</i>	<i>3000 rev.</i>
k	3,06	3,67	2,59	3,15
Cel9B	3,25	3,93	2,79	3,09
GH9-CBD3c	3,29	3,82	2,74	3,20
Fn3-CBD3b	3,01	3,78	2,59	3,21
CBD3b	3,02	3,90	2,65	3,21

En general los análisis de las propiedades fisicomecánicas del papel han permitido determinar una importante función del dominio catalítico [GH9-CBD3c] y de los dominios de unión a celulosa en la operación de refinado. El dominio catalítico sigue la tendencia de la enzima completa Cel9B para incrementar propiedades de resistencia, dejando en evidencia un efecto sinérgico entre el dominio catalítico y los CBDs en la hidrólisis de pastas papeleras.

6.3.3 Efecto de las celulasas recombinantes en la morfología de las fibras

La aplicación de la celulasa Cel9B en la pasta TCF incrementa las propiedades de resistencia tras la operación de refinado, esta respuesta se correlaciona con la capacidad de cohesión entre las fibras; el método cualitativo que da información sobre la cohesión o el comportamiento de la red fibrosa en la formación del papel corresponde al análisis de microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM). Las micrografías presentadas en la Figura 6-10 permiten verificar los cambios morfológicos de las fibras sometidas a una hidrólisis enzimática; la confrontación de la pasta refinada a 1500 rev. del tratamiento control [k] y el tratamiento con la celulasa modular [Cel9B] indican los cambios estructurales en las fibras, producto de la hidrólisis enzimática. El análisis de la micrografía Cel9B - 1500 rev. revela una superficie más compacta y cerrada en comparación a la micrografía k - 1500 rev. Las características de las fibras Cel9B indican un refinado superior al obtenido con las fibras control, por consiguiente la aplicación de la celulasa Cel9B favorece la operación de refinado generando mayor capacidad de enlace fibra-fibra al modificar las características superficiales (eliminación parcial de las paredes externas de las fibras). Las propiedades fisicomecánicas de las hojas de papel concuerdan con la visualización de la red fibrosa; una compactación óptima del sistema fibroso es producto de la generación de enlaces externos e internos fibra-fibra, esta capacidad de enlace provee mayor resistencia a la rotura en los ensayos al que son sometidas las hojas de papel y que incluyen la determinación de la resistencia a la tracción, estallido, desgarro y plegado.

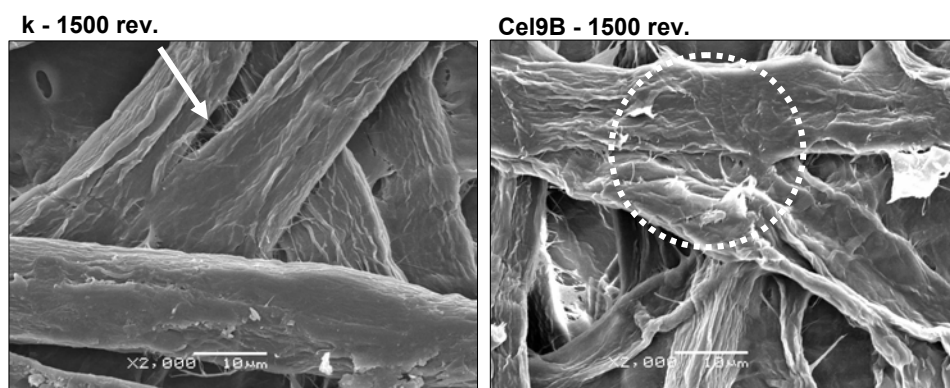


Figura 6-10. Evolución de la morfología de las fibras con la aplicación de la enzima Cel9B - refinado a 1500 rev.

La Figura 6-11 presenta micrografías de los tratamientos enzimáticos [Cel9B, GH9-CBD3c, Fn3-CBD3b y CBD3b] y del control [k], la confrontación de imágenes permitirá verificar los efectos correspondientes a un biorefinado.

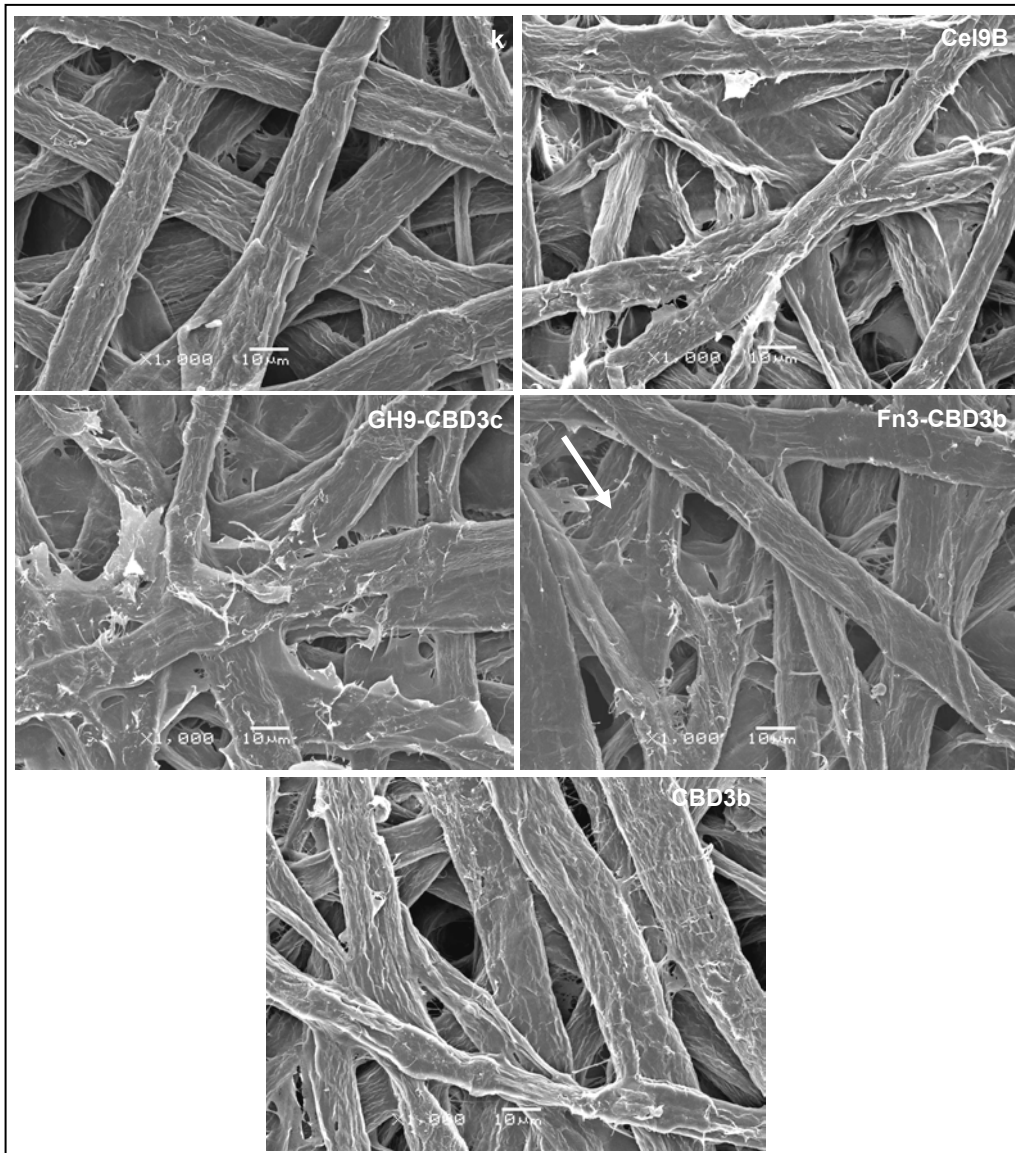


Figura 6-11. Micrografías de microscopía SEM de pasta TCF refinada a 1500 rev. Evaluación enzimática sobre la morfología de las fibras.

El efecto de la celulosa completa Cel9B y el dominio catalítico GH9-CBD3c produce una superficie más cerrada (Figura 6-11) lo que indica una mayor generación de

enlaces con respecto al tratamiento control [k]. La consolidación y unión de las fibras en la formación del papel depende del área superficial de las fibras celulósicas, la aplicación de Cel9B y el dominio catalítico GH9-CBD3c potencian la fibrillación externa de las fibras generando mayor superficie o puntos de contactos. Los efectos equivalentes entre las micrografías Cel9B y GH9-CBD3c confirman una etapa de “biorefinado” con la aplicación del dominio catalítico GH9-CBD3c.

La operación mecánica realizada por el molino PFI causa una compresión o reducción del diámetro interior de las fibras, modifica la estructura tubular generando un efecto de aplastamiento en las fibras (Fardim and Duran, 2003), este fenómeno oscila según la intensidad aplicada en la etapa de refinado. En la micrografía de tratamiento control [k - 1500 rev.] las fibras se encuentran muy definidas conservando su estructura inicial en la formación del papel, este comportamiento también se obtiene con la aplicación de los dominios de unión a celulosa [Fn3-CBD3b y CBD3b] (Figura 6-11), sin embargo el análisis comparativo de las imágenes revela que el dominio Fn3-CBD3b produce una capacidad de enlace entre fibras adyacentes con respecto al tratamiento control [k], y el dominio CBD3b presenta modificación superficial, destacando en su correspondiente micrografía las fibrillas que son producto de una fibrillación externa y deslaminación de las paredes externas de las fibras. Estos resultados permiten asegurar que los dominios de unión a celulosa causan una modificación superficial en las fibras, este efecto puede variar según las condiciones de aplicación.

El incremento del número de revoluciones en el molino PFI acelera los cambios morfológicos en las fibras, la micrografía del tratamiento control [k] a 3000 rev. (Figura 6-12) muestra más uniones y cambios estructurales a las obtenidas a 1500 rev., y con un biorefinado se potencian los cambios morfológicos en las fibras. El refinado a 3000 rev. presenta diferencias entre la aplicación de la celulasa Cel9B y el dominio catalítico GH9-CBD3c (Figura 6-12), la enzima Cel9B en el refinado a 3000 rev. provoca mayor unión entre fibras generando una superficie compacta en la que no es posible distinguir la estructura inicial e individual de las fibras porque están completamente enlazadas, mientras que en el dominio catalítico GH9-CBD3c se aprecia una marcada fibrillación externa que consecuentemente favorecen los enlaces interfibrilares.

Las imágenes de los dominios de unión a celulosa presentan variaciones en comparación al control [k], Fn3-CBD3b indica deslaminación y modificación superficial, este resultado confirma que el dominio de unión a fibronectina tipo III [Fn3] altera la superficie de las fibras (Kataeva et al., 2002) y cumple una función en la hidrólisis de celulosa. La micrografía del dominio CBD3b tiene similitud al control, no sugiere cambios significativos en las fibras, sin embargo los resultados obtenidos con las

propiedades de resistencia en el papel y la micrografía CBD3b obtenida a 1500 rev. (Figura 6-11) no permiten descartar los efectos del dominio de unión a celulosa CBD3b.

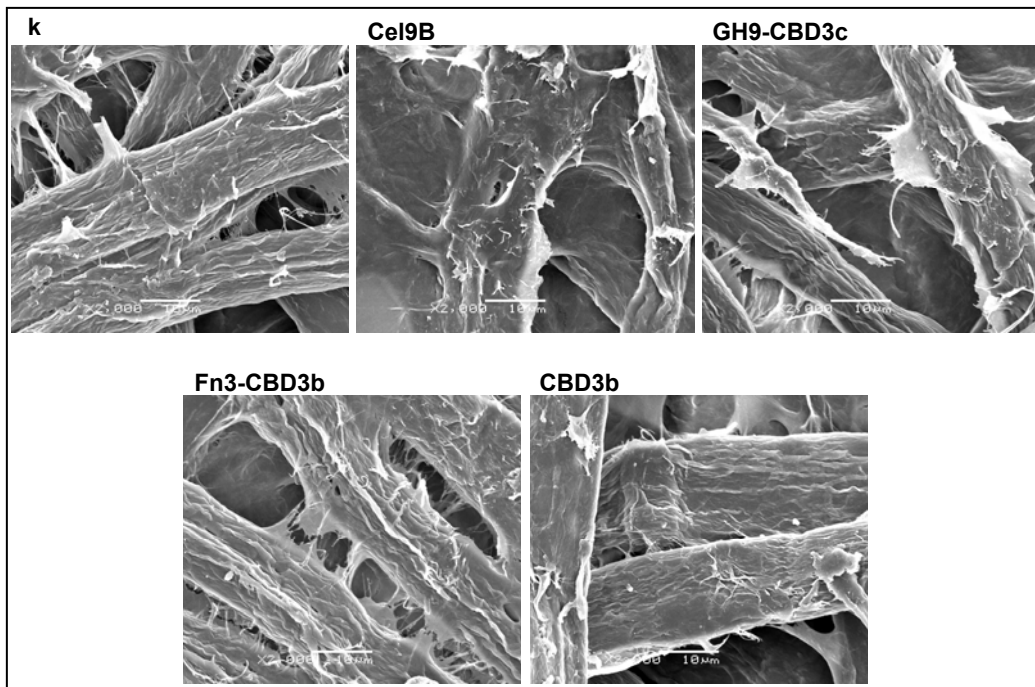


Figura 6-12. Micrografías de microscopía SEM de pasta TCF refinada a 3000 rev. Evaluación enzimática sobre la morfología de las fibras

Los componentes de la enzima Cel9B [GH9-CBD3c - Fn3 - CBD3b] tienen una función específica en la hidrólisis de la celulosa, donde el dominio catalítico GH9-CBD3c ejerce indiscutible contribución en la modificación de las fibras y los dominios de unión a celulosa [CBDs] son partes necesarias en la enzima para obtener mayor contribución en la operación de biorefinado, estos dominios facilitan la asociación de la enzima al sustrato e incrementan la actividad específica de Cel9B en las superficies celulósicas generando mayor capacidad hidrolítica.

En la Figura 6-13 se presentan micrografías que corresponden a la sección transversal del papel (dirección Z), estas imágenes proporcionan otra importante información del efecto de la enzima Cel9B y sus dominios en la consolidación de la red fibrosa durante la formación del papel. La sección transversal del papel permite verificar diferencias entre los tratamientos k y Cel9B; en el control se observa que las fibras no se encuentran totalmente enlazadas mostrando una red fibrosa con mayor

porosidad, en contraste a este comportamiento el tratamiento Cel9B presenta una estructura fuertemente cerrada y compacta, el dominio catalítico [GH9-CBD3c] también ejerce compactación en el manto fibroso; la enzima completa Cel9B y el dominio catalítico [GH9-CBD3c] realizan mayor fibrillación incrementando la capacidad de enlaces, este es uno de los efectos más importantes de la operación de refinado. Con respecto a los dominios de unión a celulosa se observa que Fn3-CBD3b y CBD3b provocan compactación de las fibras con respecto al tratamiento control por consiguiente se confirma la influencia de estos componentes de Cel9B en la formación de la hoja.

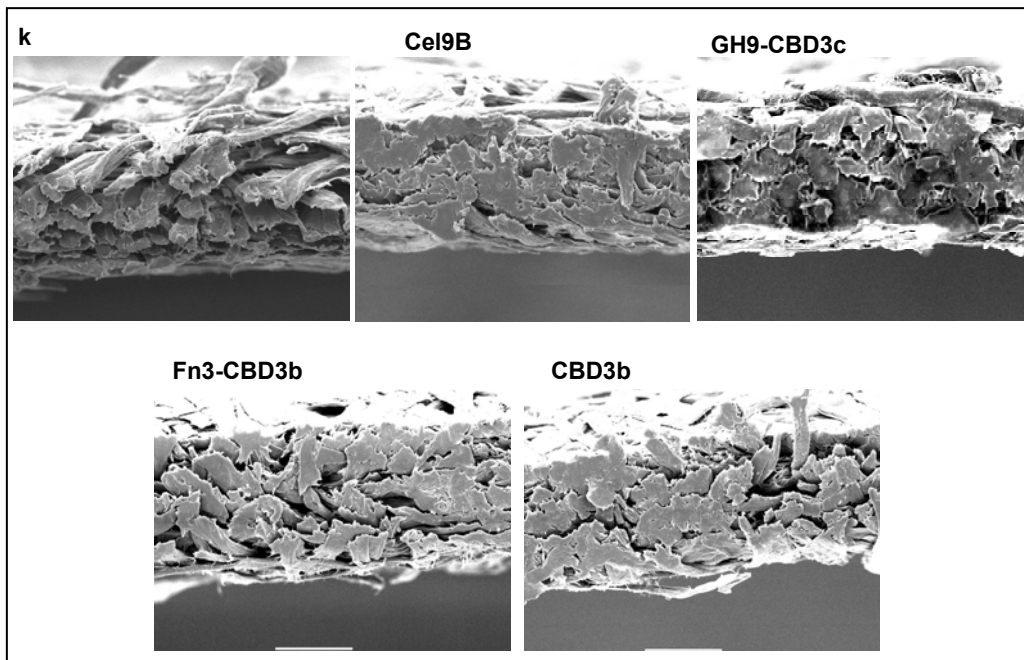
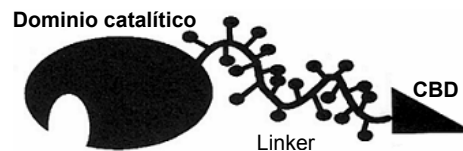


Figura 6-13. Micrografías de microscopía SEM de pasta TCF refinada a 1500 rev. Evaluación enzimática sobre la morfología de las fibras [corte transversal]

La modificación morfológica de las fibras celulósicas mayoritariamente observada con la aplicación de la enzima Cel9B se asocia con la disminución del 12% en la viscosidad específica con respecto al tratamiento control [689 mL/g] (Figura 6-14), este efecto es inferior al observado por otros autores con la aplicación de una endoglucanasa (Suurnakki et al., 2000). Con el dominio catalítico [GH9-CBD3c] y los dominios de unión a celulosa [Fn3-CBD3b y CBD3b] no se detecta alteración de la viscosidad; estos resultados indican concretamente que los CBDs contribuyen a la asociación del dominio catalítico al sustrato y generan cambios en la superficie fibrosa sin presentar actividad hidrolítica. Aunque existe un efecto sinérgico entre el dominio

catalítico y los dominios de unión a celulosa; el dominio CBD3c cumple una función auxiliar para GH9 (Irwin et al., 1998; Zverlov et al., 2003), su delección causa un descenso drástico en la actividad enzimática de la proteína y no presenta capacidad de unión a celulosa cristalina, como la observada con el dominio CBD3b, confirmando así su función de auxiliar (Cadena et al., 2008). El resultado de viscosidad para la enzima Cel9B también puede estar vinculado con la presencia de glucosa en los efluentes del tratamiento, encontrándose valores de 60.7 $\mu\text{g G/mL}$, mientras que con el dominio catalítico GH9-CBD3c se detecta un valor de glucosa equivalente a 39.9 $\mu\text{g G/mL}$ sin causar efecto en la determinación de viscosidad.

Tratamientos	Viscosidad mL/g
K	689 \pm 9
Cel9B	603 \pm 30
GH9-CBD3c	685 \pm 13
Fn3-CBD3b	693 \pm 36
CBD3b	683 \pm 15



Las celulasas recombinantes no interfieren en el grado de polimerización de la pasta TCF, a las condiciones de temperatura, pH y dosis aplicada.

Figura 6-14. Efecto de la enzima Cel9B y celulasas recombinantes en la viscosidad específica de la pasta TCF. -Representación adaptada de una celulasa (Henrissat, 1994)-

6.4 CONCLUSIONES

La celulasa modular -Cel9B- modifica la estructura física de las fibras y su efecto es atribuido mayoritariamente a la función del dominio catalítico GH9-CBD3c, este dominio realiza incrementos significativos de un 5% en el índice de retención del agua y del 25% en la resistencia al drenaje con respecto a una pasta de referencia. La celulasa recombinante GH9-CBD3c, por si sola es capaz de realizar un biorefinado, acelera los efectos del trabajo mecánico realizado por el molino PFI, en el cual se evidencian cambios positivos en los efectos primarios y secundarios del refinado.

La aplicación de las enzimas truncadas GH9-CBD3c, Fn3-CBD3b y CBD3b en el refinado de la pasta kraft TCF (*Eucalyptus globulus*) muestran una marcada influencia sobre la morfología de las fibras, dando lugar a significativas variaciones en las propiedades fisicomecánicas de la pasta y del papel. Resaltan los resultados obtenidos con el dominio catalítico (GH9-CBD3c), su efecto contrastado con la celulasa completa Cel9B permite deducir una importante influencia en el proceso de

refinado, al mejorar de forma similar las propiedades de resistencia a rotura por tracción, estallido y con una innovadora respuesta en la determinación de la resistencia al desgarro. El dominio catalítico GH9-CBD3c genera un índice de desgarro superior al conseguido con la enzima Cel9B; esta celulasa recombinante es una alternativa potencial para conferir resistencia al papel, y que puede actuar sin los dominios de unión a celulosa (Fn3-CBD3b y CBD3b).

El conjunto de las propiedades biométricas de las fibras demuestran la función del dominio catalítico GH9-CBD3c y de los dominios de unión a celulosa. Los resultados de longitud de fibra, cantidad de finos y ancho de fibra indican que en la hidrólisis de la celulosa existe un sinergismo entre los diferentes dominios de la enzima Cel9B y se mantiene que los dominios de unión a celulosa cumplen una función en la modificación morfológica de las fibras.

Los dominios Fn3-CBD3b y CBD3b presentan menor actividad sobre el refinado, sin embargo no se descarta su efecto en la modificación superficial de las fibras. Las nuevas celulasas construidas por ingeniería proteica modifican la superficie y las propiedades de las fibras de celulosa de forma diferente al refinado mecánico, y posibilitan la obtención de nuevos materiales celulósicos de aplicación en biotecnología.

El dominio de unión a celulosa CBD3b interfiere en la permeabilidad del papel sin causar una disminución en la longitud de fibra y generación de finos secundarios, este dominio realiza una modificación superficial en las fibras, su principal contribución en la morfología de las fibras se correlaciona con efectos de fibrillación.

Los resultados de las propiedades fisicomecánicas de los papeles obtenidos con el dominio Fn3-CBD3b fluctúan con el efecto del dominio CBD3b, colocando en manifiesto la interferencia del dominio de unión a fibronectina tipo III [Fn3] enmascara la acción del dominio CBD3b, y por las pequeñas desviaciones observadas con respecto al tratamiento control no se descarta un posible efecto sobre la modificación de las fibras y en consecuencia en las propiedades de resistencia, una confirmación de esta hipótesis sugiere la delección y ensayo individual del dominio Fn3.

La enzima Cel9B no modifica significativamente la viscosidad de la pasta TCF, un descenso de 85 mL/g respecto al tratamiento control, no generan pérdidas en las propiedades fisicomecánicas del papel. Con las celulasas truncadas GH9-CBD3c, Fn3-CBD3b y CBD3b no se observó disminución del grado de polimerización de la celulosa.

6.5 BIBLIOGRAFÍA

- Bolam, D.N., Ciruela, A., Mason, S.M., Simpson, P., Williamson, M.P., Rixon, J.E., Boraston, A., Hazlewood, G.P. and Gilbert, H.J., 1998. *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochemical Journal*, 331(3): 775-781.
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J. and Davies, G.J., 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal*, 382(3): 769-781.
- Cadena, E.M., Chiriac, I.A., Vidal, T., Pastor, F.I.J., Díaz, P. and Torres, A.L., 2006. Aplicación de Celulasa Cel9B en Refinado de Pasta de Eucalipto ECF. IV Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel, CIADICYP-2006, Santiago - Valdivia, Chile.
- Cadena, E.M., Chiriac, I.A., Vidal, T., Pastor, F.I.J., Díaz, P. and Torres, A.L., 2007. Improving mechanical properties of chemical pulps by enzymatic modification. 10th International Congress on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, 10th ICBPPI-2007, Wisconsin - Estados Unidos.
- Cadena, E.M., Chiriac, I.A., Vidal, T., Pastor, F.I.J., Díaz, P. and Torres, A.L., 2008. Aplicación de celulasas y dominios de unión a celulosa recombinantes en el refinado de la pasta kraft TCF (*Eucalyptus globulus*). V Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel, CIADICYP-2008, Guadalajara, México.
- Carrard, G., Koivula, A., Soderlund, H. and Beguin, P., 2000. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(19): 10342-10347.
- Dienes, D., Egyházi, A. and Réczey, K., 2004. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. *Industrial Crops and Products*, 20(1): 11-21.
- Fardim, P. and Duran, N., 2003. Modification of fibre surfaces during pulping and refining as analysed by SEM, XPS and ToF-SIMS. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 223(1-3): 263-276.
- Ferreira, P.J., Matos, S. and Figueiredo, M.M., 1999. Size characterization of fibres and fines in hardwood kraft pulps. *Particle and Particle Systems Characterization*, 16(1): 20-24.
- García Hortal, J.A., 2007. *Fibras Papeleras*. Edicions UPC, Barcelona, 243 pp.
- Helmer, R.J.N., Covey, G.H., Raverty, W.D., Vanderhoek, N., Sardjono, A.A. and Chau, T., 2006. Laboratory simulation of the effects of refining on paper formation. *Appita Journal*, 59(4): 291-296.
- Henrissat, B., 1994. Cellulases and their interaction with cellulose. *Cellulose*, 1(3): 169-196.

- Irwin, D., Shin, D.H., Zhang, S., Barr, B.K., Sakon, J., Karplus, P.A. and Wilson, D.B., 1998. Roles of the catalytic domain and two cellulose binding domains of *Thermomonospora fusca* E4 in cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, 180(7): 1709-1714.
- Kataeva, I.A., Seidel Iii, R.D., Shah, A., West, L.T., Li, X.L. and Ljungdahl, L.G., 2002. The fibronectin type 3-like repeat from the *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase CbHa promotes hydrolysis of cellulose by modifying its surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9): 4292-4300.
- Kerekes, R.J., 2005. Characterizing refining action in PFI mills. *Tappi Journal*, 4(3): 9-14.
- Lemos, M.A., Teixeira, J.A., Domingues, M.R.M., Mota, M. and Gama, F.M., 2003. The enhancement of the cellulolytic activity of cellobiohydrolase I and endoglucanase by the addition of cellulose binding domains derived from *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1): 35-40.
- Mohlin, U.B., 1997. Fibre development during mechanical pulp refining. *Journal of Pulp and Paper Science*, 23(1): 28-33.
- Mohlin, U.B. and Miller, J., 1995. Industrial Refining - Effects of Refining Conditions on Fibre Properties. Proc. 3rd International Refining Conference, Atlanta. (4): 1-13 pp.
- Pages, S., Gal, L., Belaich, A., Gaudin, C., Tardif, C. and Belaich, J.P., 1997. Role of scaffolding protein CipC of *Clostridium cellulolyticum* in cellulose degradation. *Journal of Bacteriology*, 179(9): 2810-2816.
- Pala, H., Mota, M. and Gama, F.M., 2002. Enzymatic modification of paper fibres. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(5): 353-361.
- Pastor, F.I.J., Pujol, X., Blanco, A., Vidal, T., Torres, A.L. and Diaz, P., 2001. Molecular cloning and characterization of a multidomain endoglucanase from *Paenibacillus* sp BP-23: evaluation of its performance in pulp refining. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(1): 61-68.
- Pinto, R., Amaral, E., Costa, A.P., Gama, M. and Duarte, A.P., 2004. Improving papermaking with cellulose-binding domains. III Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel, CIADICYP-2004, Córdoba, España.
- Pulkkinen, I., Ala-Kaila, K. and Aittamaa, J., 2006. Characterization of wood fibers using fiber property distributions. *Chemical Engineering and Processing*, 45(7): 546-554.
- Rabinovich, M.L., Melnick, M.S. and Bolobova, A.V., 2002. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry*, 67(8): 850-871.
- Retulainen, E., 1996. Fibre properties as control variables in papermaking? Part 1. Fibre properties of key importance in the network. *Paperi ja Puu/Paper and Timber*, 78(4): 187-194.

- Retulainen, E. and Nieminen, K., 1996. Fibre properties as control variables in papermaking? Part 2. Strengthening interfibre bonds and reducing grammage. *Paperi ja Puu/Paper and Timber*, 78(5): 305-312.
- Suurnakki, A., Tenkanen, M., Siika-Aho, M., Niku-Paavola, M.L., Viikari, L. and Buchert, J., 2000. *Trichoderma reesei* cellulases and their core domains in the hydrolysis and modification of chemical pulp. *Cellulose*, 7(2): 189-209.
- Tappi-271, om-02 Fiber length of pulp and paper by automated optical analyzer using polarized light.
- Tomme, P., Warren, R.A. and Gilkes, N.R., 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 37(1): 1-81.
- Wang, X., Maloney, T.C. and Paulapuro, H., 2007. Fibre fibrillation and its impact on sheet properties. *Paperi ja Puu/Paper and Timber*, 89(3): 148-151.
- Zverlov, V.V., Velikodvorskaya, G.A. and Schwartz, W.H., 2003. Two new cellulosome components encoded downstream of cell in the genome of *Clostridium thermocellum*: the non-processive endoglucanase CelN and the possibly structural protein CseP. *Microbiology*, 149(2): 515-524.

CAPÍTULO 7.

Aplicación del sistema lacasa-mediador en pastas blanqueadas TCF y ECF

*El sistema lacasa-mediador se está utilizando ampliamente en investigaciones relacionadas con los procesos de blanqueo, los resultados demuestran que esta aplicación biotecnológica permite obtener secuencias de blanqueo con alta selectividad (viscosidad/número kappa) y menor consumo de agentes de blanqueo, su acción se relaciona con la degradación de la lignina; existe escasa información sobre posibles efectos en la composición química de la celulosa y en el refinado de las pastas, por este motivo en esta investigación se aplica el sistema lacasa-mediador en pastas blanqueadas TCF y ECF (*Eucalyptus globulus*) cuyo contenido de lignina residual es insignificante ($NK \leq 1.0$). En la pasta TCF, la aplicación de la enzima lacasa (*Trametes villosa*) junto con el mediador HBT (1-hidroxibenzotriazol) produce un descenso de los grupos carboxilos, efecto que se vincula directamente con la remoción parcial de los ácidos hexenurónicos, este resultado genera expectativas para incrementar la estabilidad de la blancura en las pastas TCF. A su vez el sistema lacasa-mediador no tiene influencia negativa en el refinado de las pasta; al no producir una degradación de la celulosa no se presenta pérdidas en la resistencia del papel, y este comportamiento también puede estar influenciado por la variación de las propiedades electrocinéticas como el potencial ζ y la demanda catiónica.*

7.1 INTRODUCCIÓN

La introducción de enzimas oxidoreductasas en los mecanismos de deslignificación ha revelado un valor añadido en la obtención de secuencias que permiten la obtención de pastas con alta blancura ISO junto con un ahorro de reactivos químicos requeridos en los procesos de blanqueo (Bourbonnais and Paice, 1996; Sigoillot et al., 2005). Las enzimas oxidativas cumplen una importante función en la biodegradación de la lignina

(Ibarra et al., 2007; Widsten et al., 2002), específicamente en este campo las investigaciones realizadas con lacasas demuestran su potencial para oxidar la lignina y compuestos modelo en presencia de mediadores redox de bajo peso molecular (Kleen et al., 2003; Shleev et al., 2006), esta interacción es conocida como el sistema lacasa-mediador, siendo el HBT (1-hidroxibenzotriazol) y el ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) los mediadores más utilizados hasta el momento (Bajpai, 2004; Morozova et al., 2007), actualmente son paulatinamente reemplazados por mediadores naturales que presentan mayores ventajas económicas y medioambientales, además su tendencia a acoplarse a las fibras genera nuevas perspectivas para funcionalizar y modificar las propiedades de las fibras celulósicas (Aracri et al., 2008; Moldes et al., 2008).

La efectividad del sistema lacasa-mediador depende fundamentalmente de las condiciones de aplicación (dosis, temperatura, pH, tiempo, consistencia, concentración de oxígeno). Una exploración de las variables que intervienen en el sistema oxidativo permite optimizar la degradación de la lignina (Fillat, 2008; Ibarra et al., 2006; Moldes and Vidal, 2008) y obtener mayor reducción en el número kappa junto con propiedades ópticas favorables; estos estudios proveen importante información sobre los parámetros que influyen en la cinética de deslignificación, y sugieren una posible estandarización de un proceso de bioblanqueo industrial.

El sistema lacasa-mediador en comparación a otras aplicaciones biotecnológicas como la utilización de xilanasas en el blanqueo (Bajpai et al., 2006; Roncero et al., 2005) presenta mayor especificidad sobre las fracciones fenólicas y no fenólicas de la lignina disminuyendo las pérdidas de rendimiento. Según algunos autores el sistema lacasa-mediador forma radicales de oxígeno que actúan sobre la lignina y a su vez puede oxidar la celulosa a grupos carbonilos (Camarero et al., 2004; García et al., 2003) que en posteriores etapas alcalinas por una reacción de β -eliminación causa cortes en la cadena polimérica de la celulosa; este efecto varía según el tiempo de tratamiento, para aplicaciones inferiores a 4 horas del sistema lacasa-mediador no se ha observado una significativa evolución de la viscosidad específica, eliminando la interferencia del sistema oxidativo sobre la degradación de la celulosa (Bourbonnais and Paice, 1996; Herpoel et al., 2002).

Además de la principal función del sistema lacasa-mediador en los procesos de deslignificación y blanqueo, es escasa la información sobre efectos secundarios en la composición química de la pasta; si existe una oxidación de la celulosa la probabilidad de interferir en la operación del refinado y en las propiedades fisicomecánicas del papel es alta debido a la disminución de la viscosidad específica. En pastas químicas

con alto contenido de lignina la aplicación del sistema lacasa-mediador favorece la operación de refinado incrementando la resistencia en papel cartón al contribuir en la formación de enlaces interfibrilares por la liberación de la lignina (Chakar et al., 1998; Wong et al., 1999).

Debido a la escasa información sobre los efectos del sistema lacasa-mediador en la celulosa (composición química) en esta investigación se plantea verificar directamente si el sistema lacasa-mediador es capaz de oxidar la celulosa y encontrar posibles efectos en la operación del refinado. Para alcanzar este objetivo se realizan tratamientos sobre pastas kraft TCF y ECF de *Eucalyptus globulus* cuyo contenido de lignina residual es bajo.

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La aplicación del sistema lacasa-mediador se efectúa sobre pastas kraft TCF y ECF, tras un lavado ácido (pH 4.0 durante 30 minutos), utilizando 20 IU/g p.s. de lacasa comercial (*Trametes villosa*) de Novozymes® y 2% g p.s. de mediador HBT. Las condiciones de aplicación del sistema lacasa-mediador [L_{HBT}] incluye tratamientos en un reactor en presencia de Tween 80 (0.05% p/v) a una consistencia del 5%, presión 6 kg/cm², pH 4.0 (Tartrato de Sodio 50 mM) con una duración de 4 horas [L 4H] y 24 horas [L 24H].

La caracterización del efecto del sistema lacasa-mediador en las pastas papeleras se realiza con la determinación del contenido de ácidos hexenurónicos (Chai et al., 2001; Gellerstedt and Li, 1996), número kappa, blancura, viscosidad específica, grupos funcionales (carbonilo y carboxilo) y propiedades electrocinéticas (potencial ζ , demanda catiónica por potencial de flujo y titulación coloidal). El efecto del sistema lacasa-mediador también se analiza en la operación de refinado con las propiedades físicas de la pasta (°SR, %IRA) y propiedades fisicomecánicas del papel (permeabilidad, densidad, tracción, estallido, desgarro y plegado).

Posterior a la aplicación enzimática se realiza una etapa de extracción alcalina [E] para eliminar residuos del tratamiento L_{HBT} y determinar la blancura ISO; la extracción se efectúa durante 120 minutos a una temperatura de 90 °C en un reactor Easydye de Datacolor al 5% de consistencia y 1.5% de NaOH.

Con el fin de determinar la oxidación de la celulosa tras la aplicación del sistema lacasa-mediador se aplica una etapa reductora [R]; en esta etapa se utiliza un agente

reductor (NaBH_4 2%) durante 30 minutos a una consistencia del 5% y temperatura ambiente.

7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1 Efecto de L_{HBT} sobre el número kappa y ácidos hexenurónicos

La caracterización inicial de la pasta TCF revela que la aplicación del sistema lacasa-mediador (4 y 24 horas) modifica el número kappa [NK] y el contenido de ácidos hexenurónicos [HexAs] (Tabla 7-1); en principio podría parecer que la enzima lacasa de *Trametes villosa* en presencia de HBT reduce el contenido de lignina residual al obtenerse valores inferiores del número kappa con respecto a la pasta inicial [PI] y los tratamientos control [kL]. Se debe tener en cuenta que el número kappa es una medida indirecta de la cantidad de lignina presente en las pastas papeleras pero que su determinación estándar está influenciada por estructuras sensibles a la oxidación del permanganato de potasio (Vuorinen et al., 1999), entre estas estructuras se encuentran los ácidos hexenurónicos (Li and Gellerstedt, 1998) donde el permanganato de potasio puede reaccionar con los dobles enlaces carbono-carbono presentes en la estructura.

Tabla 7-1. Efecto del sistema lacasa-mediador en la pasta TCF

Tratamientos	Número kappa	HexAs ($\mu\text{mol/g p.s.}$)
PI	5,0 \pm 0,1	35,40 \pm 1,10
kL 4H	4,9 \pm 0,0	32,04 \pm 1,10
L 4H	3,9 \pm 0,0	27,33 \pm 0,98
kL 24H	4,1 \pm 0,0	29,35 \pm 0,94
L 24H	3,7 \pm 0,0	21,42 \pm 1,02

La principal causa de la disminución del número kappa observada con la aplicación del sistema lacasa-mediador se debe a la eliminación de HexAs y no a la degradación de otras estructuras oxidables como la lignina residual -en el tratamiento L 4H existe una remoción de HexAs de $4.71 \mu\text{mol/g p.s.}$ y en L 24H un valor de $7.92 \mu\text{mol/g p.s.}$ con respecto al tratamiento control kL-, así lo demuestra la remoción química de los HexAs [TCF_HexAs] (hidrólisis ácida con acetato de mercurio) en la pasta inicial TCF

[PI: 5.0 NK] y en los tratamientos L_{HBT} , la remoción de HexAs produce un descenso del número kappa del 80% en la pasta inicial TCF y en los tratamientos enzimáticos se obtienen valores de número kappa equivalentes a la pasta control kL (Figura 7-1).

La interferencia de los HexAs en el número kappa varía según el tipo de pasta, algunos autores manifiestan que por cada 10 μmol de HexAs se incrementa el número kappa en 0.86 unidades en pastas *Abedul* (Li and Gellerstedt, 1997), 0.9 unidades en pastas *Pinus radiata* (Allison et al., 1999), 1.05 en pastas *Eucalyptus globulus* (Valls, 2008); y de acuerdo a los resultados obtenidos en la pasta TCF existe una contribución de 1.24 (relación polinómica), aparentemente, en las pastas que presentan bajo contenido de lignina residual mayor es la contribución de los HexAs al número kappa (Nelson et al., 1998; Valls, 2008).

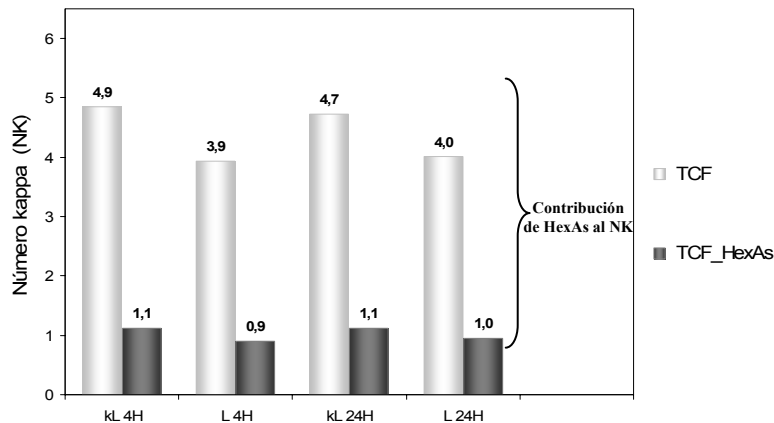


Figura 7-1. Influencia de los ácidos hexenurónicos en el número kappa

El número kappa total [NK] (Ec.7-1) corresponde a la suma del número kappa por contribución de la lignina residual [NK_{Lig}], por el contenido de ácidos hexenurónicos [NK_{HexAs}], y otras estructuras [NK_{OE}] derivadas de carbohidratos, grupos carbonilo, extractivos (Li and Gellerstedt, 2002) y compuestos que puedan reaccionar con el agente oxidante (permanganato) como el oxalato cálcico (Costa and Colodette, 2007; de la Rosa, 2003; Roncero, 2001). Los ácidos hexenurónicos contribuyen a la formación de oxalato cálcico (Costa and Colodette, 2002) causando serios problemas de incrustaciones en los procesos de blanqueo, por consiguiente es fundamental controlar la presencia de HexAs, convirtiéndose el sistema lacasa-mediador en una alternativa potencial.

La remoción del contenido de ácidos hexenurónicos en pastas blanqueadas por la acción de la enzima lacasa y el mediador HBT permite una cuantificación más

aproximada de la cantidad de lignina residual, y al mismo tiempo se generan expectativas para contrarrestar el efecto de los ácidos hexenurónicos en la reversión de la blancura (Buchert et al., 1997; Kawae and Uchida, 2005) y mantener la estabilidad de las propiedades ópticas en el papel.

$$NK = NK_{Lig} + NK_{HexAs} + NK_{OE} \quad \text{Ec. 7-1}$$

La aplicación de L_{HBT} y su influencia en la remoción de los HexAs se puede relacionar adicionalmente a la reducción del contenido de ácidos carboxílicos; en la Figura 7-2a se observa que los tratamientos L_{HBT} en la pasta TCF modifican hasta el 27% [L 24H] del contenido total de grupos carboxilos presentes en las pastas control [kL]. En la pasta ECF, con bajo contenido en HexAs ($0.2 \mu\text{mol/g p.s.}$), la cantidad inicial de grupos carboxilos (COOH: $6.75 \text{ mmol}/100\text{g p.s.}$) no presenta ninguna alteración significativa tras la aplicación del sistema lacasa-mediador reportando valores análogos a su tratamiento control [kL_ECF] (COOH: $6.80 \text{ mmol}/100\text{g p.s.}$), estos resultados permiten asegurar que la reducción del contenido de ácidos carboxílicos se encuentra directamente relacionados con la remoción de ácidos hexenurónicos; esta teoría concuerda con otros autores (Bhardwaj et al., 2006; Chai et al., 2003).

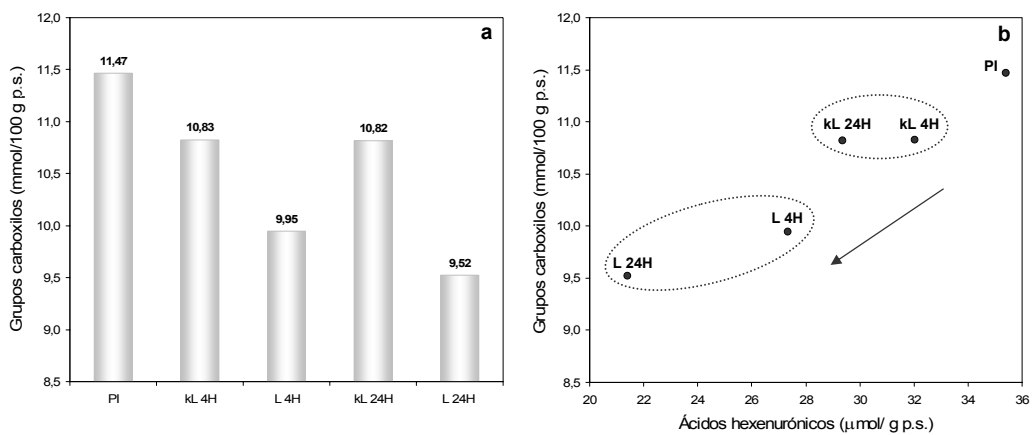


Figura 7-2. Relación de grupos carboxilos (a) y ácidos hexenurónicos (b) en la pasta TCF tratada enzimáticamente (L_{HBT})

En las fibras celulósicas los grupos carboxilos se relacionan principalmente al contenido de lignina, hemicelulosas y celulosa oxidada; de esta manera en los procesos de deslignificación los grupos carboxilos disminuyen por la disolución de hemicelulosas y remoción de lignina. El ácido 4-O-metilglucurónico es un compuesto

asociado a los grupos carboxilos (Chai et al., 2003), en el proceso kraft este ácido puede ser completamente catalizado generando HexAs por la eliminación del grupo metanol (Isogai et al., 1997; Tenkanen et al., 1999), este fundamento expresa que la remoción de HexAs puede alterar el contenido de grupos funcionales -específicamente el contenido de ácidos carboxílicos- en las pastas químicas.

En el caso particular de la pasta TCF, que se caracteriza por presentar un bajo contenido de lignina residual [$NK_{Lig} \leq 1.0$], la reducción de los grupos carboxilos por efecto del sistema lacasa-mediador se explica con la eliminación de HexAs (Figura 7-2b). La remoción química de los HexAs con acetato de mercurio en la pasta inicial TCF [TCF_HexAs] disminuye el contenido de ácidos carboxílicos a 6.57 mmol/100g p.s. reduciendo en un 43% los grupos ionizables con respecto a la pasta inicial TCF [COOH: 11.47 mmol/100g p.s.].

Para la efectividad de la lacasa (*Trametes villosa*) sobre los grupos carboxilos es necesaria la utilización del mediador (HBT); el potencial redox de la lacasa no es suficiente para modificar los HexAs y los ácidos carboxílicos, únicamente existe un efecto con la aplicación del sistema lacasa-mediador [L_{HBT}], así lo revelan los tratamientos realizados en la pasta TCF durante 4 y 24 horas con la enzima lacasa y sin el mediador HBT; el contenido de carboxilos en estos tratamientos es equivalente a 11.39 ± 0.55 mmol/100g p.s. siendo este valor similar al de la pasta inicial; al igual que en los procesos de deslignificación la enzima lacasa requiere un mediador para efectuar la oxidación de la lignina, sin mediador la deslignificación es ineficiente (Poppius-Levlin et al., 1999).

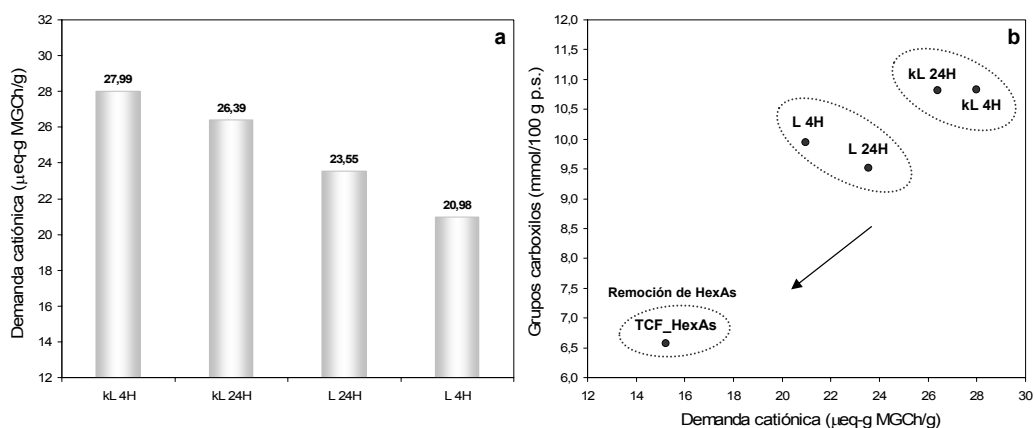


Figura 7-3. Evolución de la demanda catiónica (titulación coloidal) y grupos carboxilos con la aplicación de L_{HBT} en la pasta TCF

El contenido de grupos carboxilos sobre la superficie de las fibras influye en los fenómenos de adsorción/retención de aditivos catiónicos utilizados en la industria del papel (Duarte et al., 2006); con el tratamiento enzimático se produce una disminución de este grupo funcional, por lo que el sistema lacasa-mediador interfiere en el consumo de agentes auxiliares. El análisis de la carga superficial de las fibras realizada con la adsorción de un polímero catiónico de alto peso molecular (Metil-Glicol Chitosan -MGCh-) (Hubbe et al., 2007; Wagberg, 2000) y posterior titulación coloidal por retroceso utilizando un polímero de carga opuesta (Polivinil Sulfato Potásico -PVSK-) (Figura 7-3a) demuestra que L_{HBT} reduce la demanda catiónica de la suspensión fibrosa, este efecto se otorga a la remoción de los HexAs, tal como se visualiza en la Figura 7-3b la remoción química de los HexAs [TCF_HexAs] causa un descenso en el contenido de grupos carboxilos y en la demanda catiónica.

Las propiedades electrocinéticas (potencial ζ y demanda catiónica determinadas por potencial de flujo) indican que L_{HBT} disminuye el espesor de la doble capa eléctrica, como se observa en la Tabla 7-2 el potencial ζ experimenta una disminución con respecto a los tratamientos control kL por consiguiente existe mayor probabilidad que dos superficies se aproximen para establecer fuerzas de unión de Van der Waals por el efecto reducido de la repulsión de cargas y así favorecer los fenómenos de retención fibras-finos. En los procesos de blanqueo el potencial ζ disminuye debido a la degradación de la lignina y hemicelulosas (Bhardwaj et al., 2004b), en la aplicación enzimática L_{HBT} se debe a la remoción de ácidos hexenurónicos y consecutivamente al descenso de los ácidos carboxílicos. La demanda catiónica determinada por potencial de flujo (Tabla 7-2) no presenta cambios significativos; debe remarcar que este análisis se efectúa sobre aguas de filtrado y al tratarse de pastas que se encuentran lavadas con abundante agua descalcificada y desionizada la probabilidad de encontrar residuos aniónicos de los tratamientos enzimáticos es mínima.

Tabla 7-2. Efecto del sistema lacasa-mediador en propiedades electrocinéticas

Tratamientos	Potencial ζ mV	Demanda Catiónica meq/L
PI	-218,5	0,015
kL 4H	-211,8	0,013
L 4H	-174,0	0,018
kL 24H	-219,1	0,010
L 24H	-162,3	0,011

La remoción parcial de los HexAs con la lacasa y el HBT modifican las propiedades de las pastas, y en particular es de gran interés la influencia sobre los grupos carboxilos ya que son los principales grupos ionizables (Lindstrom, 1992) que intervienen en los mecanismos de hidratación (*swelling*) (Gellerstedt et al., 2000), en la retención de elementos finos y agentes químicos (Bhardwaj et al., 2006; Laine and Stenius, 1997) y en el refinado de las pastas (Duarte et al., 2006).

7.3.2 Oxidación de la celulosa

El sistema lacasa-mediador provoca un descenso en la viscosidad específica de la pasta TCF (Figura 7-4), existe una aparente degradación de la celulosa con una disminución máxima del 18% con respecto a los tratamientos control, este efecto también puede ser consecuencia de la modificación de grupos funcionales concretamente por la generación de grupos carbonilos -es posible que el tratamiento L_{HBT} sobre pastas blanqueadas sea capaz de oxidar la celulosa-. Con el sistema lacasa-mediador se forman especies radicales que actúan sobre la lignina (Moldes and Vidal, 2008; Palonen and Viikari, 2004), generando grupos carbonilo (Ibarra et al., 2006; Poppius-Levlin et al., 1999); al mismo tiempo pueden reaccionar sobre los hidratos de carbono produciendo una oxidación (Camarero et al., 2004) y consecutiva degradación con posteriores etapas alcalinas en los procesos de blanqueo generando marcadas disminuciones en la viscosidad de las pastas. El método analítico de viscosidad específica se realiza en medio alcalino utilizando cuprirentilendiamina como reactivo, por consiguiente la presencia de grupos carbonilos enmascaran el grado de polimerización al darse una reacción de β -eliminación (Odermatt et al., 1998). En pastas blanqueadas donde el contenido de lignina residual es mínimo ($NK_{\text{Lig}} \leq 1.0$) no existen estudios que demuestren oxidación de la celulosa con el sistema lacasa-mediador, por este motivo en la pasta TCF antes de asegurar una degradación se verifica si la etapa L_{HBT} genera grupos carbonilo tras la aplicación de una etapa reductora [R] con borohidruro de sodio (NaHBr_4).

Los resultados presentados en la Figura 7-4 revelan que la aplicación de la etapa reductora en la pasta tratada enzimáticamente [LR] incrementa la viscosidad específica en un 16% y 13% para los tratamientos de 4 y 24 horas respectivamente, estos porcentajes confirman que el sistema lacasa-mediador oxida la celulosa formando grupos carbonilos y se descarta una posible biodegradación o cortes en la cadena celulósica. De acuerdo algunos autores, la formación del anión superóxido (O_2^-) y el radical libre OH^\bullet en el sistema lacasa-mediador (Zhou et al., 2009) facilitan los mecanismos de deslignificación, y al mismo tiempo el radical OH^\bullet reacciona con la

celulosa produciendo grupos carbonilos que, en posteriores etapas alcalinas, inducen a la disminución del grado de polimerización de la celulosa (Roncero et al., 2002); este efecto se verifica con la cuantificación analítica de los grupos funcionales, específicamente el tratamiento enzimático L_{HBT} en pastas blanqueadas incrementa el contenido de carbonilos en 1.63 y 2.49 mmol/100g p.s. con respecto a los tratamientos control -kL- de 4 y 24 horas.

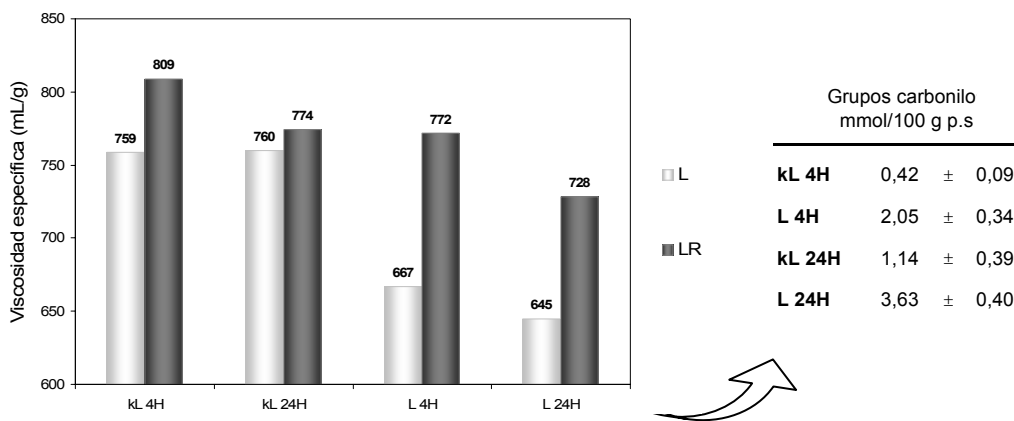


Figura 7-4. Viscosidad específica de la pasta TCF en las etapas L – LR, y contenido de grupos carbonilo

Los procesos de deslignificación estudiados con el sistema lacasa-mediador sugieren incluir una etapa R para conservar la viscosidad intrínseca de las pastas tras una extracción alcalina [E] (García, 2003). En la pasta TCF ($NK_{Lig} \leq 1.0$) tratada enzimáticamente L_{HBT} se aplica una etapa E al observar disminuciones en la blancura ISO, aparentemente en la pasta hay incrustaciones o residuos propios de los mecanismos de oxidación del sistema lacasa-mediador causando un descenso de 6 puntos con respecto al tratamiento control kL 4H (blancura: 86 %ISO), la etapa LE 4H (aplicación enzimática con posterior extracción alcalina) recupera el valor inicial de blancura (87 %ISO) generando pequeñas variaciones en el número kappa y el contenido de ácidos hexenurónicos tal como se indica en la Tabla 7-3. La introducción de la extracción alcalina [E] también permite verificar que tras una secuencia LRE no se producen cortes en la cadena celulósica, así la secuencia LRE 4H (Visc. 751 mL/g) presenta una viscosidad específica equivalente al tratamiento control kL 4H (Visc. 759 mL/g).

De acuerdo a los resultados del número kappa, no se puede apreciar detalladamente si el sistema lacasa-mediador modifica el contenido de lignina residual, las disminuciones ya observadas en el kappa se atribuyen al efecto enzimático sobre los

ácidos hexenurónicos (apartado 7.3.1); para comprobar una posible reducción de la lignina residual se determina el número kappa [NK] en pastas LE cuyo contenido de HexAs se han eliminado químicamente [LE_HexAs]; como resultados se encuentra un número kappa LE_HexAs similar al tratamiento control kLE_HexAs, por consiguiente se afirma que el sistema lacasa-mediador en pastas blanqueadas TCF no provoca una deslignificación y su efecto en el número kappa se debe principalmente a la remoción de HexAs.

Tabla 7-3. Propiedades de las pasta TCF, aplicación enzimática L_{HBT} y etapa E

Tratamientos	Número kappa (NK)		HexAs ($\mu\text{mol/g p.s.}$)	
	L	LE	L	LE
kL 4H	4,9 \pm 0,0	4,1 \pm 0,3	32,04 \pm 1,10	32,02 \pm 0,83
L 4H	3,9 \pm 0,0	3,7 \pm 0,0	27,33 \pm 0,98	26,92 \pm 0,51
kL 24H	4,1 \pm 0,3	4,4 \pm 0,0	29,35 \pm 0,94	28,14 \pm 0,42
L 24H	3,7 \pm 0,0	3,7 \pm 0,3	21,42 \pm 1,02	24,75 \pm 0,55

7.3.3 Efecto del sistema lacasa-mediador en el refinado

El refinado de las pastas L_{HBT} no indica una tendencia clara en la evolución de la resistencia al drenaje ($^{\circ}\text{SR}$) en comparación a los tratamientos control -kL-; en algunos puntos de refino existen fluctuaciones en el $^{\circ}\text{SR}$ para los tratamientos de 4 y 24 horas con disminuciones hasta en 5 $^{\circ}\text{SR}$ (Tabla 7-4), estos resultados no permiten generalizar que el sistema lacasa-mediador realice una modificación sobre las fibras que alteren la resistencia al drenaje. Con respecto al índice de retención de agua (%IRA) los tratamientos lacasa-mediador reducen levemente la capacidad de hidratación y retención de agua en las fibras celulósicas hasta un 3% en los tratamiento realizados a 24 horas; en el tratamiento de 4 horas se presenta una leve disminución a 3000 rev.

Tabla 7-4. Evolución de las propiedades físicas de la pasta refinada

PFI/rev.	Shopper-Riegler ($^{\circ}\text{SR}$)				I. Retención de agua (%IRA)			
	kL 4H	L 4H	kL 24H	L 24H	kL 4H	L 4H	kL 24H	L 24H
0	24	21	20	21	112	112	115	115
1500	43	45	38	37	139	138	137	135
3000	75	70	74	69	156	153	155	152
4500	83	84	82	80	167	171	167	162

Las propiedades de la pasta refinada con el sistema lacasa-mediador sugieren que la enzima oxidativa y el mediador HBT no influyen en el desarrollo de los efectos primarios del refinado (reducción de la longitud de fibra, formación de finos, fibrillación externa e interna), pero puede existir un posible efecto secundario sobre el sistema fibra-agua al disminuir el contenido de grupos carboxilos y ácidos hexenurónicos. Los resultados de viscosidad específica y el contenido de grupos carbonilos descartan una degradación de la celulosa, y aunque existe una modificación bioquímica de los componentes de la pasta TCF no se detecta una influencia negativa sobre las propiedades fisicomecánicas de los papeles obtenidos con las pastas refinadas tras 4 horas de tratamiento -L_{HBT} 4H- (Tabla 7-5) y 24 horas -L_{HBT} 24H- (Tabla 7-6).

Tabla 7-5. Propiedades fisicomecánicas del papel. Tratamientos L_{HBT} 4H en pastas TCF

PFI/rev.	PI				kL 4H				L 4H			
	0	1500	3000	4500	0	1500	3000	4500	0	1500	3000	4500
Volumen, cm ³ g ⁻¹	1,73	1,48	1,39	1,29	1,70	1,47	1,36	1,30	1,73	1,47	1,12	1,30
Pb Bendtsen, μm (Pa.s) ⁻¹	43,8	17,5	5,3	1,6	46,5	17,7	3,9	1,3	45,8	18,4	4,2	1,2
I. Desgarro, mN m ² g ⁻¹	6,75	10,54	10,55	9,71	4,78	10,38	10,60	9,95	7,22	12,21	10,97	9,68
R. Plegado, log(Nº.Pliegues)	0,99	2,72	3,09	3,37	0,85	2,31	3,27	3,35	1,02	2,71	3,28	3,38
I. Estallido, kPa m ² g ⁻¹	1,14	3,32	3,60	4,39	1,05	2,66	3,25	3,74	1,18	2,91	3,73	4,09
I. Tracción, Nm g ⁻¹	22,39	46,83	51,38	59,91	21,37	43,09	50,76	56,78	22,78	42,44	54,74	58,63

Tabla 7-6. Propiedades fisicomecánicas del papel. Tratamientos L_{HBT} 24H en pastas TCF

PFI/rev.	PI				kL 24H				L 24H			
	0	1500	3000	4500	0	1500	3000	4500	0	1500	3000	4500
Volumen, cm ³ g ⁻¹	1,73	1,48	1,39	1,29	1,70	1,48	1,35	1,23	1,72	1,47	1,36	1,31
Pb Bendtsen, μm (Pa.s) ⁻¹	43,8	17,5	5,3	1,6	46,5	20,1	4,1	1,3	47,1	17,7	4,2	1,4
I. Desgarro, mN m ² g ⁻¹	6,75	10,54	10,55	9,71	5,53	11,50	10,48	9,46	6,89	10,80	11,01	9,58
R. Plegado, log(Nº.Pliegues)	0,99	2,72	3,09	3,37	0,88	2,62	3,44	3,37	0,93	2,55	3,31	3,55
I. Estallido, kPa m ² g ⁻¹	1,14	3,32	3,60	4,39	1,12	2,58	3,44	3,89	1,16	2,78	3,68	3,96
I. Tracción, Nm g ⁻¹	22,39	46,83	51,38	59,91	22,55	41,94	51,35	59,78	22,90	41,74	52,61	60,93

En el análisis de las propiedades físicas se encuentra que la evolución de la permeabilidad Bendtsen en función del número de revoluciones tiene un comportamiento similar a las propiedades de las pastas (°SR, %IRA), no existe una tendencia que permita asegurar la obtención de papeles más porosos o, en efecto contrario, papeles más cerrados con los tratamientos enzimáticos, manteniéndose en

todos los caso un volumen específico similar; además el contraste con la pasta inicial TCF [PI] no permite obtener conclusiones que indiquen la influencia de las condiciones de operación (presión, temperatura y pH) de los respectivos tratamientos en la permeabilidad del papel.

El sistema lacasa-mediador causa un ligero efecto sobre la resistencia al estallido en los cuatro puntos de refinado (Figura 7-5a), con una diferencia máxima de 0.48 kPa.m².g⁻¹ a 3000 rev. en el tratamiento de 4 horas. La eliminación de una influencia directa del sistema oxidativo sobre la morfología de las fibras permite vincular la resistencia del papel a las propiedades electrocinéticas, el sistema lacasa-mediador modifica el potencial ζ y demanda catiónica (carga superficial - titulación coloidal) de las pastas provocando una disminución en la carga iónica y consecuentemente en las fuerzas de repulsión entre los elementos finos y las fibras.

Algunos estudios relacionan los efectos del refinado sobre el potencial ζ y la carga de las fibras, afirmando que el refinado modifica las propiedades electrocinéticas de las pastas refinadas por un incremento en la concentración de carbohidratos y decrecimiento del contenido de lignina sobre el área superficial de las fibras (Bhardwaj et al., 2004a; Bhardwaj et al., 2007; Fardim and Holmbom, 2005); las propiedades del papel son altamente dependientes de las características físicas y químicas de las fibras, por consiguiente una modificación en las propiedades electrocinéticas influirá en la formación de enlaces fibra-fibra y en la resistencia del papel como producto final (Laine and Stenius, 1997). La carga superficial sufre alteraciones con los cambios morfológicos de las fibras celulósicas (Bhardwaj et al., 2004b), en la aplicación del sistema lacasa-mediador existe una variación de la carga superficial, respuesta que no se atribuye a una acción directa sobre las características físicas de las fibras, pero si al efecto realizado sobre los grupos ionizables (ácidos carboxílicos, HexAs,...) de la pasta TCF. La influencia de L_{HBT} sobre la carga superficial de las fibras observada con la disminución del potencial ζ y la demanda catiónica puede producir un mayor desarrollo en la resistencia a la rotura por presión -índice de estallido- al originarse más uniones interfibrilares por disminución de las fuerzas de repulsión en los sistemas fibra-fibra y finos-fibra.

La posible retención de partículas secundarias (finos) en el manto fibroso durante la formación del papel no genera una interferencia en la resistencia al drenaje y su relación con la resistencia al estallido (Figura 7-5b) resulta ser interesante al obtener para un mismo °SR valores superiores de resistencia con el sistema lacasa-mediador en comparación al tratamiento control. En las aplicaciones enzimáticas realizadas a 24 horas también se obtienen incrementos hasta de 0.24 kPa.m².g⁻¹, este valor es inferior

al que se consigue con menor tiempo de tratamiento, es posible que durante tratamientos extensos las fibras celulósicas sufran un deterioro que interfieran en la capacidad de cohesión de las fibras ó que tras 24 horas se produzca un descenso de la actividad enzimática al producirse una desactivación de la lacasa (Moldes and Sanromán, 2006; Sigoillot et al., 2005) ó porque se degrade el mediador (Freundenreich et al., 1998).

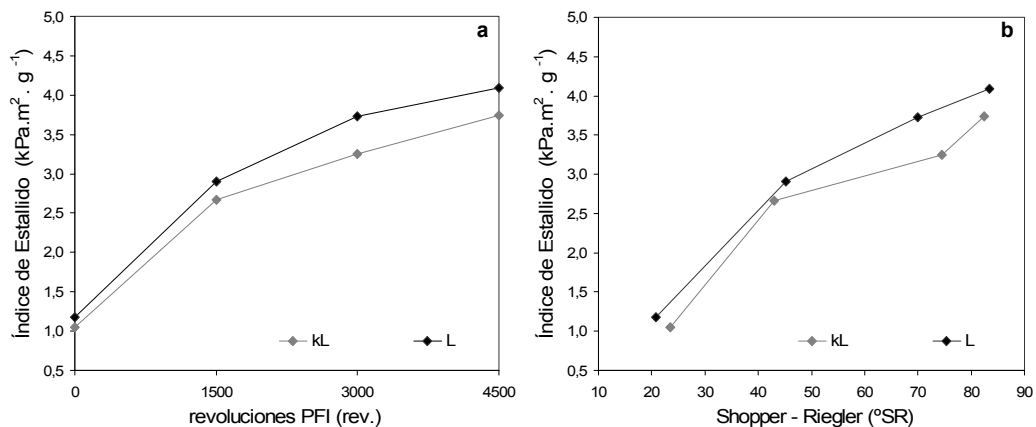


Figura 7-5. Relación del índice de estallido con el número de revoluciones (a) y el Shopper – Riegler (b). Tratamientos L_{HBT} durante 4 horas

La evolución de la resistencia a la tracción (Figura 7-6a) con el número de revoluciones del molino PFI entre los tratamientos enzimáticos L_{HBT} y el control kL es similar. Entre los principales factores que intervienen en la resistencia a la tracción se descarta la influencia del sistema lacasa-mediador en la reducción de la longitud de fibra y generación de partículas secundarias (finos), los cambios visualizados se vinculan a la cohesión interfibrillar que confiere un ligero incremento en la resistencia a la tracción y estallido (Figura 7-6b). En los tratamientos realizados a 24 horas la aplicación del sistema oxidativo tiene menor influencia sobre la resistencia a la tracción con relación a los tratamientos realizados a 4 horas. Estos resultados en comparación a otras investigaciones se han observado en pastas mecánicas (Mansfield, 2002; Wong et al., 2000) y en pastas kraft con alto contenido de lignina (Lund and Felby, 2001; Wong et al., 1999) pero en pastas blanqueadas este tipo de estudios no se encuentran referenciados, por consiguiente se genera expectativas con respecto a un efecto adicional del sistema lacasa-mediador en las propiedades de las pastas papeleras.

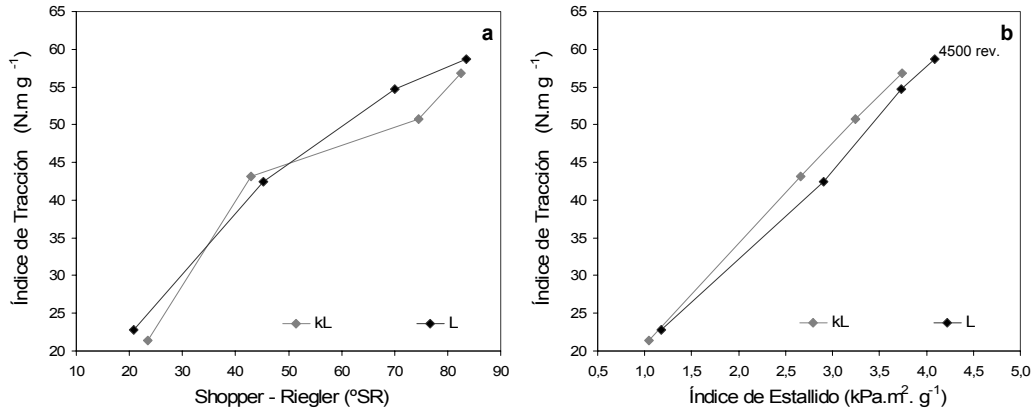


Figura 7-6. Evolución del índice de tracción con respecto al Shopper – Riegler (a) y al índice de estallido (b). Tratamientos L_{HBT} durante 4 horas

En el índice de desgarro, el sistema lacasa-mediador modifica los valores obtenidos en el tratamiento control (Figura 7-7a), específicamente a 4 horas de tratamiento se obtiene un mayor desarrollo de la resistencia al desgarro resaltando el punto máximo que corresponde a 1500 rev. este comportamiento es independiente del tiempo de tratamiento, a 24 horas los valores de resistencia siguen una tendencia superior al control. El efecto beneficioso de L_{HBT} sobre las propiedades de las pastas se refleja en la comparación de los índices de desgarro y tracción, en la Figura 7-7b se visualiza que para un índice de tracción comprendido entre 42.4 y 43.1 Nm/g el sistema lacasa-mediador genera mayor resistencia al desgarro con respecto al control kL, además el refinado de 3000 rev. demuestra claramente que L_{HBT} requiere menor energía para alcanzar una óptima respuesta en tracción y desgarro.

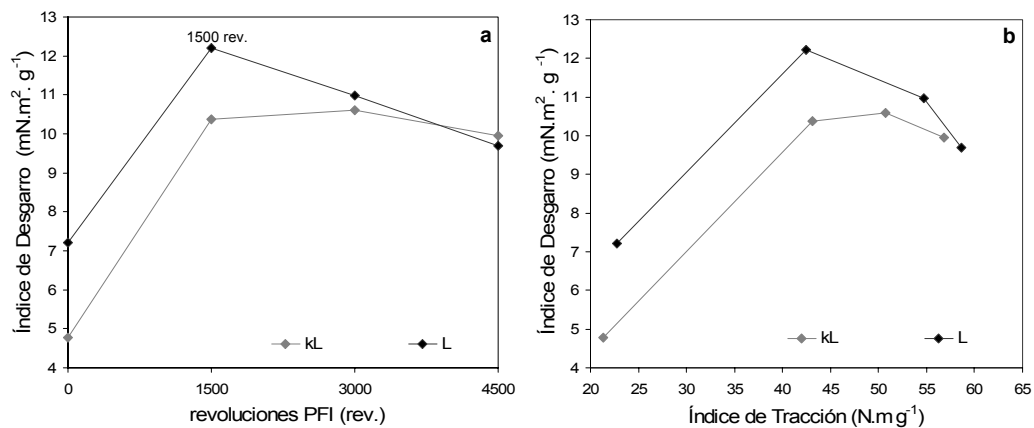


Figura 7-7. Evolución del índice de desgarro con respecto al número de revoluciones PFI (a) y al índice de tracción (b). Tratamientos de 4 horas

En general los resultados revelan un valor añadido con la aplicación del sistema lacasa-mediador principalmente por mantener e incrementar las propiedades fisicomecánicas del papel sin modificar la resistencia al desgote; estos efectos se atribuyen a la remoción de los ácidos hexenurónicos y a la influencia en las propiedades electrocinéticas de la pasta. Para afianzar estas teorías se evalúa el sistema lacasa-mediador en la pasta ECF donde el contenido de HexAs equivalente a 0.2 $\mu\text{mol/g}$ p.s. es notoriamente inferior al contenido de la pasta TCF. Las propiedades de resistencia de las pastas ECF en los tratamientos de 4 horas (Tabla 7-7) y 24 horas (Tabla 7-8) no presentan resultados equivalentes a los observados en la pasta TCF, verificándose así la influencia enzimática en el refinado por una acción indirecta que viene siendo consecuencia de la remoción de estructuras oxidables.

Tabla 7-7. Propiedades fisicomecánicas del papel. Tratamientos L_{HBT} 4H en pastas ECF

PFI/rev.	kL 4H				L 4H			
	0	1500	3000	4500	0	1500	3000	4500
<i>Volumen, cm³ g⁻¹</i>	1,89	1,51	1,40	1,25	1,87	1,61	1,46	1,41
<i>Pb Bendtsen, $\mu\text{m} (\text{Pa.s})^{-1}$</i>	51,0	26,4	10,5	3,7	50,9	30,5	16,9	8,6
<i>I. Desgarro, mN m² g⁻¹</i>	5,19	10,44	11,11	10,42	5,05	11,43	11,48	11,74
<i>R. Plegado, log(Nº.Pliegues)</i>	0,61	2,26	3,32	3,47	0,71	2,33	3,16	3,47
<i>I. Estallido, kPa m² g⁻¹</i>	0,69	2,33	3,10	3,54	0,86	2,32	3,24	3,58
<i>I. Tracción, Nm g⁻¹</i>	17,67	43,90	55,00	56,39	19,61	41,91	51,08	55,82

Tabla 7-8. Propiedades fisicomecánicas del papel. Tratamientos L_{HBT} 24H en pastas ECF

PFI/rev.	kL 24H				L 24H			
	0	1500	3000	4500	0	1500	3000	4500
<i>Volumen, cm³ g⁻¹</i>	1,84	1,54	1,44	1,34	1,78	1,66	1,48	1,38
<i>Pb Bendtsen, $\mu\text{m} (\text{Pa.s})^{-1}$</i>	51,0	22,1	8,5	3,0	52,0	31,9	17,5	8,5
<i>I. Desgarro, mN m² g⁻¹</i>	5,83	10,18	12,63	10,68	4,90	9,99	12,50	10,82
<i>R. Plegado, log(Nº.Pliegues)</i>	0,81	2,61	3,32	3,35	0,58	2,08	3,04	3,31
<i>I. Estallido, kPa m² g⁻¹</i>	0,89	2,49	3,08	3,84	0,74	2,20	3,02	3,61
<i>I. Tracción, Nm g⁻¹</i>	17,98	46,13	54,95	63,75	18,45	38,82	50,63	56,68

Las propiedades fisicomecánicas de los papeles obtenidos con el sistema lacasa-mediador dan una pauta para continuar con estudios que relacionen los efectos enzimáticos (L_{HBT}) con la química de la parte húmeda de los procesos papeleros, y

permitan dar más argumentos que justifiquen su influencia en la operación del refinado.

7.4 CONCLUSIONES

La enzima lacasa de *Trametes villosa* en presencia de HBT modifica el número kappa y el contenido de ácidos hexenurónicos [HexAs] en la pasta kraft TCF de *Eucalyptus globulus*. La disminución del número kappa se atribuye a la remoción de HexAs y no a la degradación de la lignina residual, dado que en los tratamientos enzimáticos se obtiene un número kappa equivalente al control tras someter las respectivas pastas a una hidrólisis acida con acetato de mercurio.

La aplicación del sistema lacasa-mediador genera un descenso de la viscosidad específica de la pasta TCF, efecto que se presenta debido a la oxidación de la celulosa. En el tratamiento enzimático se descarta una posible biodegradación o cortes en la cadena celulósica; con una etapa reductora (secuencia LR) se confirma que el sistema lacasa-mediador efectúa una oxidación de los hidratos de carbono formando grupos carbonilos.

Los tratamientos L_{HBT} en la pasta TCF modifican hasta el 27% del contenido total de grupos carboxilos, la reducción de este grupo funcional se vincula a la remoción de ácidos hexenurónicos. En la pasta ECF (caracterizada por tener un bajo contenido de ácidos hexenurónicos) la aplicación del sistema lacasa-mediador reporta valores análogos al tratamiento control (kL_{ECF}), este resultado admite relacionar directamente el descenso de los ácidos carboxílicos con los ácidos hexenurónicos en la pasta TCF.

La disminución de los grupos carboxilos en la pasta TCF por acción del sistema lacasa-mediador también produce una variación sobre la carga superficial de las fibras; este resultado crea expectativas en cuanto a una posible reducción de costos dado que la disminución de grupos ionizables implica un menor consumo de aditivos catiónicos en la fabricación del papel. En el análisis de otras propiedades electrocinéticas el sistema lacasa-mediador reduce el potencia ζ de la suspensión fibrosa, efecto que se debe a la alteración del contenido de los ácidos hexenurónicos y ácidos carboxílicos.

La biomodificación de la composición química de la pasta TCF efectuada por el sistema lacasa-mediador no produce cambios significativos en las propiedades de las

pastas refinadas (°SR, %IRA), lo que permite afirmar que estos tratamientos enzimáticos no influyen en el desarrollo de los efectos primarios del refinado pero puede presentarse un efecto secundario sobre el sistema fibra-agua al disminuir los grupos ionizables y modificar las propiedades electrocinéticas.

El sistema lacasa-mediador no interfiere significativamente en la permeabilidad Bendtsen, manteniendo un volumen específico similar entre los tratamientos control y los tratamientos enzimáticos, este efecto es consecuente con el análisis del °SR y el %IRA donde los resultados no confirman la generación de enlaces por posibles cambios en la morfología de las fibras.

La enzima lacasa y el mediador HBT modifican ligeramente las propiedades de resistencia como el índice de estallido y tracción; adicionalmente el sistema lacasa-mediador genera mayor resistencia al desgarro con respecto al tratamiento control y requiere menor energía para alcanzar una óptima respuesta en el índice tracción y desgarro. El efecto del tratamiento enzimático sobre la resistencia se relaciona con la disminución de los grupos ionizables (ácidos carboxílicos, ácidos hexenurónicos) y las propiedades electrocinéticas de la pasta TCF; los resultados obtenidos con el refinado de la pasta ECF verifican que los efectos del sistema lacasa-mediador se deben a la remoción de estructuras oxidables.

7.5 BIBLIOGRAFÍA

- Allison, R.W., Timonen, O., McGrouther, K.G. and Suckling, I.D., 1999. Hexenuronic acid in kraft pulps from radiata pine. *Appita Journal*, 52(6): 448-453.
- Aracri, E., Fillat, A. and Vidal, T., 2008. Modificación enzimática de pastas de lino y sisal con lacasas y mediadores naturales. V Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel, CIADICYP-2008, Guadalajara, México.
- Bajpai, P., 2004. Biological bleaching of chemical pulps. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24(1): 1-58.
- Bajpai, P., Anand, A. and Bajpai, P.K., 2006. Bleaching with lignin-oxidizing enzymes. *Biotechnol Annu Rev*, 12(1): 349-378.
- Bhardwaj, N.K., Duong, T.D. and Nguyen, K.L., 2004a. Pulp charge determination by different methods: effect of beating/refining. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 236(1-3): 39-44.
- Bhardwaj, N.K., Hoang, V., Dang, V. and Nguyen, K.L., 2006. Dissolution of ionisable groups and lignocellulosic components during low-temperature kraft pulping of

- pinus radiata*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 290(1-3): 222-228.
- Bhardwaj, N.K., Hoang, V. and Nguyen, K.L., 2007. A comparative study of the effect of refining on physical and electrokinetic properties of various cellulosic fibres. Bioresource Technology, 98(8): 1647-1654.
- Bhardwaj, N.K., Kumar, S. and Bajpai, P.K., 2004b. Effects of processing on zeta potential and cationic demand of kraft pulps. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 246(1-3): 121-125.
- Bourbonnais, R. and Paice, M.G., 1996. Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. Tappi Journal, 79(6): 199-204.
- Buchert, J., Bergnor, E., Lindblad, G., Viikari, L. and Ek, M., 1997. Significance of xylan and glucomannan in the brightness reversion of kraft pulps. Tappi Journal, 80(6): 165-171.
- Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., del Rio, J.C., Gutierrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martinez, M.J. and Martinez, A.T., 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. Enzyme and Microbial Technology, 35(2-3): 113-120.
- Costa, M.M. and Colodette, J.L., 2002. Efeito da composicao quimica da polpa kraft-O2 na sua branqueabilidade. O Papel, 63(8): 93-103.
- Costa, M.M. and Colodette, J.L., 2007. The impact of kappa number composition on eucalyptus kraft pulp bleachability. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 24(1): 61-71.
- Chai, X.S., Hou, Q.X. and Zhu, J.Y., 2003. Carboxyl Groups in Wood Fibers. 2. The Fate of Carboxyl Groups during Alkaline Delignification and Its Application for Fiber Yield Prediction in Alkaline Pulping. Ind. Eng. Chem. Res., 42(22): 5445-5449.
- 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.
- Chakar, F.S., Ragauskas, A.J. and Nilvebrant, N.-O., 1998. Biobleaching of high lignin content kraft pulps via laccase-mediator systems. Tappi Press, 746: 1-10.
- de la Rosa, A., 2003. Utilización papelera de fibras no madereras (kenaf y *Miscanthus sinensis*). Estudio de secuencias de blanqueo ECF y TCF. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.
- Duarte, A.P., Martins, S., Abrantes, C., Ismael, M.I., Simões, R. and Figueiredo, J.A., 2006. Improvement of bleached kraft pulp properties by cellulose oxidation. O Papel, 67(10): 76-82.

- Fardim, P. and Holmbom, B., 2005. Origin and surface distribution of anionic groups in different papermaking fibres. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 252(2-3): 237-242.
- Fillat, U., 2008. Aplicación de biotecnología para la obtención de pastas de alta calidad. Estudio de sistemas enzimáticos en secuencias de blanqueo respetuosas con el medio ambiente. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.
- Freundenreich, J., Amann, M., Fritz-Langhals, E. and Stohrer, J., 1998. Understanding the Lignozym®-Process, International Pulp Bleaching Conference. *Nordic Pulp and Paper Research*, 1: 71-76.
- García, O., 2003. Utilización de fibras de lino en la fabricación de papel. Nuevas secuencias de blanqueo y aplicación de sistemas enzimáticos. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.
- García, O., Camarero, S., Colom, J.F., Martínez, A.T., Martínez, M.J., Monje, R. and Vidal, T., 2003. Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung*, 57(5): 513-519.
- Gellerstedt, F., Wagberg, L. and Gatenholm, P., 2000. Swelling behaviour of succinylated fibers. *Cellulose*, 7(1): 67-86.
- Gellerstedt, G. and Li, J., 1996. An HPLC method for the quantitative determination of hexeneuronic acid groups in chemical pulps. *Carbohydrate Research*, 294(1): 41-51.
- Herpoel, I., Jeller, H., Fang, G., Petit-Conil, M., Bourbonnais, R., Robert, J.L., Asther, M. and Sigoillot, J.C., 2002. Efficient enzymatic delignification of wheat straw pulp by a sequential xylanase-laccase mediator treatment. *Journal of Pulp and Paper Science*, 28(3): 67-71.
- Hubbe, M.A., Rojas, O.J., Lucia, L.A. and Jung, T.M., 2007. Consequences of the nanoporosity of cellulosic fibers on their streaming potential and their interactions with cationic polyelectrolytes. *Cellulose*, 14(6): 655-671.
- Ibarra, D., Chavez, M.I., Rencoret, J., del Rio, J.C., Gutierrez, A., Romero, J., Camarero, S., Martinez, M.J., Jimenez-Barbero, J. and Martinez, A.T., 2007. Structural modification of eucalypt pulp lignin in a totally chlorine-free bleaching sequence including a laccase-mediator stage. *Holzforschung*, 61(6): 634-646.
- Ibarra, D., Romero, J., Martinez, M.J., Martinez, A.T. and Camarero, S., 2006. Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalypt pulp by laccase-mediator. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(6): 1319-1327.
- Isogai, A., Kitaoka, C. and Onabe, F., 1997. Effects of carboxyl groups in pulp on retention of alkylketene dimer. *Journal of Pulp and Paper Science*, 23(5): 215-219.

- Kawae, A. and Uchida, Y., 2005. Heat and moisture-induced yellowing of ECF-light bleached hardwood kraft pulp. *Appita Journal*, 58(5): 378-381.
- Kleen, M., Ohra-Aho, T. and Tamminen, T., 2003. On the interaction of HBT with pulp lignin during mediated laccase delignification - a study using fractionated pyrolysis-GC/MS. *Journal Of Analytical And Applied Pyrolysis*, 70(2): 589-600.
- Laine, J. and Stenius, P., 1997. Effect of charge on the fibre and paper properties of bleached industrial kraft pulps. *Paperi ja Puu/Paper and Timber*, 79(4): 257-266.
- Li, J. and Gellerstedt, G., 1997. The contribution to kappa number from hexeneuronic acid groups in pulp xylan. *Carbohydrate Research*, 302: 213-218.
- Li, J. and Gellerstedt, G., 1998. On the structural significance of the kappa number measurement. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 13(2): 153-158.
- Li, J. and Gellerstedt, G., 2002. Oxymercuration-demercuration kappa number: An accurate estimation. of the lignin content in chemical pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 17(4): 410-414.
- Lindstrom, T., 1992. Chemical factors affecting the behaviour of fibres during papermaking. *Nordic Pulp and Paper Research*, 7(4): 181-192.
- Lund, M. and Felby, C., 2001. Wet strength improvement of unbleached kraft pulp through laccase catalyzed oxidation. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(9-10): 760-765.
- Mansfield, S.D., 2002. Laccase impregnation during mechanical pulp processing - Improved refining efficiency and sheet strength. *Appita Journal*, 55(1): 49-53.
- Moldes, D., Diaz, M., Tzanov, T. and Vidal, T., 2008. Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Bioresource Technology*, 99(17): 7959-7965.
- Moldes, D. and Sanromán, M.Á., 2006. Amelioration of the ability to decolorize dyes by laccase: relationship between redox mediators and laccase isoenzymes in *Trametes versicolor*. *Journal World of Microbiology and Biotechnology*, 22(11): 1197-1204.
- Moldes, D. and Vidal, T., 2008. Laccase-HBT bleaching of eucalyptus kraft pulp: Influence of the operating conditions. *Bioresource Technology*, 99(18): 8565-8570.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V. and Yaropolov, Y.I., 2007. Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry And Microbiology*, 43: 523-535.
- Nelson, P.J., Chin, C.W.J., Viikari, L. and Tenkanen, M., 1998. Use of a laccase mediator stage in bleaching eucalypt kraft pulps. *Appita Journal*, 51(6): 451-455.

- Odermatt, J., Rippin, H.J., Kordsachia, O., Patt, R. and Wang, D.K.L., 1998. Application of NaBH₄ to improve the properties of ozonated softwood kraft pulp. *Cellulose Chemistry and Technology*, 32(3-4): 309-235.
- Palonen, H. and Viikari, L., 2004. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(5): 550-557.
- Poppius-Levlin, K., Wang, M., Tamminen, T., Hortling, B., Viikari, L. and Niku-Paavola, M.L., 1999. Effects of laccase/HBT treatment on pulp and lignin structures. *Journal Of Pulp And Paper Science*, 25(3): 90-94.
- 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. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.
- Roncero, M.B., Colom, J.F. and Vidal, T., 2002. Application of post-treatments to the ozone bleaching of eucalypt kraft pulp to increase the selectivity. Part A. *Appita Journal*, 55(4): 305-309.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. and Vidal, T., 2005. The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps. *Bioresource Technology*, 96(1): 21-30.
- Shleev, S., Persson, P., Shumakovich, G., Mazhugo, Y., Yaropolov, A., Ruzgas, T. and Gorton, L., 2006. Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4): 841-847.
- Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Perez-Boada, M., Martinez, M.J., Sigoillot, J.-C., Asther, M., Colom, J.F. and Martinez, A.T., 2005. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal of Biotechnology*, 115(4): 333-343.
- Tenkanen, M., Gellerstedt, G., Vuorinen, T., Teleman, A., Perttula, M., Li, J. and Buchert, J., 1999. Determination of hexenuronic acid in softwood kraft pulps by three different methods. *Journal of Pulp and Paper Science*, 25(9): 306-311.
- Valls, C., 2008. Aplicació de nous sistemes enzimàtics pel blanqueig de pasta kraft d'eucaliptus. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.
- Vuorinen, T., Fagerstrom, P., Buchert, J., Tenkanen, M. and Teleman, A., 1999. Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps. *Journal of Pulp and Paper Science*, 25(5): 155-162.
- Wagberg, L., 2000. Polyelectrolyte adsorption onto cellulose fibres - A review. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 15(5): 586-597.

- Widsten, P., Laine, J.E. and Tuominen, S., 2002. Radical formation on laccase treatment of wood defibrated at high temperatures. Part 1. Studies with hardwood fibers. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 17(2): 139-146.
- Wong, K.K.Y., Anderson, K.B. and Kibblewhite, R.P., 1999. Effects of the laccase-mediator system on the handsheet properties of two high kappa kraft pulps. *Enzyme And Microbial Technology*, 25(1-2): 125-131.
- Wong, K.K.Y., Richardson, J.D. and Mansfield, S.D., 2000. Enzymatic treatment of mechanical pulp fibers for improving papermaking properties. *Biotechnology Progress*, 16(6): 1025-1029.
- Zhou, G., Li, J., Chen, Y., Zhao, B., Cao, Y., Duan, X. and Cao, Y., 2009. Determination of reactive oxygen species generated in laccase catalyzed oxidation of wood fibers from Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) by electron spin resonance spectrometry. *Bioresource Technology*, 100(1): 505-508.

CAPÍTULO 8.

Influencia del contenido de ácidos hexenurónicos en el envejecimiento y refinado de pastas kraft

*Las pastas TCF presentan menor estabilidad en la blancura en comparación a las obtenidas mediante una secuencia de blanqueo ECF, efecto relacionado con su mayor contenido en estructuras oxidables, como los ácidos hexenurónicos (HexAs). El estudio de envejecimiento acelerado por inducción de calor y humedad demuestra que la reversión de la blancura puede disminuir con la aplicación de métodos biotecnológicos, tal como revela la aplicación del sistema lacasa-mediador a una pasta TCF. La enzima lacasa (*Trametes villosa*) y el mediador HBT generan una reducción del 8,4% en la reversión de la blancura, resultado que está directamente relacionado con la remoción del 23% del contenido total de ácidos hexenurónicos. Una evaluación adicional sobre el efecto de los HexAs en la operación de refinado pone de manifiesto que estas estructuras oxidables confieren un carácter hidrofílico a la pasta, por consiguiente su eliminación produce cambios en las propiedades de resistencia del papel y genera expectativas al observarse una mayor drenabilidad (obtención de menor °SR) en las pastas TCF.*

8.1 INTRODUCCIÓN

La blancura es un importante parámetro final en los procesos papeleros, y su estabilidad ha generado gran interés a partir del uso creciente de las pastas kraft. Los materiales celulósicos experimentan degradación natural durante prolongados periodos de tiempos, las condiciones de almacenamiento y uso condicionan la estabilidad y durabilidad; concretamente en el área de producción de pastas y papeles la materia prima -tipo de madera-, los procesos de cocción, y blanqueo confieren variabilidad en la estabilidad (Eiras and Colodette, 2005; Smit, 1993) y depende de factores internos (composición química) y externos (condiciones atmosféricas) (García

Hortal, 2007). Un control sobre la estabilidad de la blancura requiere la identificación de estructuras responsables de los fenómenos de reversión en las propiedades ópticas. Las reacciones de envejecimiento fundamentalmente se han relacionado con la composición química de las pastas (lignina, complejos lignina-carbohidratos, hemicelulosa, resinas, iones metálicos, aditivos) (Costa and Colodette, 2002; Granstrom et al., 2001; Smit, 1993), transformación de polisacáridos (Forsskahl et al., 2000), y a la presencia de estructuras oxidables (Buchert et al., 1997) indicando que los principales mecanismos de degradación más importantes corresponden a una hidrólisis ácida y a un ataque oxidativo.

La contribución del contenido de lignina como precursor de grupos cromóforos está relacionado con el amarillamiento de pastas mecánicas; en pastas con bajo contenido de lignina residual, la reversión de blancura se enfoca al contenido de grupos funcionales: carbonilos y carboxilos como principales causas del envejecimiento (Chirat and De La Chapelle, 1999), sin embargo en los últimos años existe mayor interés en la presencia del contenido de ácidos hexenurónicos (Tenkanen et al., 1999; Valls, 2008; Vuorinen et al., 1999). Las pastas con secuencias de blanqueo TCF resultan ser más inestables a un termoenvejecimiento acelerado, efecto que se produce por la inestabilidad de dobles enlaces presentes en la estructura de los ácidos hexenurónicos. Las exigencias medioambientales promueven el uso de pastas TCF, generando investigaciones orientadas a solucionar los fenómenos de reversión.

La propuesta de esta investigación es determinar el impacto de los ácidos hexenurónicos sobre la reversión de la blancura en pastas de *Eucalyptus globulus*; establecer otros efectos sobre la calidad de la pasta e interferencia en la operación de refinado; y proponer la introducción de métodos biotecnológicos en las secuencias de blanqueo con expectativas de optimizar la estabilidad de las pastas TCF. La aplicación del sistema lacasa-mediador se convierte en una alternativa para reducir grupos cromóforos generados en el envejecimiento acelerado, debido a su gran potencial observado en la remoción de ácidos hexenurónicos.

8.1.1 Formación de ácidos hexenurónicos

Durante el proceso kraft se producen ácidos hexenurónicos [HexAs] por la eliminación del metanol del grupo ácido 4-O-metilglucurónico (Gellerstedt and Li, 1996; Telemán et al., 1996; Tenkanen et al., 1999) que se encuentra unido como grupo lateral a los xilanos (Buchert et al., 1995) (Figura 8-1). La velocidad de formación de HexAs depende de diversos factores inherentes a la cocción kraft como tiempo (Daniel et al.,

2003), temperatura (Buchert et al., 1995), y concentraciones del álcali efectivo (Chai et al., 2001; Simao et al., 2005).

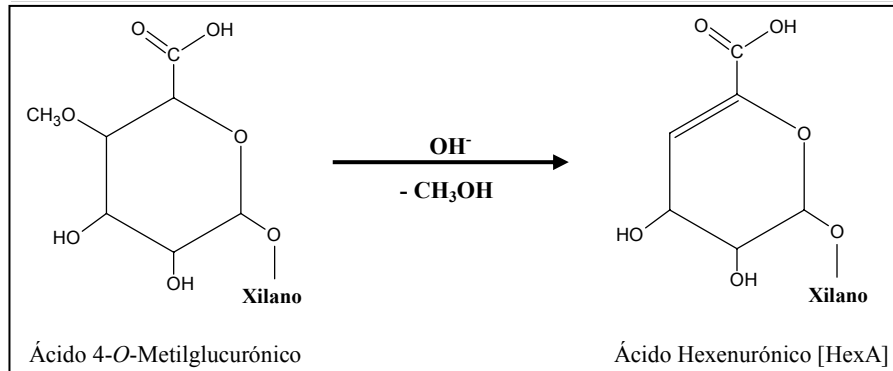


Figura 8-1. Formación de ácidos hexenurónicos durante el proceso de cocción kraft

Los HexAs contribuyen al número kappa (Li and Gellerstedt, 1998), y junto con otras estructuras oxidables producen: una medida errónea del contenido de lignina; incrementan el consumo de agentes de blanqueo (Vuorinen et al., 1999); generan reversión de blancura (Granstrom et al., 2001); causan retención de iones metálicos - efecto quelante- (Devenyns and Chauveheid, 1997); contribuyen a la formación de ácido oxálico, ocasionando incrustaciones en los circuitos del proceso por la producción de oxalato de calcio (Bergnor-Gidnert et al., 1998; Elsander et al., 2000). Debido a estos efectos negativos diversas investigaciones se han enfocado a degradar o minimizar el contenido de HexAs con la introducción de estadios ácidos entre la cocción y blanqueo (Vuorinen et al., 1999), aplicación de oxidantes electrofílicos como cloro o dióxido de cloro (Costa and Colodette, 2002; Lachenal and Chirat, 2000), ozono (Roncero et al., 2003) y perácidos (Bergnor-Gidnert et al., 1998). Actualmente ha generado gran expectativa la aplicación de métodos enzimáticos, concretamente la introducción de xilanasas y lacasas en secuencias de blanqueo provocan una importante remoción de HexAs (Roncero et al., 2003; Valls and Roncero, 2008).

8.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La estabilidad de la blancura se estudia en pastas kraft TCF y ECF de *Eucalyptus globulus* mediante la realización de envejecimientos acelerados bajo la influencia de calor - humedad (80 °C y 65 %HR) (ISO 5630-3) y radiación lumínica. La exposición

de hojas de ensayo al envejecimiento durante un tiempo total de 144 horas, se realiza en una “cámara climática” (HC 2020 de Heraeus Vötsch) para inducir una reversión de blancura por efecto de temperatura y humedad relativa [termoamarillamiento] y en el equipo “Suntest” (CPS+ Heraeus Industrietechnik) para inducir reversión de blancura por exposición a la luz [fotoamarillamiento]. Los resultados de las pastas iniciales (ECF y TCF) son contrastados con el envejecimiento acelerado de una pasta TCF cuyo contenido de ácidos hexenurónicos se ha eliminado con una hidrólisis ácida [TCF_HexA] (Gellerstedt and Li, 1996).

La reversión de la blancura se determina mediante propiedades ópticas a partir de mediciones efectuadas con el equipo Technidyne PC Color Touch; los análisis incluyen blancura (ISO 2470), curvas de reflectancia, curvas k/s , coordenadas cromáticas CIE $L^*a^*b^*$ y CIE L^*C^* y determinación del índice de pérdida de blancura [PB], de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

- *Pérdida de blancura:*

$$\%PB = \frac{B_0 - B}{B_0} \times 100 \quad \text{Ec. 8-1}$$

Donde B_0 y B corresponden respectivamente al valor de blancura -ISO- de la pasta inicial y sometida al envejecimiento acelerado.

- *Coefficiente de Kubelka-Munk:*

$$\frac{k}{s} = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2R_\infty} \quad \text{Ec. 8-2}$$

Donde R_∞ es el factor de reflectancia, k y s corresponden a los coeficientes de absorción y dispersión a la luz respectivamente.

Además del efecto de los HexAs en la reversión de blancura, se analiza su influencia en propiedades electrocinéticas (determinación de carga con titulación coloidal), en la operación de refinado (°SR, %IRA) y propiedades fisicomecánicas del papel (permeabilidad, densidad, tracción, estallido, desgarró y plegado). Las curvas de refinado se realizan para la pasta inicial TCF y pasta TCF cuyo contenido de ácidos hexenurónicos han sido eliminados previamente al refinado [TCF_HexAs].

- *Aplicación del sistema lacasa-mediador en pastas TCF*

Los tratamientos enzimáticos con lacasa de *Trametes villosa* (20 IU/g p.s.) y mediador HBT (2% p.s) se realizan en un reactor al 5% de consistencia, 30 °C, presión 6 kg/cm²

y pH 4.0 en presencia de tartrato de sodio 50 mM y tensoactivo Tween 80 (0,05% p/v). La caracterización de los tratamientos incluye la determinación de grupos carbonilos, carboxilos, contenido de HexAs, número kappa, y blancura.

- Etapa de extracción alcalina [E]

Etapa posterior al tratamiento enzimático L_{HBT}. La extracción alcalina se realiza al 5% de consistencia con 5 g p.s. y al 1,5% de NaOH en un reactor Easydye de Datacolor durante 120 minutos a una temperatura de 90 °C.

8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.3.1 Estabilidad de las propiedades ópticas en pastas TCF y ECF

El grado de reversión de la blancura es notable en la pasta TCF; el envejecimiento acelerado por calor - humedad (80 °C y 65 %HR) a 144 horas causa una pérdida de blancura máxima del 41.5% en la pasta TCF y 28.1% en la pasta ECF (Figura 8-2). El termoamarillamiento indica generación de grupos cromóforos y las diferencias obtenidas en los dos tipos de pasta se relacionan con estructuras oxidables (lignina, componentes aromáticos, ácidos hexenurónicos,...) generadas en los procesos de cocción kraft y secuencias de blanqueo, estas estructuras son responsables de la reversión de la blancura. Las pastas TCF son más vulnerables e inestables, la secuencia de blanqueo incluye oxígeno y peróxido de hidrógeno, reactivos que generan alta blancura pero baja estabilidad en comparación a la pasta ECF.

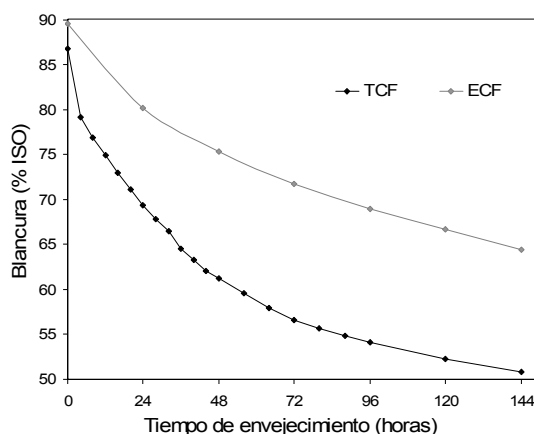


Figura 8-2. Reversión de la blancura de las pastas TCF y ECF. Envejecimiento acelerado “calor – humedad”

Las secuencias de blanqueo confieren propiedades únicas a las pastas químicas y ejercen una importante función en la disminución de la reversión de la blancura (Eiras and Colodette, 2005). Las pastas TCF y ECF difieren principalmente en el número kappa, grupos funcionales y contenido de ácidos hexenurónicos (Tabla 8-1). Conocida la interferencia de los HexAs en el número kappa se descarta una mayor influencia de la lignina residual en la reversión de la blancura de la pasta TCF; en este tipo de pasta el contenido de ácidos hexenurónicos marca una pauta diferencial con la secuencia de blanqueo ECF donde los HexAs son eliminados principalmente con dióxido de cloro, y no reaccionan con agentes de blanqueo como el peróxido de hidrógeno y oxígeno (Buchert et al., 1995; Tenkanen et al., 1999) siendo la secuencia ECF más eficiente para la remoción de estructuras no lignocelulósicas (Li et al., 2002). La comparación entre los dos tipos de pasta permite demostrar la influencia del contenido de HexAs en el envejecimiento de las pastas TCF y constatar que la reversión de la blancura (28.1%) en las pastas ECF se debe principalmente a la presencia de grupos carbonilos [C=O] (aldehídos – cetonas) y carboxilos [COOH] (Buchert et al., 1997; Roncero, 2001) introducidos durante los procesos de cocción y blanqueo (Chirat and De La Chapelle, 1999) con oxidaciones de los carbonos C1, C2, C3 y C6 del monómero de celulosa.

Tabla 8-1. Propiedades de las pastas kraft TCF y ECF originales

	TCF	ECF
Blancura, % ISO	89,0 ± 0,4	89,5 ± 0,3
Número kappa	5,0 ± 0,1	0,5 ± 0,0
Viscosidad, mL/g	759 ± 15	858 ± 27
HexAs, μ mol/g p.s.	35,4 ± 1,1	0,2 ± 0,1
Carboxilos, mmol/100 g p.s	11,47 ± 0,71	6,75 ± 0,14
Carbonilos, mmol/100 g p.s	0,59 ± 0,21	3,03 ± 0,31

En la pasta TCF el contenido de grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) indica baja interferencia en los fenómenos de reversión con respecto a la pasta ECF. Por consiguiente en las pastas TCF el estudio del envejecimiento se enfoca en los grupos ácidos y específicamente en el contenido de ácidos hexenurónicos [HexAs]. El amarillamiento inducido por efecto de calor - humedad (80 °C y 65 %HR) expone una pérdida de estabilidad en las propiedades ópticas tras el envejecimiento acelerado de la pasta TCF, las curvas de reflectancia (Figura 8-3) verifican la reversión de la blancura al contrastar con la pasta inicial [PI]; las mediciones realizadas en los diferentes intervalos de tiempo tras el envejecimiento manifiestan una rápida reversión

de blancura para los periodos iniciales comprendidos entre 24 y 48 horas, en posteriores tiempos de exposición (≥ 48 horas) los cambios observados en la reflectancia disminuyen para los mismos intervalos de tiempo.

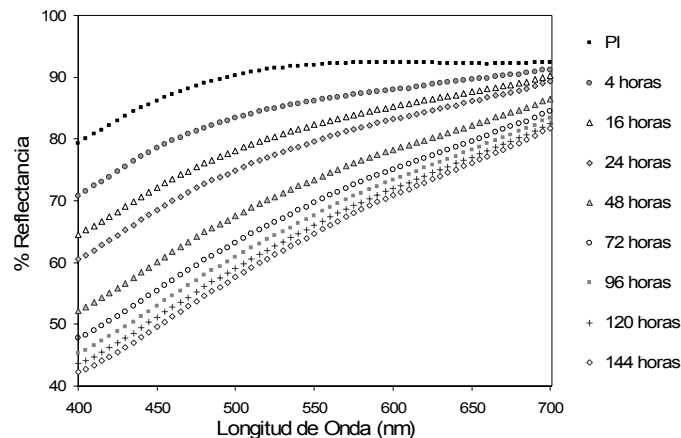


Figura 8-3. Curvas espectrofotométricas. Pasta inicial TCF [PI] y pasta TCF con envejecimiento acelerado por calor húmedo

El termoamarillamiento es un proceso complejo, influenciado por diversos factores, concretamente en la pasta TCF la reversión de blancura esta directamente relacionada con su composición química, la remoción del contenido de HexAs con hidrólisis ácida indica claramente que estos grupos ácidos son precursores en la formación de compuestos cromóforos. La Figura 8-4a, que presenta el envejecimiento acelerado por calor húmedo de la pasta inicial TCF y pasta cuyo contenido de ácidos hexenurónicos se ha eliminado (hidrólisis selectiva con acetato de mercurio) [TCF_HexAs], revela mayor estabilidad de blancura tras la remoción de HexAs, a 144 horas de envejecimiento la reversión máxima de TCF_HexAs corresponde al 13.1% con una diferencia de 25 unidades de blancura (%ISO) con la pasta inicial TCF. Adicional a los HexAs existen otras estructuras en la pasta TCF que afectan la permanencia del papel, las curvas k/s (Figura 8-4b), que indican intensidad de color entre la pasta inicial sin envejecer [TCF_0 horas] y la pasta envejecida TCF_HexAs, exponen una reversión que puede ser consecuencia de la presencia de grupos carboxilos, carbonilos, iones metálicos y lignina residual, aunque para algunos autores la lignina residual en el termoamarillamiento no causa mayor influencia en la estabilidad de la blancura tras la remoción de HexAs y estructuras oxidables presentes en pastas blanqueadas (Sevastyanova et al., 2006b).

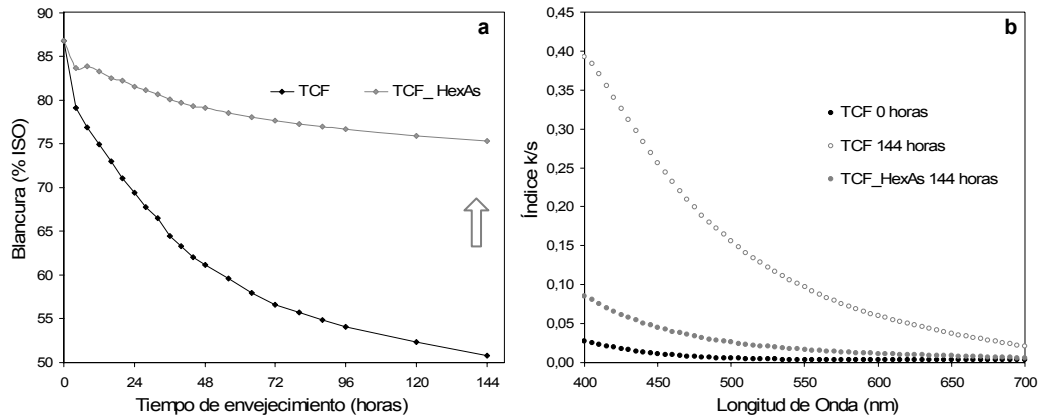


Figura 8-4. Envejecimiento acelerado por calor húmedo de pasta inicial TCF y con remoción de HexAs [TCF_HexAs]. Evaluación de blancura (a) y curvas k/s (b)

En el proceso de envejecimiento los HexAs son hidrolizados; una progresiva degradación de los ácidos hexenurónicos se demuestra con la determinación del número kappa posterior al envejecimiento de 144 horas. El resultado obtenido [3.35 NK] evidencia una disminución del kappa del 33% con respecto a la pasta inicial sin envejecer [5.0 NK]; dada la influencia de los HexAs en el número kappa se afirma que la disminución de la blancura en el termoamarillamiento es directamente proporcional a la hidrólisis de HexAs. La degradación de los grupos ácidos (HexAs) también implica una disminución del efecto quelante, causando liberación de iones metálicos (Granstrom et al., 2002) e influyendo en la intensidad del color durante el envejecimiento.

En una hidrólisis ácida de los HexAs se han identificado principalmente dos productos de degradación que corresponden al 90% de ácido 2-furanoico [AF] y 10% de 5-carboxi-2-furanoaldehído [AFF] (Jiang et al., 2001; Telemán et al., 1996), otros autores confirmaron la presencia de estos compuestos con un análisis posterior al envejecimiento de pastas, indicando que una sucesiva degradación de HexAs genera una simultánea formación del ácido 2-furanoico [AF] y 5-carboxi-2-furanoaldehído [AFF] (Sevastyanova et al., 2006b). La disminución de los HexAs observada en el envejecimiento de la inicial TCF con la determinación del número kappa sugiere que los productos de degradación de los HexAs también pueden participar en las reacciones que implican reversión de blancura. En la Figura 8-5 se presenta la estructuras teóricas derivadas del envejecimiento por factores como el calor y la humedad (80°C y 65 %HR); es manifiesto el interés de minimizar la presencia de los ácidos hexenurónicos en las pastas papeleras, una remoción de los HexAs, tal como la efectuada en la pasta TCF_HexAs, significa incrementar la estabilidad de

propiedades ópticas -de acuerdo a los resultados y el contraste realizado con la pasta inicial [PI_TCF]-.

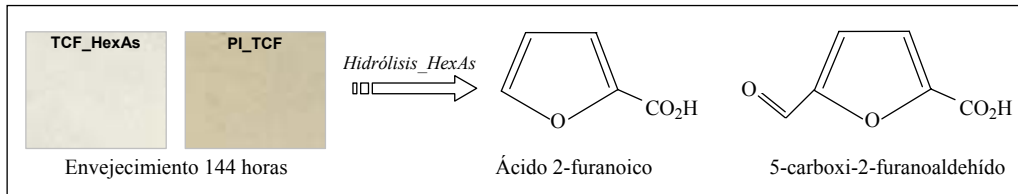


Figura 8-5. Productos de degradación de ácidos hexenurónicos durante el envejecimiento acelerado por calor húmedo (144 horas) de pastas TCF [PI_TCF]

En el estudio para inducir la reversión de blancura por exposición a la luz [radiación lumínica 765 W/m²h en el equipo Suntest] no se manifiesta envejecimiento de las pastas analizadas; al contrario que el envejecimiento acelerado por calor húmedo las pastas presentan mayor estabilidad de las propiedades ópticas (Figura 8-6). En las pastas ECF y TCF la radiación lumínica causa un descenso máximo de una y seis unidades de blancura -ISO- respectivamente, resultados que confirman bajo contenido de lignina residual. Las pequeñas variaciones observadas durante las 144 horas de envejecimiento en la pasta TCF sugieren reacciones fotoquímicas y de oxidación; la representación de la curva TCF_HexAs (pasta TCF con remoción de HexAs) descartan a los ácidos hexenurónicos como posible estructura que genere amarillamiento en el papel por exposición a la luz debido a que la remoción de HexAs causa una disminución de blancura en las primeras 4 horas de exposición, con una posterior recuperación de blancura, con lo cual se intuye una degradación de posibles residuos de la hidrólisis ácida.

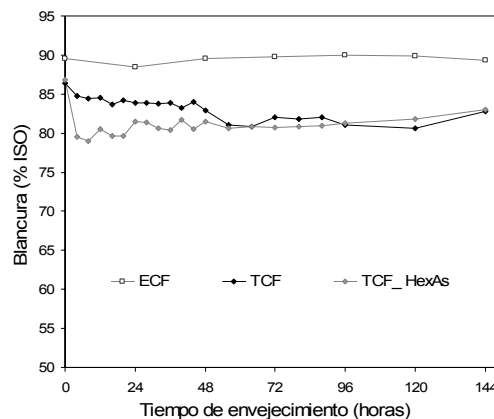


Figura 8-6. Envejecimiento acelerado por exposición a la luz, pastas TCF y ECF

8.3.2 Disminución de la reversión de blancura con aplicación enzimática

La búsqueda de alternativas que permitan garantizar la estabilidad de las pastas químicas durante su almacenamiento en condiciones oxidativas enfocan a los HexAs como un importante parámetro a optimizar, más que la propia reducción de lignina residual (Sevastyanova et al., 2006a). Concretamente en la pasta TCF [PI] sometida a envejecimiento acelerado se calcula que la influencia del contenido de HexAs en la reversión de la blancura es equivalente al 69%, esta importante interferencia puede ser debilitada con la introducción de alternativas biotecnológicas como la aplicación de xilanasas en secuencias de blanqueo (Roncero et al., 2003; Valls and Roncero, 2008), y conseguir ventajas adicionales como el ahorro de agentes químicos en el proceso de blanqueo (Vuorinen et al., 1999).

En el Capítulo 7 se manifiesta que los tratamientos realizados con el sistema lacasa-mediador [L_{HBT}] en las pastas TCF causan disminución del contenido de HexAs; un tratamiento realizado durante 4 horas implica un descenso del 23% [$27.33 \mu\text{mol/g p.s}$] con respecto a la pasta inicial [$35.37 \mu\text{mol/g p.s}$] y a 24 horas el contenido de ácidos hexenurónicos corresponde a $21.42 \mu\text{mol/g p.s}$; estos resultados se reflejan en las determinaciones del número kappa y generan expectativas para conseguir estabilidad en la blancura de pastas químicas y papeles de impresión y escritura.

La Figura 8-7 presenta las coordenadas cromáticas CIE L^*C^* , de tres tipos de pastas sometidas a envejecimiento acelerado: pasta inicial TCF, pasta con remoción de HexAs [TCF_HexAs] y pasta con aplicación del sistema lacasa-mediador [L_{HBT}]. Las coordenadas CIE L^*C^* de la pasta inicial TCF evolucionan por exposición al calor y humedad hasta 144 horas, el envejecimiento produce deterioro en las propiedades ópticas con un descenso rápido en la coordenada L^* y un incremento en la coordenada C^* , indicando pérdida de luminosidad y mayor intensidad de color. El comportamiento de la pasta TCF tras el envejecimiento acelerado es aminorado con la remoción de ácidos hexenurónicos; la pasta químicamente tratada [TCF_HexAs] genera coordenadas L^*C^* que revelan mayor luminosidad y menor intensidad de color a las observadas con el envejecimiento de la pasta inicial TCF.

Estos resultados revelan un hipotético valor añadido frente a la disminución del contenido de HexAs con el sistema lacasa-mediador, sin embargo la representación de las coordenadas cromáticas CIE L^*C^* de los puntos: L_{HBT} 0 horas y L_{HBT} 144 horas (pasta con tratamiento enzimático y exposición al calor húmedo durante 0 y 144 horas respectivamente), demuestran que hay pérdida de blancura inicial y mayor evolución de las coordenadas L^*C^* tras el envejecimiento acelerado, adquiriendo mayor

termoamarillamiento con respecto a la pasta inicial TCF y a la pasta TCF_HexAs con una reversión de blancura equivalente al 45%.

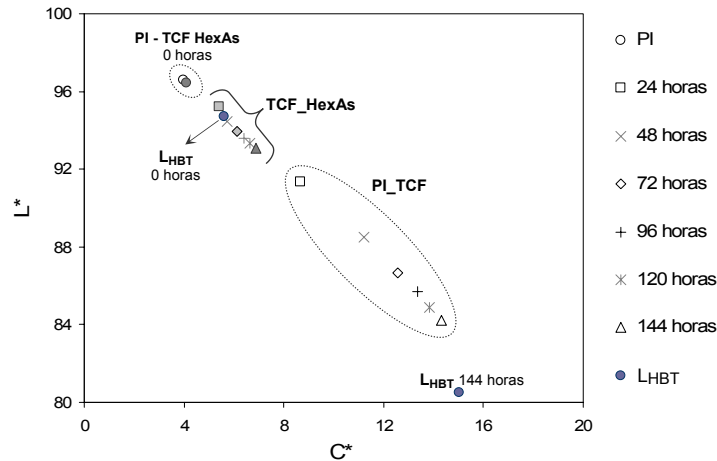


Figura 8-7. Coordenadas CIE L*C* - envejecimiento acelerado por calor húmedo de las pastas TCF con remoción de HexAs y tratamientos L_{HBT}

El efecto del tratamiento L_{HBT} sobre la reversión de blancura puede ser explicado con dos alternativas; la primera corresponde a la generación de grupos carbonilo, este grupo funcional interfiere en la estabilidad de las propiedades ópticas (Roncero, 2001); el sistema lacasa-mediador en las pastas TCF (tiempo de aplicación: 4 horas) incrementa el contenido de grupos carbonilo en 1.46 mmol/100g p.s.; una segunda justificación se relaciona con el mediador HBT, este compuesto produce una coloración naranja al actuar con la enzima lacasa en las fibras celulósicas que, junto con una posible precipitación de HBT reducen la blancura inicial y modifica las coordenadas cromáticas a*b* de la pasta inicial.

En el envejecimiento acelerado, las coordenadas a*b* (Figura 8-8) correspondientes al sistema lacasa-mediador [L_{HBT}] son superiores a la pasta inicial y pasta con remoción de HexAs indicando mayor coloración en la zona del rojo y amarillo; se evidencia que durante el tratamiento enzimático la pasta adquiere coloración que se intensifica con la inducción del termoamarillamiento enmascarando su efecto sobre la estabilidad de propiedades ópticas con la remoción de HexAs. Las coordenadas a*b* confirman la influencia de los HexAs en el envejecimiento, la eliminación de HexAs produce estabilidad y reducción de color frente a una marcada evolución de las coordenadas cromáticas en los ejes correspondientes al rojo y amarillo observada en la inducción del termoamarillamiento de la pasta inicial TCF. Los ácidos hexenurónicos no interfieren en las propiedades ópticas de las pastas sin envejecer (0 horas), la pasta

inicial TCF y TCF_HexAs registran similitud en las coordenadas a^*b^* , en el proceso de envejecimiento se expone la influencia de los HexAs en la generación de color, dados estos resultados es importante demostrar una posible reducción de las coordenadas a^*b^* con el sistema lacasa-mediador.

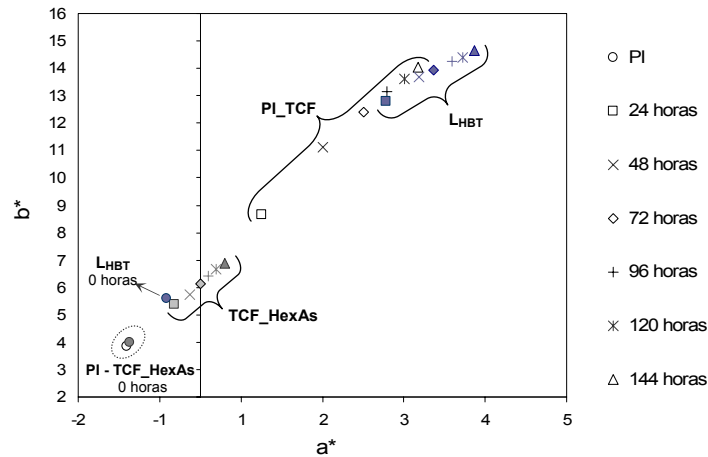


Figura 8-8. Coordenadas CIE a^*b^* - envejecimiento acelerado por calor húmedo de las pastas TCF con remoción de HexAs y tratamientos L_{HBT}

La disminución de la blancura con el sistema lacasa-mediador puede ser recuperado posteriormente con una etapa de extracción alcalina (Chakar and Ragauskas, 2000), la etapa E elimina fracciones no solubles del tratamiento enzimático; de acuerdo a las propiedades de la pasta TCF (Tabla 8-2), la etapa de extracción alcalina permite recuperar blancura (%ISO) tras la aplicación del sistema lacasa-mediador (tratamiento L_{HBT} : 4 horas) obteniendo un valor superior al tratamiento control del sistema lacasa-mediador [kL]; igualmente el efecto de la etapa E en el número kappa y contenido de ácidos hexenurónicos demuestran eliminación de residuos inherentes a la secuencia de blanqueo y tratamiento enzimático.

Tabla 8-2. Efecto enzimático L_{HBT} y etapa extractiva en propiedades de la pasta TCF

<i>Etapas</i>	Blancura (%ISO)	Índice kappa	HexAs (μ mol/g p.s.)
kL	86,0 \pm 0,1	4,9 \pm 0,0	32,04 \pm 1,10
L	80,0 \pm 1,0	3,9 \pm 0,0	27,33 \pm 0,98
kLE	87,0 \pm 0,1	4,1 \pm 0,3	32,02 \pm 0,83
LE	87,0 \pm 0,1	3,7 \pm 0,0	26,92 \pm 0,51

Adicionalmente la etapa E permite disminuir la reversión de blancura tras el tratamiento enzimático (Figura 8-9); la evolución de la blancura de los diferentes tratamientos con el envejecimiento acelerado (80 °C y 65 %HR) indican que en la curva L hay mayor presencia de grupos cromóforos o compuestos oxidantes derivados de las reacciones del sistema lacasa-mediador causando mayor reversión en las propiedades ópticas con respecto a la pasta inicial [PI_TCF]; sin embargo los tratamientos “kLE” (tratamiento control de la etapa L_{HBT} y posterior extracción alcalina) y “LE” (tratamiento L_{HBT} seguido de extracción alcalina) ponen en descubierto que la marcada influencia de los HexAs en la reversión de la blancura puede disminuir con la aplicación del sistema lacasa-mediador, la curva LE revela que efectivamente existe una disminución del 8,4% en la reversión de la blancura con respecto al tratamiento control kLE, resultado que está directamente relacionado con la remoción del 23% de ácidos hexenurónicos con la enzima lacasa (*Trametes villosa*) y el mediador HBT.

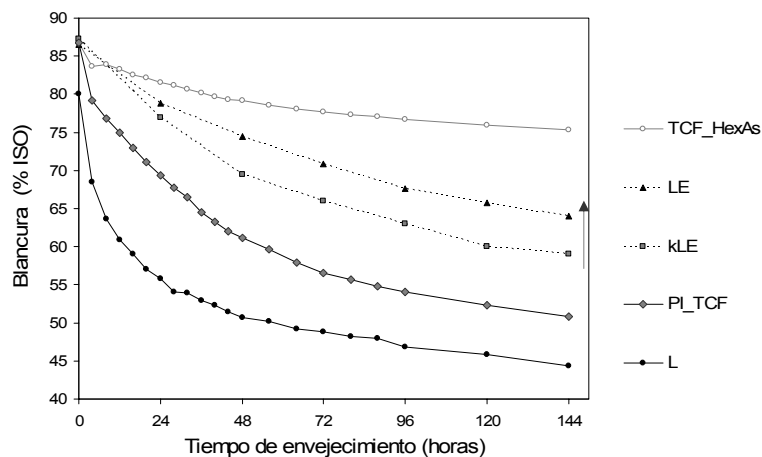


Figura 8-9. Efecto de la aplicación del sistema lacasa-mediador y etapa extractiva en la reversión de la blancura con envejecimiento acelerado por calor húmedo

La investigación realizada sobre la pasta TCF tratada con el sistema lacasa-mediador y extracción alcalina [LE] indica un pequeño pero visible aumento de la estabilidad de la blancura durante las 144 horas de envejecimiento acelerado por exposición a la luz [radiación lumínica 765 W/m²h en el equipo Suntest] (Figura 8-10); el contraste entre el control kLE y el tratamiento LE permite visualizar un efecto del sistema lacasa-mediador en la remoción de ácidos hexenurónicos y otras estructuras oxidables (lignina residual), las determinaciones del número kappa posterior a la remoción de ácidos hexenurónicos [0.93 NK en el tratamiento kLE y 0.63 NK en la secuencia LE] lo confirman.

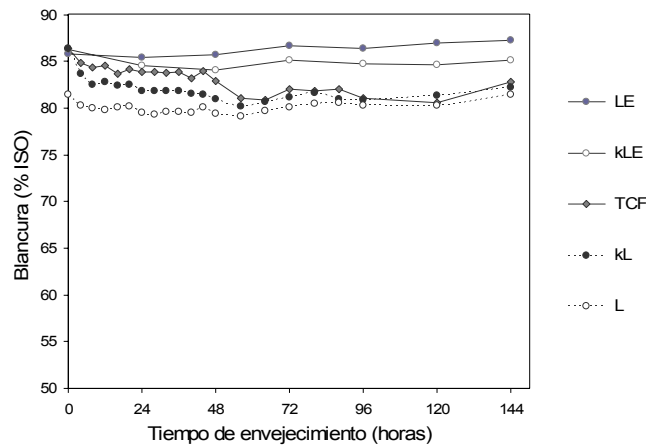


Figura 8-10. Efecto de la aplicación del sistema lacasa-mediador y etapa extractiva en la reversión de la blancura por inducción de radiación lumínica

8.3.3 Influencia de los HexAs en el refinado

La influencia de los HexAs en la reversión de la blancura es manifiesta, por lo que su eliminación reporta estabilidad en las propiedades ópticas. Sin embargo, en relación a la resistencia del papel, no existe un estudio detallado que enlace directamente el efecto de la remoción de HexAs con la calidad de las pastas papeleras; de esta manera en esta sección se plantea evaluar la influencia de los ácidos hexenurónicos en la operación de refinado y obtener respuestas sobre su interferencia en la capacidad de enlace fibra-fibra y en la resistencia del papel.

La drenabilidad ($^{\circ}$ SR) y la capacidad de hidratación de las fibras (%IRA) tras la operación de refinado sufre una alteración con la remoción de los ácidos hexenurónicos. El refinado de la pasta inicial TCF presenta mayor retención de agua con relación a la pasta libre del contenido de HexAs [TCF_HexAs]; de acuerdo a los resultados de la Figura 8-11 se demuestra que en el refinado la presencia de HexAs potencia las características hidrofílicas y/o la retención de agua en las partes internas de las fibras; la composición química de la pasta condiciona el índice de retención de agua y en consecuencia la capacidad de unión fibra-fibra en la formación del papel.

La penetración del agua en la matriz interna de las fibras se incrementa con el refinado, e incluye el agua retenida por capilaridad, porosidad y el agua químicamente vinculada a los grupos hidroxilo y carboxilo en las fibras, así el %IRA de la pasta TCF está vinculado a la modificación superficial de las fibras tras la operación de refinado y a su composición química, con la eliminación de los ácidos hexenurónicos [TCF_HexAs] el efecto de retención de agua es inferior al reducir la disponibilidad de

grupos -OH y -COO⁻ para formar puentes de hidrogeno (fibra-agua-fibra). La remoción de HexAs causa un descenso máximo del 12% en el %IRA con respecto a la pasta inicial TCF (Figura 8-11).

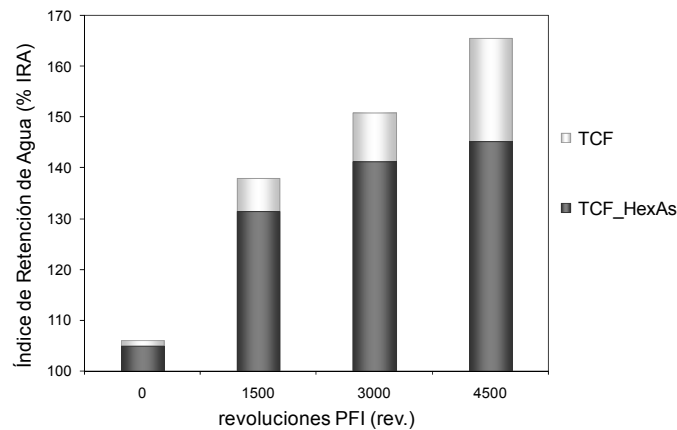


Figura 8-11. Influencia del contenido de HexAs en el índice de retención de agua

La drenabilidad ($^{\circ}$ SR) también experimenta un descenso notable con la remoción de HexAs (Figura 8-12), este efecto se puede relacionar con la disminución de la superficie específica de las fibras al disminuir la capacidad de hidratación e hinchamiento. Una variación máxima del 21% en la resistencia al desgote entre la pasta inicial TCF y TCF_HexAs indica la influencia de los ácidos hexenurónicos en fenómenos físicos vinculados al refinado. Las propiedades de la pasta (índice de retención de agua y resistencia al drenaje) demuestran la función de los grupos ionizables en la hidratación de las fibras, estos grupos determinan importantes interacciones en los procesos papeleros (Fardim et al., 2002), favorecen la hidratación y consecuentemente incrementarían la capacidad de enlaces interfibrilares que modifican las características de resistencia en las pastas (Zhang et al., 1994).

Los ácidos hexenurónicos por su carácter aniónico confieren propiedades electrocinéticas a la pasta TCF, así lo revela la determinación de la carga superficial de las fibras con la adsorción de un polímero catiónico [Metil-Glicol Chitosan (MGCh)] y posterior titulación coloidal con Polivinil Sulfato Potásico (PVSK); un resultado de 15.23 μ eq-gMGCh/g p.s. indica disminución de la carga superficial tras la remoción de HexAs con respecto a la pasta inicial TCF cuya carga es equivalente a 21.30 μ eq-gMGCh/g p.s. Estos resultados contribuyen a explicar los fenómenos de retención de agua y drenabilidad, los grupos aniónicos localizados en la superficie de las fibras influyen en las interacciones electroquímicas, que aplicado a la drenabilidad la

disminución de carga significa una disminución en los efectos de refinado como la fibrillación externa.

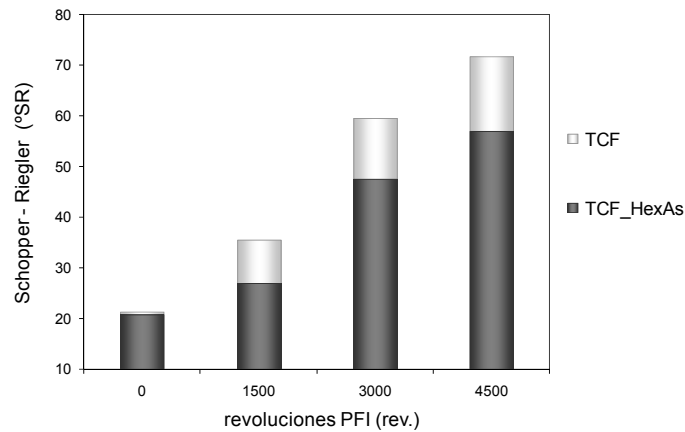


Figura 8-12. Influencia de los ácidos hexenurónicos en el Shopper - Riegler

Los HexAs afectan la hidratación de las fibras (*swelling*) y, consecuentemente, la generación de enlaces interfibras, así lo demuestra el análisis de permeabilidad y densidad (Figura 8-13). La remoción de HexAs [TCF_HexAs] causa un incremento en la porosidad del papel y menor compactación del sistema fibroso en la formación del papel (densidad).

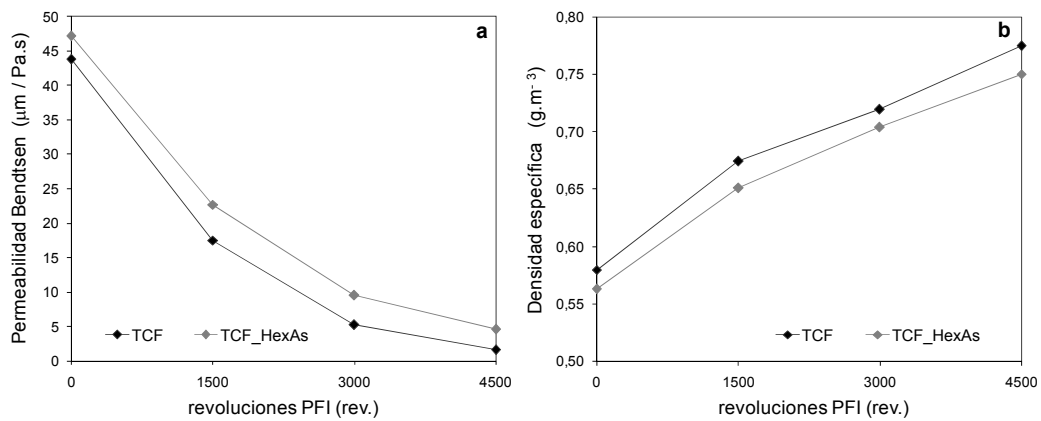


Figura 8-13. Influencia de los ácidos hexenurónicos en propiedades de permeabilidad (a) y densidad específica (b)

Las curvas de refinado TCF y TCF_HexAs tienen un comportamiento paralelo o equivalente al incremento del nivel de energía, donde la pasta inicial TCF presenta

indicios de una mayor consolidación del papel, sugiriendo que los grupos ácidos confieren más flexibilidad e incrementan los enlaces interfibrilares de la hoja (Korpela, 2002).

Las propiedades fisicomecánicas de los papeles elaborados con las pastas TCF y TCF_HexAs siguen tendencias similares, salvo en el punto de refinado que corresponde a 3000 rev. en la pasta TCF, anomalía que se atribuye al complejo proceso experimental. En la evaluación de la resistencia del papel se encuentra una disminución del índice de estallido tras la remoción de HexAs (Figura 8-14a), este resultado indica que los grupos ácidos interfieren en el refinado (Lindstrom, 1992) y en la resistencia específica de los enlaces fibra-fibra (Barzyk et al., 1997). La remoción de HexAs [TCF_HexAs] incrementa la energía de refinado para obtener un determinado valor de resistencia al estallido con relación a la pasta inicial TCF. Sin embargo en la resistencia a la tracción se produce un efecto contrario al obtenido con el índice de estallido; la Figura 8-14b, que relaciona la resistencia al desgote ($^{\circ}$ SR) con el índice de tracción, presenta resultados interesantes desde el punto de vista de conseguir resistencia en el papel con mayor drenabilidad. A 4500 rev. el índice de tracción para la pasta inicial TCF corresponde a 59.91 Nm/g y con la remoción de HexAs se obtiene un valor similar de 59.44 Nm/g, la eliminación de HexAs incrementa la drenabilidad hasta en 15 $^{\circ}$ SR sin alterar la resistencia a la tracción. A 1500 rev. se observa un efecto equivalente a 4500 rev., donde las pastas TCF y TCF_HexAs no generan una variación significativa en la resistencia, representando que con la remoción de HexAs es posible aumentar la drenabilidad (menor $^{\circ}$ SR) para un valor específico de resistencia a la tracción manteniendo la energía requerida para la operación de refinado.

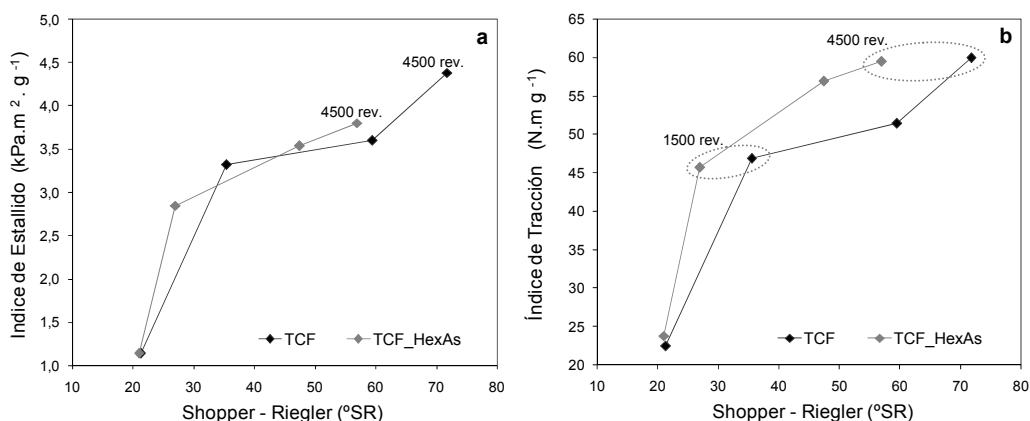


Figura 8-14. Influencia de los ácidos hexenurónicos en el índice de estallido (a) y al índice de tracción (b) con relación al Shopper - Riegler

Con respecto a otras propiedades fisicomecánicas, se obtiene que la resistencia al desgarro evoluciona con el refinado hasta llegar a un punto máximo y a un posterior descenso; en la pasta TCF el punto máximo se ubica entre 1500 rev. y 3000 rev., con la remoción de HexAs el máximo está localizado en 3000 rev. y el descenso en el desgarro que se presenta a 4500 rev. es menor con relación a la pasta TCF (Figura 8-15a). La remoción de los ácidos hexenurónicos genera una respuesta positiva tanto en el índice de desgarro como en el índice de tracción al desarrollar resistencias similares a la pasta TCF pero con mayor drenabilidad.

En el desgarro influyen los efectos primarios y secundarios del refinado, con mayor influencia de la fibrillación externa, longitud de fibra y cantidad de finos, estos efectos físicos se mantienen en los dos tipos de pasta (TCF y TCF_HexAs), por consiguiente el contraste en los resultados son atribuidos a la generación de enlaces; se tiene en cuenta que al aplicar un esfuerzo de desgarro intervienen dos fenómenos que corresponden a la fricción entre fibras contiguas y rotura, la energía de fricción requerida para separar fibras es mayor que la acción de corte (Casey, 1980; Torres López, 1988). En la pasta TCF a 4500 rev. se presenta mayor adhesión del sistema fibroso -unión interfibras- y el papel es más denso que en la pasta TCF_HexAs (ver Figura 8-13), en consecuencia se dificulta el deslizamiento o separación de las fibras, la energía aplicada en el ensayo de desgarro realiza rotura en las fibras, de esta forma el trabajo implícito del desgarro disminuye; y con la remoción de HexAs en 3000 rev. y 4500 rev. existe un ligero incremento en la resistencia al desgarro debido a la menor compactación de las fibras en el papel, -este efecto ocasiona mayor fricción entre fibras contiguas-.

En la resistencia al plegado, la remoción de HexAs en la pasta TCF no genera cambios significativos, las curvas TCF y TCF_HexAs (Figura 8-15b) indican equivalencia en la aptitud al refinado; la resistencia al plegado depende de la homogeneidad de la hoja de papel, este concepto indica que la eliminación de HexAs no altera negativamente la consolidación de las fibras. Resultados interesantes se observan en la relación de la resistencia al plegado y el Shopper-Riegler (°SR) desde el punto de vista de generar resistencia con mayor drenabilidad (menor °SR); a 4500 rev. la pasta TCF presenta una resistencia al plegado de 3.37 con 72 °SR y con la remoción de HexAs se obtiene una resistencia de 3.29 con 57 °SR, estos resultados exponen igual resistencia al plegado con fluctuaciones en la determinación de la drenabilidad.

El incremento en la drenabilidad no induce a una alteración negativa de las propiedades fisicomecánicas del papel (tracción, desgarro y plegado). La remoción de

HexAs y su efecto sobre la operación de refinado se considera un hallazgo al generar expectativas para incrementar los niveles de producción en los procesos papeleros.

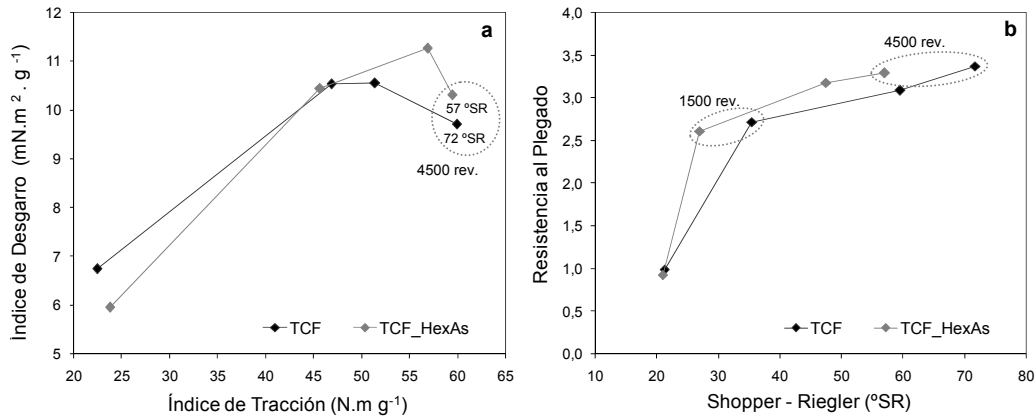


Figura 8-15. Influencia de los ácidos hexenurónicos en propiedades de resistencia. (a) Índice de desgarro vs. índice de tracción y (b) resistencia al plegado vs. Shopper - Riegler

El refinado de la pasta TCF_HexAs ha permitido determinar la influencia de los ácidos hexenurónicos en el °SR, %IRA, densidad, permeabilidad Bendtsen y en propiedades fisicomecánicas del papel. La interferencia de los grupos ácidos se relaciona con las propiedades electrocinéticas (Konn et al., 2007) y las propiedades hidrofílicas que incrementan la tensión superficial lo cual facilitan la penetración del agua al interior de las fibras, promueven el hinchamiento, plasticidad, flexibilidad, capacidad de enlace en las fibras, y que como consecuencia pueden interferir en la respuesta al refinado (Eiras and Colodette, 2003).

Para afianzar los resultados presentados en esta sección se realiza un tratamiento control con una pasta ECF cuyo contenido de HexAs es despreciable ($0.2 \mu\text{mol/g p.s.}$) en comparación a la pasta TCF ($35.4 \mu\text{mol/g p.s.}$); el objetivo es verificar si las condiciones químicas y físicas requeridas para la remoción de los ácidos hexenurónicos influyen en el refinado de las pastas y confirmar si el efecto obtenido en la pasta TCF corresponde totalmente a la interferencia de los HexAs. El refinado de la pasta ECF sometida a una hipotética remoción de HexAs indican mayor resistencia al desgote (valores superiores de °SR) con relación a la pasta inicial ECF (Tabla 8-3), este efecto es contrario al observado con la pasta TCF_HexAs donde la eliminación de grupos ácidos implica incrementos en la drenabilidad sin modificar propiedades de resistencia del papel (tracción, desgarro, plegado). En la pasta ECF_remoción HexAs, se presenta una importante modificación de la permeabilidad, donde incrementa la resistencia al paso del flujo del aire por la obtención de papeles mucho más cerrados;

en algunos puntos de refinado se obtiene mayor resistencia al estallido junto con una disminución en la resistencia a la tracción, el conjunto de estas propiedades indican un efecto opuesto a la pasta TCF_HexAs, resultados que permiten confirmar la interferencia de los ácidos hexenurónicos en la operación de refinado.

Tabla 8-3. Influencia de la remoción de HexAs en el refinado de la pasta ECF

PFI/ rev.	Pasta inicial ECF				Pasta ECF_remoción HexAs			
	0	1500	3000	4500	0	1500	3000	4500
Shopper-Riegler, °SR	20	25	35	50	21	36	58	71
I. retención de agua, %IRA	103	128	142	150	100	127	143	162
Pb Bendtsen, $\mu\text{m (Pa.s)}^{-1}$	48,2	28,4	16,3	7,4	46,6	19,1	4,6	1,9
I. Desgarro, $\text{mN m}^2\text{g}^{-1}$	5,91	10,19	11,36	11,13	5,91	12,67	10,99	10,29
R. Plegado, $\log(\text{N}^\circ \text{ Pliegues})$	0,81	2,48	3,49	3,65	0,88	2,65	3,50	3,51
I. Estallido, $\text{kPa m}^2\text{g}^{-1}$	0,94	2,47	3,29	3,95	1,07	2,74	3,63	3,94
I. Tracción, Nm g^{-1}	23,27	41,90	54,30	61,69	20,27	42,98	52,24	58,83

8.4 CONCLUSIONES

El termoamarillamiento de las pastas TCF y ECF inducido por calor y humedad se encuentra directamente vinculado con la composición química de las pastas papeleras, donde la presencia de ácidos hexenurónicos en las pastas TCF (35.4 $\mu\text{mol/g p.s}$) generan una influencia del 69% sobre la reversión de la blancura; en las pastas ECF la reversión de blancura es inferior, y depende principalmente del contenido de grupos carboxilos y carbonilos.

Las coordenadas cromáticas CIE L*C* y CIE a*b* confirman la influencia de los ácidos hexenurónicos en el proceso de envejecimiento, la eliminación de HexAs produce estabilidad y reducción de color frente a una marcada evolución de las coordenadas cromáticas en los ejes correspondientes al rojo y amarillo observada en la inducción del termoamarillamiento de la pasta TCF.

La reversión de blancura en las pastas TCF está directamente relacionada con la hidrólisis de los ácidos hexenurónicos y generación de grupos cromóforos; en el envejecimiento acelerado por calor húmedo existe una progresiva degradación de HexAs, las determinaciones del número kappa posteriores a 144 horas de envejecimiento comprueban una reducción del 33% con respecto a la pasta inicial sin

envejecer [5.0 NK], existe reducción del kappa al disminuir el contenido de HexAs en el proceso de termoamarillamiento.

En el envejecimiento acelerado por radiación lumínica no se detecta marcada reversión de la blancura en las pastas ECF, TCF y TCF_HexAs, el contenido de ácidos hexenurónicos no induce a un fotoamarillamiento en el papel, las pequeñas variaciones observadas son consecuencia del contenido de lignina residual y de otras estructuras oxidables.

La introducción de métodos biotecnológicos en los sistemas papeleros, y concretamente la aplicación del sistema lacasa-mediador [L_{HBT}] en la pasta TCF, causa remoción del contenido de ácidos hexenurónicos, generando expectativas en la estabilidad de la blancura. Una etapa LE permite disminuir la reversión de la blancura en un 8,4%, esta respuesta positiva incita a continuar en investigaciones para optimizar la eliminación de HexAs.

Adicional al proceso de envejecimiento, la remoción del contenido de ácidos hexenurónicos presentes en la pasta TCF modifica propiedades específicas como la drenabilidad ($^{\circ}SR$) y la capacidad de retención de agua (%IRA) tras la operación de refinado; la disminución de estas variables indica que los HexAs intervienen en la capacidad de cohesión fibra-fibra y produce efectos sobre las propiedades de densidad, permeabilidad, y estallido.

La influencia de los HexAs en la operación de refinado genera una respuesta positiva y expectativas al mantener la resistencia a la tracción, plegado y desgarrado con menor Shopper-Riegler ($^{\circ}SR$); con la remoción de HexAs es posible aumentar la drenabilidad para un valor específico de resistencia manteniendo la energía requerida para la operación de refinado; de esta forma la remoción de ácidos hexenurónicos proporciona un valor añadido en los sistemas de producción al incrementar la drenabilidad de las pastas y la estabilidad de las propiedades ópticas.

Un tratamiento control sobre las pastas ECF demuestra la interferencia de los HexAs en la operación de refinado al obtener mayor resistencia a la permeabilidad con menor drenabilidad (mayor $^{\circ}SR$), resultados opuestos a los obtenidos con la pasta TCF_HexAs, igualmente se constata que en la operación de refinado son múltiples los factores que intervienen en la evolución de las propiedades de las pastas blanqueadas, y no dependen únicamente de la morfología de las fibras sino también de su composición química.

8.5 BIBLIOGRAFÍA

- Barzyk, D., Page, D.H. and Ragauskas, A., 1997. Acidic group topochemistry and fibre-to-fibre specific bond strength. *Journal of Pulp and Paper Science*, 23(2): 59-61.
- Bergnor-Gidnert, E., Tomani, P.E. and Dahlman, O., 1998. Influence on pulp quality of conditions during the removal of hexenuronic acids. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 13(4): 310-316.
- Buchert, J., Bergnor, E., Lindblad, G., Viikari, L. and Ek, M., 1997. Significance of xylan and glucomannan in the brightness reversion of kraft pulps. *Tappi Journal*, 80(6): 165-171.
- Buchert, J., Tenkanen, M., Viikari, L., Teleman, A., Harjunpaa, V. and Vuorinen, T., 1995. Effect of cooking and bleaching on the structure of xylan in conventional pine kraft pulp. *Tappi Journal*, 78(11): 125-130.
- Casey, J.P., 1980. *Pulp and Paper: Chemistry and Chemical Technology*, vol 2. John Wiley & Sons, New York, 1446 pp.
- Costa, M.M. and Colodette, J.L., 2002. Efeito da composicao quimica da polpa kraft-O2 na sua branqueabilidade. *O Papel*, 63(8): 93-103.
- Chai, X.S., Yoon, S.H., Zhu, J.Y. and Li, J., 2001. The fate of hexenuronic acid groups during alkaline pulping of loblolly pine. *Journal of Pulp and Paper Science*, 27(12): 407-411.
- Chakar, F.S. and Ragauskas, A.J., 2000. Effects of oxidative alkaline extraction stages after laccase HBT and laccase NHAA treatments-an NMR study of residual lignins. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 20(2): 169-184.
- Chirat, C. and De La Chapelle, V., 1999. Heat- and light-induced brightness reversion of bleached chemical pulps. *Journal of Pulp and Paper Science*, 25(6): 201-205.
- Daniel, A.I.D., Neto, C.P., Evtuguin, D.V. and Silvestre, A.J.D., 2003. Hexenuronic acid contents of *Eucalyptus globulus* kraft pulps: Variation with pulping conditions and effect on ECF bleachability. *Tappi Journal*, 2(5): 3-8.
- Devenyns, J. and Chauveheid, E., 1997. Uronic acids and metals control. *International Symposium on Wood and Pulping Chemistry. Proceedings ISWPC. Montreal*, (1): 5-9 pp.
- Eiras, K.M.M. and Colodette, J.L., 2003. *Eucalyptus* kraft pulp bleaching with chlorine dioxide at high temperature. *Journal of Pulp and Paper Science*, 29(2): 64-69.
- Eiras, K.M.M. and Colodette, J.L., 2005. Investigation of *eucalyptus* kraft pulp brightness stability. *Journal of Pulp and Paper Science*, 31(1): 13-18.

- Elsander, A., Ek, M. and Gellerstedt, G., 2000. Oxalic acid formation during ECF and TCF bleaching of kraft pulp. *Tappi Journal*, 83(2): 73-77.
- Fardim, P., Holmbom, B., Ivaska, A., Karhu, J., Mortha, G. and Laine, J., 2002. Critical comparison and validation of methods for determination of anionic groups in pulp fibres. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 17(3): 346-351.
- Forsskahl, I., Tylli, H. and Olkkonen, C., 2000. Participation of carbohydrate-derived chromophores in the yellowing of high-yield and TCF pulps. *Journal of Pulp and Paper Science*, 26(7): 245-249.
- García Hortal, J.A., 2007. *Fibras Papeleras*. Edicions UPC, Barcelona, 243 pp.
- Gellerstedt, G. and Li, J., 1996. An HPLC method for the quantitative determination of hexenuronic acid groups in chemical pulps. *Carbohydrate Research*, 294(1): 41-51.
- Granstrom, A., Eriksson, T., Gellerstedt, G., Roost, C. and Larsson, P., 2001. Variables affecting the thermal yellowing of TCF-bleached birch kraft pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 16(1): 18-23.
- Granstrom, A., Gellerstedt, G. and Eriksson, T., 2002. On the chemical processes occurring during thermal yellowing of a TCF-bleached birch kraft pulp. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 17(4): 427-433.
- Jiang, Z.H., Audet, A., Sullivan, J., van Lierop, B. and Berry, R., 2001. A new method for quantifying hexenuronic acid groups in chemical pulps. *Journal of Pulp and Paper Science*, 27(3): 92-97.
- Konn, J., Pranovich, A., Fardim, P. and Holmbom, B., 2007. Characterisation and effects of new anionic groups formed during chemithermomechanical pulping of spruce. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 296(1-3): 1-7.
- Korpela, A., 2002. Improving the strength of PGW pine pulp by alkaline peroxide treatment. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 17(2): 183-186.
- Lachenal, D. and Chirat, C., 2000. High temperature chlorine dioxide bleaching of hardwood kraft pulp. *Tappi Journal*, 83(8): 96-102.
- Li, J. and Gellerstedt, G., 1998. On the structural significance of the kappa number measurement. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 13(2): 153-158.
- Li, J., Sevastyanova, O. and Gellerstedt, G., 2002. The distribution of oxidizable structures in ECF-and TCF-bleached kraft pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 17(4): 415-419.
- Lindstrom, T., 1992. Chemical factors affecting the behaviour of fibres during papermaking. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 7(4): 181-192.

- 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. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. and Vidal, T., 2003. Effect of xylanase on ozone bleaching kinetics and properties of Eucalyptus kraft pulp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(10): 1023-1031.
- Sevastyanova, O., Li, J. and Geilerstedt, G., 2006a. On the reaction mechanism of the thermal yellowing of bleached chemical pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 21(2): 188-192.
- Sevastyanova, O., Li, J. and Gellerstedt, G., 2006b. Influence of various oxidizable structures on the brightness stability of fully bleached chemical pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 21(1): 49-53.
- Simao, J.P.F., Egas, A.P.V., Baptista, C.M.S.G., Carvalho, M.G. and Castro, J.A.A.M., 2005. Evolution of Methylglucuronic and Hexenuronic Acid Contents of Eucalyptus globulus Pulp during Kraft Delignification. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44(9): 2990-2996.
- Smit, D., 1993. Brightness reversion. *Paper Southern Africa*, 8(1): 34-39.
- Teleman, A., Hausalo, T., Tenkanen, M. and Vuorinen, T., 1996. Identification of the acidic degradation products of hexenuronic acid and characterisation of hexenuronic acid-substituted xylooligosaccharides by NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 280(2): 197-208.
- Tenkanen, M., Gellerstedt, G., Vuorinen, T., Teleman, A., Perttula, M., Li, J. and Buchert, J., 1999. Determination of hexenuronic acid in softwood kraft pulps by three different methods. *Journal of Pulp and Paper Science*, 25(9): 306-311.
- Torres López, A.L., 1988. Últimos avances en la tecnología del refinado. Introducción al refinado: Aspectos generales. *Tecnología Papelera E.T.S.E.I.A.T. Universidad Politécnica de Cataluña*, Terrassa.
- Valls, C., 2008. Aplicació de nous sistemes enzimàtics pel blanqueig de pasta kraft d'eucaliptus. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.
- Valls, C. and Roncero, M.B., 2008. Influence of different enzymatic bleaching stages on hexenuronic acids. *First European workshop on biotechnology for lignocellulose biorefineries - Cost, Copenhagen*.
- Vuorinen, T., Fagerstrom, P., Buchert, J., Tenkanen, M. and Teleman, A., 1999. Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps. *Journal of Pulp and Paper Science*, 25(5): 155-162.

Zhang, Y., Sjogren, B., Engstrand, P. and Htun, M., 1994. Determination of charged groups in mechanical pulp fibres and their influence on pulp properties. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 14(1): 83-102.

CAPÍTULO 9.

Conclusiones generales

Con el “estudio del refinado de pastas papeleras (ECF y TCF) utilizando métodos biotecnológicos (enzimas)” se obtiene una importante conclusión que corresponde al efecto de la enzima Cel9B en el refinado de las pastas kraft de Eucalyptus globulus. La aplicación de la celulasa Cel9B del tipo 1,4-β endoglucanasa de Paenibacillus barcinonensis provoca una modificación de las fibras acelerando los efectos del refinado y permitiendo la obtención de papeles con mayor resistencia, así podemos calificar a la celulasa Cel9B como “coadyuvante del refinado”; esta alternativa biotecnológica es una fuente potencial para obtener ahorros de energía en la etapa del refinado. La acción de la enzima Cel9B sobre el refinado se debe principalmente al dominio catalítico GH9-CBD3c presente en su estructura modular, la evaluación de celulasas recombinantes pone en descubierto que el dominio catalítico puede aplicarse en las pastas papeleras para obtener un biorefinado con una ventaja adicional que corresponde a la evolución de la resistencia al desgarro en el refinado, donde el dominio catalítico permite obtener mayor resistencia al desgarro en comparación al efecto de la enzima completa Cel9B. En el cumplimiento de mejorar la calidad del papel como producto final se incluye la resistencia y las propiedades ópticas; en particular en la pasta TCF se observa que en el envejecimiento acelerado por luz y calor hay una reversión de la blancura por efecto de estructuras oxidables como los ácidos hexenurónicos, en este aspecto, la aplicación del sistema lacasa-mediador se convierte en una alternativa para incrementar la estabilidad de las pastas TCF por su efecto en la remoción de los ácidos hexenurónicos, y se crea expectativas sobre la influencia en el refinado puesto que una remoción de los ácidos hexenurónicos aumenta la drenabilidad de las pastas papeleras sin modificar la resistencia del papel (tracción, desgarro y plegado).

9.1 APLICACIÓN DE CELULASAS

En esta sección se presentan los aspectos más relevantes de las aplicaciones biotecnológicas en el refinado de pastas kraft ECF y TCF utilizando la enzima Cel9B (endoglucanasa) y la enzima Cel48C (exoglucanasa).

- La enzima Cel9B confiere a las fibras celulósicas una mayor capacidad de hidratación, la accesibilidad del agua a la matriz interna de las fibras se debe a la deslaminación y/o eliminación parcial de las capas externas de la fibra, este efecto es positivo ya que permite el incremento de puntos de contacto libres para la formación de enlaces con fibras contiguas efectuándose así una eficiente consolidación del manto fibroso en la formación del papel.
- La especificidad de la enzima Cel9B por el sustrato celulósico se generaliza para las pastas kraft ECF y TCF de *Eucalyptus globulus*, en los dos tipos de pastas la enzima Cel9B realiza un efecto de biorefinado modificando las propiedades de la pasta (°SR, %IRA), la permeabilidad del papel (permeabilidad Bendtsen) y las propiedades fisicomecánicas. La resistencia al estallido, tracción, y plegado incrementan con respecto a los tratamientos control y a la pasta inicial; la evolución de la resistencia al desgarramiento confirma que la celulasa Cel9B acelera los efectos primarios y secundarios del refinado, así las curvas de refinado de las pastas tratadas con la enzima Cel9B requieren menos energía mecánica que las refinadas convencionalmente.
- El refinado de las pastas TCF revela una mayor evolución en el índice de retención de agua (%IRA), en la resistencia al drenaje (°SR) -efectos que se atribuyen a su mayor contenido en ácidos carboxílicos y al factor de cristalinidad- y en la obtención de papeles más cerrados -densos- con alta resistencia en el índice de estallido. La evolución en las resistencias al desgarramiento, plegado y tracción demuestran que una secuencia de blanqueo TCF provoca mayor modificación en las fibras celulósicas en comparación a una ECF.
- La enzima Cel9B produce un mayor efecto de biorefinado en la pasta ECF; con la pasta TCF su influencia es menor y las diferencias existentes en los dos tipos de pasta se atribuyen a la severidad de los tratamientos químicos requeridos por las secuencias de blanqueo, siendo la enzima Cel9B más efectiva en pastas que presenten menor aptitud al refinado.

- El biorefinado permite catalogar a la enzima Cel9B como coadyuvante del refinado al actuar como un biocatalizador altamente eficiente y específico implicando degradación o transformación de componentes celulósicos sin efectuar cortes en la cadena polimérica de la celulosa, ni cambios en la cristalinidad; la presencia de oligosacáridos de longitudes variables: celobiosa, celotriosa y glucosa en los efluentes de los tratamientos enzimáticos de la pasta ECF y TCF se relacionan directamente con el ablandamiento de las fibras celulósicas que benefician a la operación del refinado.
- Efectos como la fibrillación externa son indispensables para fomentar las uniones interfibrilares, este efecto es mayor para los tratamientos enzimáticos (Cel9B), las evaluaciones realizadas por microscopía óptica y SEM refuerzan las teorías sobre la influencia enzimática en el refinado de pastas papeleras donde la enzima Cel9B no reemplaza la operación mecánica; el “biorefinado” se refiere a la acción conjunta entre el tratamiento mecánico y biológico.
- La enzima Cel9B de *Paenibacillus barcinonensis* de arquitectura estructural: GH9-CBD3c-Fn3-CBD3b actúa como coadyuvante del refinado por acción de los dominios que la constituyen, la respuesta positiva del biorefinado permite continuar con la investigación para identificar el dominio responsable de la modificación de las fibras. La aplicación del dominio catalítico [GH9-CBD3c] y los dominios de unión a celulosa [Fn3-CBD3b] y [CBD3b] en la pasta TCF demuestran que el dominio catalítico [GH9-CBD3c] es el dominio encargado de realizar una mayor modificación en las fibras. Los refinados realizados con la enzima completa Cel9B y el dominio catalítico [GH9-CBD3c] indican que el dominio catalítico sigue la tendencia del efecto obtenido con la enzima completa Cel9B y presenta mejores resultados en la resistencia al desgarró. El dominio catalítico [GH9-CBD3c] es capaz de realizar un biorefinado y puede ser aplicado en la operación del refinado sin la interacción de los dominios de unión a celulosa [Fn3-CBD3b y CBD3b].
- La enzima Cel9B produce un biorefinado por el efecto sinérgico entre los dominios de unión a celulosa [Fn3-CBD3b y CBD3b] y el dominio catalítico [GH9-CBD3c]. Los dominios Fn3-CBD3b y CBD3b muestran menor actividad sobre el refinado, sin embargo no se descarta su efecto en la modificación superficial de las fibras; en particular, el dominio de unión a celulosa CBD3b influye en la permeabilidad del papel sin alterar las propiedades biométricas de las fibras (longitud y ancho de fibra, finos), así su principal contribución en la morfología de las fibras se correlaciona con los fenómenos de fibrillación.

- La aplicación de una exoglucanasa Cel48C en el refinado de la pasta ECF no es comparable con la efectividad de la enzima Cel9B. Los tratamientos con la celulasa Cel48C producen una ligera modificación superficial de las fibras generando incrementos en el °SR y el %IRA; en las propiedades de la pasta se descarta la obtención de un biorefinado, los efectos que realiza la enzima Cel48C sobre las fibras no son suficientes para influir en las propiedades fisicomecánicas del papel.
- La evaluación de un posible sinergismo entre celulasas endo-exo [Cel9B+Cel48C] indica que no es posible obtener un efecto de biorefinado superior al de la enzima individual Cel9B. Con los tratamientos Cel9B+Cel48C se obtienen papeles con una resistencia equivalente a los tratamientos Cel9B. Es posible que el efecto sinérgico se pueda manifestar con la utilización de enzimas purificadas a diferentes condiciones de aplicación.

9.2 APLICACIÓN DEL SISTEMA LACASA-MEDIADOR

La aplicación de la enzima lacasa de *Trametes villosa* junto con el mediador HBT (1-hidroxibenzotriazol) -sistema lacasa-mediador- en la pasta TCF y ECF permite obtener las siguientes conclusiones:

- La aplicación del sistema lacasa-mediador en la pasta TCF reduce el número kappa, esta disminución se vincula directamente a la remoción de los ácidos hexenurónicos y no a la degradación de la lignina residual. Además sobre la pasta TCF la aplicación del tratamiento enzimático provoca un descenso de la viscosidad específica, pero una etapa reductora descarta que el sistema lacasa-mediador realice cortes en el polímero celulósico. El descenso de viscosidad es consecuencia de una oxidación de los hidratos de carbono, por consiguiente sistema lacasa-mediador incrementa los grupos carbonilo en la pasta TCF
- El sistema lacasa-mediador disminuye el contenido de grupos carboxilos, vinculándose este efecto a la remoción parcial de los ácidos hexenurónicos, al mismo tiempo modifica las propiedades electrocinéticas de la pasta TCF como consecuencia de la remoción de grupos ionizables (ácidos carboxílicos y hexenurónicos). La carga superficial de las fibras y el potencia ζ experimentan una disminución con respecto al tratamiento control.

- El sistema lacasa-mediador no influye en el desarrollo de los efectos primarios del refinado, sin embargo la leve disminución en la capacidad de hidratación de las fibras celulósicas permite evidenciar un posible efecto secundario sobre el sistema fibra-agua al disminuir los grupos ionizables y modificar las propiedades electrocinéticas.
- Con respecto a la resistencia fisicomecánica del papel, el sistema lacasa-mediador modifica ligeramente el índice de estallido, tracción y desgarró; el efecto del tratamiento enzimático sobre la resistencia se relaciona con la disminución de los grupos ionizables (ácidos carboxílicos, ácidos hexenurónicos) y las propiedades electrocinéticas de la pasta TCF; los resultados obtenidos con el refinado de la pasta ECF verifican que los efectos del sistema lacasa-mediador se deben a la remoción de estructuras oxidables.
- El termoamarillamiento de las pastas TCF y ECF inducido por calor y humedad muestra una mayor reversión de la blancura para la pasta TCF. Las pastas TCF se caracterizan por presentar un alto contenido de ácidos hexenurónicos, la inestabilidad de las propiedades ópticas se atribuyen a la presencia de estos ácidos. En el envejecimiento del papel se generan grupos cromóforos que corresponden a los productos de degradación de los ácidos hexenurónicos, así lo confirma la reducción del número kappa obtenido a partir de un papel envejecido a 144 horas.
- La aplicación del sistema lacasa-mediador genera expectativas para obtener mayor estabilidad de la blancura en la pasta TCF. La aplicación de una etapa LE disminuye la reversión de la blancura tras realizar un envejecimiento acelerado por calor y humedad, esta respuesta positiva se debe a la eliminación parcial de los ácidos hexenurónicos. Los resultados sugieren continuar con estudios que permitan optimizar la eliminación de los ácidos hexenurónicos con el sistema lacasa-mediador.
- Una efectiva remoción del contenido de ácidos hexenurónicos presentes en la pasta TCF también influye en la operación del refinado, concretamente la eliminación de los ácidos hexenurónicos disminuye la resistencia al desgote ($^{\circ}\text{SR}$) y el índice de retención de agua (%IRA), se revela un valor potencial al obtener papeles con una determinada resistencia (tracción, plegado y desgarró) a mayor drenabilidad.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Ahmad, S., Jain, R., Mediratta, R., Prasad, K.D. and Arora, S.S., 2006. Enzymatic treatment on chemical pulp in beating/refining process- An attempt towards energy conservation. IPPTA: Quarterly Journal of Indian Pulp and Paper Technical Association, 18(3): 127-132.
- Akhtar, M., 1994. Biomechanical Pulping of Aspen Wood Chips With 3 Strains of *Ceriporiopsis subvermispora*. *Holzforschung*, 48(3): 199-202.
- Allison, R.W., Timonen, O., McGrouther, K.G. and Suckling, I.D., 1999. Hexenuronic acid in kraft pulps from radiata pine. *Appita Journal*, 52(6): 448-453.
- Annergren, G.E., 1996. Strength properties and characteristics of bleached chemical and (chemi)mechanical pulps. In: *Pulp Bleaching – Principles and Practice*, Section VII: The Properties of Bleached Pulp. Tappi Press: 717-748.
- Aracri, E., Fillat, A. and Vidal, T., 2008. Modificación enzimática de pastas de lino y sisal con lacasas y mediadores naturales. V Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel, CIADICYP-2008, Guadalajara, México.
- Bajpai, P., 2004. Biological bleaching of chemical pulps. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24(1): 1-58.
- Bajpai, P., Anand, A., Bajpai, P.K. and El-Gewely, M.R., 2006. Bleaching with lignin-oxidizing enzymes. *Biotechnology Annual Review*, 12(1): 349-378.
- Barreca, A.M., Fabbrini, M., Galli, C., Gentili, P. and Ljunggren, S., 2003. Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26(1-2): 105-110.
- Barzyk, D., Page, D.H. and Ragauskas, A., 1997. Acidic group topochemistry and fibre-to-fibre specific bond strength. *Journal of Pulp and Paper Science*, 23(2): 59-61.
- Bayer, E.A., Lamed, R. and Himmel, M.E., 2007. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3): 237-245.
- Bergnor-Gidnert, E., Tomani, P.E. and Dahlman, O., 1998. Influence on pulp quality of conditions during the removal of hexenuronic acids. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 13(4): 310-316.

Bibliografia general.

- Bhardwaj, N.K., Bajpai, P. and Bajpai, P.K., 1996. Use of enzymes in modification of fibres for improved beatability. *Journal of Biotechnology*, 51(1): 21-26.
- Bhardwaj, N.K., Duong, T.D. and Nguyen, K.L., 2004. Pulp charge determination by different methods: effect of beating/refining. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 236(1-3): 39-44.
- Bhardwaj, N.K., Hoang, V. and Nguyen, K.L., 2007. A comparative study of the effect of refining on physical and electrokinetic properties of various cellulosic fibres. *Bioresource Technology*, 98(8): 1647-1654.
- Bhardwaj, N.K., Hoang, V., Dang, V. and Nguyen, K.L., 2006. Dissolution of ionisable groups and lignocellulosic components during low-temperature kraft pulping of *pinus radiata*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 290(1-3): 222-228.
- Bhardwaj, N.K., Kumar, S. and Bajpai, P.K., 2004. Effects of processing on zeta potential and cationic demand of kraft pulps. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 246(1-3): 121-125.
- Bhat, G.R., Hettmann, J. A., Joyce, T. W., 1991. Novel techniques for enhancing the strength of secondary fiber. *Tappi Journal*, 74(9): 151-157.
- Bhat, M.K. and Bhat, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15(3-4): 583-620.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5): 355-383.
- Blanco, A., Pujol, X., Vidal, T., Torres, A.L., Diaz, P., Pastor, F.I.J, 1998. New Cellulases from *Bacillus*. Applications in paper industry. *MIE Bioforum*: 144-146.
- Boisset, C., Petrequin, C., Chanzy, H., Henrissat, B. and Schulein, M., 2001. Optimized mixtures of recombinant *Humicola insolens* cellulases for the biodegradation of crystalline cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(3): 339-345.
- Bolam, D.N., Ciruela, A., Mason, S.M., Simpson, P., Williamson, M.P., Rixon, J.E., Boraston, A., Hazlewood, G.P. and Gilbert, H.J., 1998. *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochemical Journal*, 331(3): 775-781.
- Bolaski, W.A. and Gallatin, J.C., 1962. Enzymatic conversion of cellulosic fibers. U.S. pat. 3041246.
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J. and Davies, G.J., 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal*, 382(3): 769-781.
- Bourbonnais, R. and Paice, M.G., 1996. Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi Journal*, 79(6): 199-204.

- Browning, B.L., 1967. Methods of wood chemistry. John Wiley & Sons, New York, 800 pp.
- Buchert, J., Bergnor, E., Lindblad, G., Viikari, L. and Ek, M., 1997. Significance of xylan and glucomannan in the brightness reversion of kraft pulps. Tappi Journal, 80(6): 165-171.
- Buchert, J., Tenkanen, M., Viikari, L., Teleman, A., Harjunpaa, V. and Vuorinen, T., 1995. Effect of cooking and bleaching on the structure of xylan in conventional pine kraft pulp. Tappi Journal, 78(11): 125-130.
- Buschle-Diller, G. and Zeronian, S.H., 1994. Enzymatic and acid hydrolysis of cotton cellulose after slack and tension mercerization. Textile Chemist and Colorist, 26(4): 17-24.
- Cadena, E.M., Chiriach, I.A., Vidal, T., Pastor, F.I.J., Díaz, P. and Torres, A.L., 2007. Improving mechanical properties of chemical pulps by enzymatic modification. 10th International Congress on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, 10th ICBPPI-2007, Wisconsin - Estados Unidos.
- Cadena, E.M., Chiriach, I.A., Vidal, T., Pastor, F.I.J., Díaz, P. and Torres, A.L., 2008. Aplicación de celulasas y dominios de unión a celulosa recombinantes en el refinado de la pasta kraft TCF (*Eucalyptus globulus*). V Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel, CIADICYP-2008, Guadalajara, México.
- Cadena, E.M., Garcia, J., Vidal, T. and Torres, A.L., 2008. Determination of Zeta potential and cationic demand of bleached pulps. V Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel, CIADICYP-2008, Guadalajara, México.
- Cadena, E.M., Chiriach, I.A., Vidal, T., Pastor, F.I.J., Díaz, P. and Torres, A.L., 2006. Aplicación de Celulasa Cel9B en Refinado de Pasta de Eucalipto ECF. IV Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel, CIADICYP-2006, Santiago - Valdivia, Chile.
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., Del Rio, J.C., Gutierrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martinez, M.J. and Martinez, A.T., 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. Enzyme and Microbial Technology, 35(2-3): 113-120.
- Carrard, G., Koivula, A., Soderlund, H. and Beguin, P., 2000. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(19): 10342-10347.
- Casey, J.P., 1980. Pulp and Paper: Chemistry and Chemical Technology, vol 2. John Wiley & Sons, New York, 1446 pp.
- Colom, J.F., Torres, A.L. and García, J.A., 1984. Monografías de Materias Papeleras. Introducción histórica a la fabricación de papel y pastas. Publicaciones de la UPC. Universidad Politécnica de Cataluña, Terrassa.

- Costa, M.M. and Colodette, J.L., 2002. Efeito da composicao quimica da polpa kraft-O2 na sua branqueabilidade. *O Papel*, 63(8): 93-103.
- Costa, M.M. and Colodette, J.L., 2007. The impact of kappa number composition on eucalyptus kraft pulp bleachability. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 24(1): 61-71.
- Chai, X.S., Hou, Q.X. and Zhu, J.Y., 2003. Carboxyl Groups in Wood Fibers. 2. The Fate of Carboxyl Groups during Alkaline Delignification and Its Application for Fiber Yield Prediction in Alkaline Pulping. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 42(22): 5445-5449.
- Chai, X.S., Yoon, S.H., Zhu, J.Y. and Li, J., 2001. The fate of hexenuronic acid groups during alkaline pulping of loblolly pine. *Journal of Pulp and Paper Science*, 27(12): 407-411.
- Chai, X.S., Zhu, J.Y. and 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.
- Chakar, F.S. and Ragauskas, A.J., 2000. Effects of oxidative alkaline extraction stages after laccase HBT and laccase NHAA treatments-an NMR study of residual lignins. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 20(2): 169-184.
- Chakar, F.S., Ragauskas, A.J. and Nilvebrant, N.-O., 1998. Biobleaching of high lignin content kraft pulps via laccase-mediator systems. *Tappi Press*, 746: 1-10.
- Cherry, J.R. and Fidantsef, A.L., 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4): 438-443.
- Chirat, C. and De La Chapelle, V., 1999. Heat- and light-induced brightness reversion of bleached chemical pulps. *Journal of Pulp and Paper Science*, 25(6): 201-205.
- Daniel, A.I.D., Neto, C.P., Evtuguin, D.V. and Silvestre, A.J.D., 2003. Hexenuronic acid contents of *Eucalyptus globulus* kraft pulps: Variation with pulping conditions and effect on ECF bleachability. *Tappi Journal*, 2(5): 3-8.
- Davidson, G.F., 1948. The acidic properties of cotton cellulose and derived oxycelluloses. Part 2, The absorption of methylene blue. *Journal of the Textile Institute* 39: 65-86.
- Davies, G. and Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9): 853.
- de la Rosa, A., 2003. Utilización papelera de fibras no madereras (*kenaf* y *Miscanthus sinensis*). Estudio de secuencias de blanqueo ECF y TCF. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.

- del Rio, J.C., Gutierrez, A., Rodriguez, I.M., Ibarra, D. and Martinez, A.T., 2007. Composition of non-woody plant lignins and cinnamic acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 79(1-2): 39-46.
- Delmer, C. and Amor, Y., 1995. Cellulose Biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7): 987-1000.
- Devenyns, J. and Chauveheid, E., 1997. Uronic acids and metals control. *International Symposium on Wood and Pulping Chemistry. Proceedings ISWPC. Montreal, (1): 5-9 pp.*
- Diehm, R.A., 1942. Process of manufacturing paper. U.S. pat. 2280307.
- Dienes, D., Egyhazi, A. and Reczey, K., 2004. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. *Industrial Crops and Products*, 20 (1): 11 - 21.
- Dienes, D., Kemeny, S., Egyhazi, A. and Reczey, K., 2005. Improving the capability of the Schopper-Riegler freeness measurement. *Measurement*, 38(3): 194-203.
- Duarte, A.P., Martins, S., Abrantes, C., Ismael, M.I., Simões, R. and Figueiredo, J.A., 2006. Improvement of bleached kraft pulp properties by cellulose oxidation. *O Papel*, 67(10): 76-82.
- Eiras, K.M.M. and Colodette, J.L., 2003. Eucalyptus kraft pulp bleaching with chlorine dioxide at high temperature. *Journal of Pulp and Paper Science*, 29(2): 64-69.
- Eiras, K.M.M. and Colodette, J.L., 2005. Investigation of eucalyptus kraft pulp brightness stability. *Journal of Pulp and Paper Science*, 31(1): 13-18.
- Elsander, A., Ek, M. and Gellerstedt, G., 2000. Oxalic acid formation during ECF and TCF bleaching of kraft pulp. *Tappi Journal*, 83(2): 73-77.
- Fardim, P. and Duran, N., 2003. Modification of fibre surfaces during pulping and refining as analysed by SEM, XPS and ToF-SIMS. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 223(1-3): 263-276.
- Fardim, P. and Holmbom, B., 2005. Origin and surface distribution of anionic groups in different papermaking fibres. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 252(2-3): 237-242.
- Fardim, P., Holmbom, B., Ivaska, A., Karhu, J., Mortha, G. and Laine, J., 2002. Critical comparison and validation of methods for determination of anionic groups in pulp fibres. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 17(3): 346-351.
- Fengel, D. and Wegener, G., 1984. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter Inc., United States, 613 pp.
- Ferreira, P.J., Matos, S. and Figueiredo, M.M., 1999. Size characterization of fibres and fines in hardwood kraft pulps. *Particle and Particle Systems Characterization*, 16(1): 20-24.

- Fierobe, H.P., Bayer, E.A., Tardif, C., Czjzek, M., Mechaly, A., Belaich, A., Lamed, R., Shoham, Y. and Belaich, J.P., 2002. Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras: Substrate targeting versus proximity of enzyme components. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51): 49621-49630.
- Fillat, U., 2008. Aplicación de biotecnología para la obtención de pastas de alta calidad. Estudio de sistemas enzimáticos en secuencias de blanqueo respetuosas con el medio ambiente. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.
- Forsskahl, I., Tylli, H. and Olkkonen, C., 2000. Participation of carbohydrate-derived chromophores in the yellowing of high-yield and TCF pulps. *Journal of Pulp and Paper Science*, 26(7): 245-249.
- Freundenreich, J., Amann, M., Fritz-Langhals, E. and Stohrer, J., 1998. Understanding the Lignozym®-Process, International Pulp Bleaching Conference. *Nordic Pulp and Paper Research*, 1: 71-76.
- Fuhrmann, A., Li, X.-L., Rautonen, R., Toikkanen, L., Hausalo, T. and Sagfors, P.-E., 1996. Influence of TCF and ECF bleaching chemicals on softwood kraft pulp components. *Paperi ja Puu/Paper and Timber*, 78(4): 172-179.
- García Hortal, J.A., 2007. *Fibras Papeleras*. Edicions UPC, Barcelona, 243 pp.
- García, O., 2003. Utilización de fibras de lino en la fabricación de papel. Nuevas secuencias de blanqueo y aplicación de sistemas enzimáticos. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.
- García, O., Camarero, S., Colom, J.F., Martínez, A.T., Martínez, M.J., Monje, R. and Vidal, T., 2003. Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung*, 57(5): 513-519.
- García, O., Torres, A.L., Colom, J.F., Pastor, F.I.J., Díaz, P. and Vidal, T., 2002. Effect of cellulase-assisted refining on the properties of dried and never-dried eucalyptus pulp. *Cellulose*, 9(2): 115-125.
- Garg, M. and Singh, S.P., 2006. Reasons of strength loss in recycled pulp. *Appita Journal*, 59(4): 274-279.
- Gellerstedt, F., Wagberg, L. and Gatenholm, P., 2000. Swelling behaviour of succinylated fibers. *Cellulose*, 7(1): 67-86.
- Gellerstedt, G. and Li, J., 1996. An HPLC method for the quantitative determination of hexeneuronic acid groups in chemical pulps. *Carbohydrate Research*, 294(1): 41-51.
- Granstrom, A., Eriksson, T., Gellerstedt, G., Roost, C. and Larsson, P., 2001. Variables affecting the thermal yellowing of TCF-bleached birch kraft pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 16(1): 18-23.

- Granstrom, A., Gellerstedt, G. and Eriksson, T., 2002. On the chemical processes occurring during thermal yellowing of a TCF-bleached birch kraft pulp. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 17(4): 427-433.
- Helmer, R.J.N., Covey, G.H., Raverty, W.D., Vanderhoek, N., Sardjono, A.A. and Chau, T., 2006. Laboratory simulation of the effects of refining on paper formation. *Appita Journal*, 59(4): 291-296.
- Henrissat, B., 1994. Cellulases and their interaction with cellulose. *Cellulose*, 1(3): 169-196.
- Herpoel, I., Jeller, H., Fang, G., Petit-Conil, M., Bourbonnais, R., Robert, J.L., Asther, M. and Sigoillot, J.C., 2002. Efficient enzymatic delignification of wheat straw pulp by a sequential xylanase-laccase mediator treatment. *Journal of Pulp and Paper Science*, 28(3): 67-71.
- Hibberd, A.I., Wearne, R.H. and Wallis, A.F.A., 1999. Effect of variation in the aromatic units of lignin in plantation eucalypt woods on pulping quality. *Appita Annual General Conference*, 2: 781-785.
- Hietanen, S. and Ebeling, K., 1990. Fundamental aspects of the refining process. *Paperi ja Puu/Paper and Timber*, 72(2): 158-170.
- Higgins, H.G. and de Yong, J., 1962. The beating process: Primary effects and their influence on pulp and paper properties. The formation and structure of paper. *Technical Section, British Paper and Board Makers' Association*, 2: 651-697.
- Hubbe, M.A., Rojas, O.J., Lucia, L.A. and Jung, T.M., 2007. Consequences of the nanoporosity of cellulosic fibers on their streaming potential and their interactions with cationic polyelectrolytes. *Cellulose*, 14(6): 655-671.
- Ibarra, D., Chavez, M.I., Rencoret, J., Del Rio, J.C., Gutierrez, A., Romero, J., Camarero, S., Martinez, M.J., Jimenez-Barbero, J. and Martinez, A.T., 2007. Structural modification of eucalypt pulp lignin in a totally chlorine-free bleaching sequence including a laccase-mediator stage. *Holzforschung*, 61(6): 634-646.
- Ibarra, D., Romero, J., Martinez, M.J., Martinez, A.T. and Camarero, S., 2006. Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalypt pulp by laccase-mediator. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(6): 1319-1327.
- Inglesby, M. and Zeronian, S., 1996. The accessibility of cellulose as determined by dye adsorption. *Cellulose*, 3(1): 165-181.
- Irwin, D., Shin, D.H., Zhang, S., Barr, B.K., Sakon, J., Karplus, P.A. and Wilson, D.B., 1998. Roles of the catalytic domain and two cellulose binding domains of *Thermomonospora fusca* E4 in cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, 180(7): 1709-1714.
- Isogai, A., Kitaoka, C. and Onabe, F., 1997. Effects of carboxyl groups in pulp on retention of alkylketene dimer. *Journal of Pulp and Paper Science*, 23(5): 215-219.

- Jackson, L.S., Heitmann, J.A. and Joyce, T.W., 1993. Enzymatic Modifications Of Secondary Fiber. *Tappi Journal*, 76(3): 147-154.
- Jain, R.K., Mathur, R.M. and Kulkarni, A.G., 2001. Enzymatic deinking of recycled paper - An overview. *IPPTA: Quarterly Journal of Indian Pulp and Paper Technical Association*, 13(3): 21-40.
- Jeffries, T.W., 2008. Introduction of a special issue on biotechnology for the pulp and paper industry. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2): 77-232.
- Jiang, Z.H., Audet, A., Sullivan, J., van Lierop, B. and Berry, R., 2001. A new method for quantifying hexenuronic acid groups in chemical pulps. *Journal of Pulp and Paper Science*, 27(3): 92-97.
- Kamaya, Y., 1996. Role of endoglucanase in enzymatic modification of bleached kraft pulp. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(6): 549-553.
- Kataeva, I.A., Seidel Iii, R.D., Shah, A., West, L.T., Li, X.L. and Ljungdahl, L.G., 2002. The fibronectin type 3-like repeat from the *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase CbHa promotes hydrolysis of cellulose by modifying its surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9): 4292-4300.
- Kawae, A. and Uchida, Y., 2005. Heat and moisture-induced yellowing of ECF-light bleached hardwood kraft pulp. *Appita Journal*, 58(5): 378-381.
- Kerekes, R.J. and Schell, C.J., 1995. Effects of fiber length and coarseness on pulp flocculation. *Tappi Journal*, 78(2): 133-139.
- Kerekes, R.J., 2005. Characterizing refining action in PFI mills. *Tappi Journal*, 4 (3): 9 - 14.
- Kim, H.J., Jo, B.M. and Lee, S.H., 2006. Potential for energy saving in refining of cellulase-treated kraft pulp. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 12(4): 578-583.
- Kirk, O., Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C., 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4): 345-351.
- Kirk, T.K. and Cullen, D., 1998. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry* (eds Young, R. A. and Akhtar, M.), John Wiley & Sons, Inc, New York. Tappi Press, Atlanta, 279-308 pp.
- Kirk, T.K. and Farrel, R.L., 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 465-505.
- Kleen, M., Ohra-Aho, T. and Tamminen, T., 2003. On the interaction of HBT with pulp lignin during mediated laccase delignification - a study using fractionated pyrolysis-GC/MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 70(2): 589-600.
- Konn, J., Pranovich, A., Fardim, P. and Holmbom, B., 2007. Characterisation and effects of new anionic groups formed during chemithermomechanical pulping of

- spruce. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 296(1-3): 1-7.
- Korpela, A., 2002. Improving the strength of PGW pine pulp by alkaline peroxide treatment. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 17(2): 183-186.
- Kuligowski, C., Brochier, B., Petit-Conil, M. and Housen, 2006. Development and optimization of biotechnology use in the manufacture of bleached chemical pulps. Tappi Press, 2006: 16-20.
- Kumar, S., Rao, N.J. and Mathur, S., 2001. Application of commercial xylanases in bleaching - A review. *IPPTA: Quarterly Journal of Indian Pulp and Paper Technical Association*, 13(1): 13-24.
- Lachenal, D. and Chirat, C., 2000. High temperature chlorine dioxide bleaching of hardwood kraft pulp. *Tappi Journal*, 83(8): 96-102.
- Lachenal, D. and Muguet, M., 1992. Degradation of Residual Lignin in Kraft Pulp with Ozone: Application to Bleaching. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 7(1): 25-29.
- Laine, J. and Stenius, P., 1997. Effect of charge on the fibre and paper properties of bleached industrial kraft pulps. *Paperi ja Puu/Paper and Timber*, 79(4): 257-266.
- Leatham, G.F., Myers, G.C. and Wegner, T.H., 1990. Biomechanical pulping of aspen chips - Energy savings resulting from different fungal treatments. *Tappi Journal*, 73(5): 197-200.
- Lemos, M.A., Teixeira, J.A., Domingues, M.R.M., Mota, M. and Gama, F.M., 2003. The enhancement of the cellulolytic activity of cellobiohydrolase I and endoglucanase by the addition of cellulose binding domains derived from *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1): 35-40.
- Lenz, J., Schurz, J. and Wrentschur, E., 1993. Properties and structure of solvent-spun and viscose-type fibres in the swollen state. *Colloid and Polymer Science*, 271(5): 460-468.
- Lewin, M. and Epstein, J.A., 1962. Functional groups and degradation of cotton oxidized by hypochlorite. *Journal of Polymer Science*, 58(166): 1023-1037.
- Li, J. and Gellerstedt, G., 1997. The contribution to kappa number from hexeneuronic acid groups in pulp xylan. *Carbohydrate Research*, 302: 213-218.
- Li, J. and Gellerstedt, G., 1998. On the structural significance of the kappa number measurement. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 13(2): 153-158.
- Li, J. and Gellerstedt, G., 2002. Oxymercuration-demercuration kappa number: An accurate estimation. of the lignin content in chemical pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 17(4): 410-414.

- Li, J., Sevastyanova, O. and Gellerstedt, G., 2002. The distribution of oxidizable structures in ECF-and TCF-bleached kraft pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 17(4): 415-419.
- Lindholm, C.-A., 1990. Effect of pulp consistency and pH in ozone bleaching, Part 6. Strength properties. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 5(1): 22-27.
- Lindstrom, T., 1992. Chemical factors affecting the behaviour of fibres during papermaking. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 7(4): 181-192.
- Lumiainen, J., 2000. Papermaking Part 1, Stock Preparation and Wet: Refining of chemical pulp. Paulapuro, H. Papermaking Science and Technology. Helsinki: FAPET & TAPPI, Book 8 - Vol 2.
- Lund, M. and Felby, C., 2001. Wet strength improvement of unbleached kraft pulp through laccase catalyzed oxidation. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(9-10): 760-765.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Willem, H.Z. and Pretorius, I.S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*: MMBR, 63(3): 506-577.
- Mansfield, S.D. and Meder, R., 2003. Cellulose hydrolysis - The role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. *Cellulose*, 10(2): 159-169.
- Mansfield, S.D. and Saddler, J.N., 1999. Sheet properties of Douglas-fir kraft pulp after selective treatments of different fibre length fractions with cellulases. *Journal of Pulp and Paper Science*, 25(3): 84-89.
- Mansfield, S.D., 2002. Laccase impregnation during mechanical pulp processing - Improved refining efficiency and sheet strength. *Appita Journal*, 55(1): 49-53.
- Mansfield, S.D., De Jong, E., Stephens, R.S. and Saddler, J.N., 1997. Physical characterization of enzymatically modified kraft pulp fibers. *Journal of Biotechnology*, 57(1-3): 205-216.
- Mansfield, S.D., Mooney, C. and Saddler, J.N., 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress*, 15 (5): 804 - 816.
- McCarter, J.D. and Withers, S.G., 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 4(6): 885-892.
- Milichovsky, M. and Adamkova, G., 1996. Kinetic evaluation of the hydration processes during pulp beating and refining. *Cellulose Chemistry and Technology*, 30(1-2): 151-160.
- Mohlin, U.B. and Miller, J., 1995. Industrial refining - effects of refining conditions on fibre properties. *Proc. 3rd International Refining Conference, Atlanta*. (4): 1-13 pp.

- Mohlin, U.B. and Pettersson, B., 2002. Improved papermaking by cellulase treatment before refining. *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: 8th ICBPPI*, 21, 291-299 pp.
- Mohlin, U.B., 1997. Fibre development during mechanical pulp refining. *Journal of Pulp and Paper Science*, 23(1): 28-33.
- Mokfienski, A. and Demuner, B.J., 1994. Pilot plant experience with ozone in TCF bleaching of eucalypt pulp. *Tappi Journal*, 77(11): 95-103.
- Moldes, D. and Sanromán, M.Á., 2006. Amelioration of the ability to decolorize dyes by laccase: relationship between redox mediators and laccase isoenzymes in *Trametes versicolor*. *Journal World of Microbiology and Biotechnology*, 22(11): 1197-1204.
- Moldes, D. and Vidal, T., 2008. Laccase-HBT bleaching of eucalyptus kraft pulp: Influence of the operating conditions. *Bioresource Technology*, 99(18): 8565-8570.
- Moldes, D., Diaz, M., Tzanov, T. and Vidal, T., 2008. Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Bioresource Technology*, 99(17): 7959-7965.
- Molin, U. and Teder, A., 2002. Importance of cellulose/hemicellulose-ratio for pulp strength. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 17(1): 14-19.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V. and Yaroplov, Y.I., 2007. Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry And Microbiology*, 43: 523-535.
- Nanko, H., Ohsawa, J. and Okagawa, A., 1989. How to see interfibre bonding in paper sheets. *Journal of Pulp and Paper Science*, 15(1): 17-23.
- Nelson, P.J., Chin, C.W.J., Viikari, L. and Tenkanen, M., 1998. Use of a laccase mediator stage in bleaching eucalypt kraft pulps. *Appita Journal*, 51(6): 451-455.
- Nidetzky, B., Steiner, W. and Claeysens, M., 1995. Synergistic interaction of cellulases from *Trichoderma reesei* during cellulose degradation. *American Chemical Society (ACS), Washington*, 90-112 pp.
- Odermatt, J., Rippin, H.J., Kordsachia, O., Patt, R. and Wang, D.K.L., 1998. Application of NaBH₄ to improve the properties of ozonated softwood kraft pulp. *Cellulose Chemistry and Technology*, 32(3-4): 309-235.
- Oksanen, T., Amann, M., Candussio, A., Buchert, J. and Viikari, L., 1997. Role of Xylanase in Laccase-Mediator Delignification of Kraft Pulps. *Canadian Pulp and Paper Association, Montreal*, 83-84 pp.
- Oksanen, T., Pere, J., Buchert, J. and Viikari, L., 1997. The effect of *Trichoderma reesei* cellulases and hemicellulases on the paper technical properties of never-dried bleached kraft pulp. *Cellulose*, 4(4): 329-339.

- Oksanen, T., Pere, J., Paavilainen, L., Buchert, J. and Viikari, L., 2000. Treatment of recycled kraft pulps with *Trichoderma reesei* hemicellulases and cellulases. *Journal of Biotechnology*, 78(1): 39-48.
- Öztürk, H., Potthast, A., Rosenau, T., Abu-Rous, M., MacNaughtan, B., Schuster, K., Mitchell, J. and Bechtold, T., 2008. Changes in the intra- and inter-fibrillar structure of lyocell (TENCEL®) fibers caused by NaOH treatment. *Cellulose*, doi: 10.1007/s10570-008-9249-x.
- Page, D.H., 1989. The beating of chemical pulps. The action and the effects. 9th Fundamental Research Symposium Fundamentals of Papermaking. Cambridge, 1-38 pp.
- Pages, S., Gal, L., Belaich, A., Gaudin, C., Tardif, C. and Belaich, J.P., 1997. Role of scaffolding protein CipC of *Clostridium cellulolyticum* in cellulose degradation. *Journal of Bacteriology*, 179(9): 2810-2816.
- Pala, H., Mota, M. and Gama, F.M., 2002. Enzymatic modification of paper fibres. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20 (5): 353-361.
- Pala, H., Pinto, R., Mota, M., Duarte, A.P. and Gama, F.M., 2001. Enzymatic upgrade of old paperboard containers. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(4-5): 274-279.
- Palonen, H. and Viikari, L., 2004. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(5): 550-557.
- Pastor, F.I.J., Pujol, X., Blanco, A., Vidal, T., Torres, A.L. and Diaz, P., 2001. Molecular Cloning and Characterization of a Multidomain Endoglucanase from *Paenibacillus* SP BP-23: Evaluation of its Performance in Pulp Refining. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55 (1): 61-68.
- Percival Zhang, Y.H., Himmel, M.E. and Mielenz, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24(5): 452-481.
- Pere, J., Liukkonen, S., Siika-Aho, M., Gullichsen, J. and Viikari, L., 1996. Use of Purified Enzymes in Mechanical Pulping. *Pulping Conference: Proceedings (Tappi)*: 693-696.
- Pere, J., Siikaaho, M., Buchert, J. and Viikari, L., 1995. Effects of purified *Trichoderma* cellulases on the fiber properties of kraft pulp. *Tappi Journal*, 78(6): 71-78.
- Pinto, R., Amaral, E., Costa, A.P., Gama, M. and Duarte, A.P., 2004. Improving papermaking with cellulose-binding domains. III Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel, CIADICYP-2004, Córdoba, España.
- Pommier, J.-C., Fuentes, J.-L. and Goma, G., 1989. Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry. Part 1. The basic laboratory work. *Tappi Journal*, 72(6): 187-191.

- Poppius-Levlin, K., Wang, M., Tamminen, T., Hortling, B., Viikari, L. and Niku-Paavola, M.L., 1999. Effects of laccase/HBT treatment on pulp and lignin structures. *Journal of Pulp and Paper Science*, 25(3): 90-94.
- Pulkkinen, I., Ala-Kaila, K. and Aittamaa, J., 2006. Characterization of wood fibers using fiber property distributions. *Chemical Engineering and Processing*, 45(7): 546-554.
- Rabinovich, M.L., Melnick, M.S. and Bolobova, A.V., 2002. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry*, 67(8): 850-871.
- Ragauskas, A.J., 1994. Brightness Reversion of Mechanical Pulps, 2: Thermal Aging of Ascorbic Acid-Impregnated Lignin-Retaining Pulps. *Cellulose Chemistry and Technology*, 28(3): 265-272.
- Ragnar, M., Dahllof, H. and Lundgren, S., 2004. Towards an environmentally sustainable bleaching of kraft pulp exploring alternative ECF and TCF bleaching sequences. 58th Appita Annual Conference, 2: 477-485.
- Rahkamo, L., Siika-Aho, M., Vehviläinen, M., Dolk, M., Viikari, L., Nousiainen, P. and Buchert, J., 1996. Modification of hardwood dissolving pulp with purified *Trichoderma reesei* cellulases. *Cellulose*, 3(1): 153-163.
- Rautonen, R., Rantanen, T., Toikkanen, L. and Malinen, R., 1996. TCF bleaching to high brightness - bleaching sequences and pulp properties. *Journal of Pulp and Paper Science*, 22(8): 306-314.
- Reinstaller, A., 2008. The technological transition to chlorine free pulp bleaching technologies: lessons for transition policies. *Journal of Cleaner Production*, 16(1): 133-137.
- Retulainen, E. and Nieminen, K., 1996. Fibre properties as control variables in papermaking? Part 2. Strengthening interfibre bonds and reducing grammage. *Paperi ja Puu/Paper and Timber*, 78(5): 305-312.
- Retulainen, E., 1996. Fibre properties as control variables in papermaking? Part 1. Fibre properties of key importance in the network. *Paperi ja Puu/Paper and Timber*, 78(4): 187-194.
- Rodriguez Couto, S. and Toca Herrera, J.L., 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5): 500-513.
- Roncero, M.B. and Vidal, T., 2007. Optimización del tratamiento con ozono en el blanqueo TCF de pastas para papel. *Afinidad*, 64(529): 420-428.
- 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. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.

- Roncero, M.B., Colom, J.F. and Vidal, T., 2003. Cellulose protection during ozone treatments of oxygen delignified Eucalyptus kraft pulp. *Carbohydrate Polymers*, 51(3): 243-254.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. and Vidal, T., 2003. TCF bleaching of wheat straw pulp using ozone and xylanase. Part A: paper quality assessment. *Bioresource Technology*, 87(3): 305-314.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. and Vidal, T., 2003. Effect of xylanase on ozone bleaching kinetics and properties of Eucalyptus kraft pulp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(10): 1023-1031.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. and Vidal, T., 2005. The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps. *Bioresource Technology*, 96(1): 21-30.
- Sánchez, M.M., Irwin, D.C., Pastor, F.I.J., Wilson, D.B. and Diaz, P., 2004. Synergistic Activity of *Paenibacillus* sp. BP-23 cellobiohydrolase Cel48C in association with the contiguous endoglucanase Cel9B and with endo- or exo-acting glucanases from *Thermobifida fusca*. *Biotechnology and Bioengineering*, 87 (2): 161 - 169.
- Savitha, S., Sadhasivam, S. and Swaminathan, K., 2009. Modification of paper properties by the pretreatment of wastepaper pulp with *Graphium putredinis*, *Trichoderma harzianum* and fusant xylanases. *Bioresource Technology*, 100(2): 883-889.
- Seth, R.S., 1999. Beating and refining response of some reinforcement pulps. *Tappi Journal*, 82(3): 147-155.
- Sevastyanova, O., Li, J. and Geilerstedt, G., 2006. On the reaction mechanism of the thermal yellowing of bleached chemical pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 21(2): 188-192.
- Sevastyanova, O., Li, J. and Gellerstedt, G., 2006. Influence of various oxidizable structures on the brightness stability of fully bleached chemical pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 21(1): 49-53.
- Shleev, S., Persson, P., Shumakovich, G., Mazhugo, Y., Yaropolov, A., Ruzgas, T. and Gorton, L., 2006. Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4): 841-847.
- Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Perez-Boada, M., Martinez, M.J., Sigoillot, J.-C., Asther, M., Colom, J.F. and Martinez, A.T., 2005. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal of Biotechnology*, 115(4): 333-343.
- Simao, J.P.F., Egas, A.P.V., Baptista, C.M.S.G., Carvalho, M.G. and Castro, J.A.A.M., 2005. Evolution of Methylglucuronic and Hexenuronic Acid Contents of *Eucalyptus globulus* Pulp during Kraft Delignification. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44(9): 2990-2996.

- Smit, D., 1993. Brightness reversion. Paper Southern Africa, 8(1): 34-39.
- Smook, G.A., 2002. Handbook for Pulp & Paper Technologists. Angus Wilde Publications, Vancouver, 425 pp.
- Stoere, P., Nazhad, M.M. and Kerekes, R.J., 2001. An Experimental Study of the Effect of Refining on Paper Formation. Tappi Journal, 84(7): 1-9.
- Stone, J.E., Scallan, A.M. and Abrahamson, B., 1968. Influence of Beating on Cell Wall Swelling and Internal Fibrillation. Svensk Papperstidning, 71(19): 687-694.
- Stork, G., Pereira, H., Wood, T. M., Dusterhoft, E. M., Toft, A., Puls, J., 1995. Upgrading Recycled Pulps Using Enzymatic Treatment. Tappi Journal, 78(2): 79-88.
- Suurnakki, A., Mustranta, A., Siika-Aho, M., Holmbom, B., Viikari, L. and Buchert, J., 2001. Biotechnical approaches for pitch removal. Papiripar, 45(2): 51-55.
- Suurnakki, A., Oksanen, T., Kettunen, H. and Buchert, J., 2003. The effect of mannan on physical properties of ECF bleached softwood kraft fibre handsheets. Nordic Pulp and Paper Research Journal, 18(4): 429-435.
- Suurnakki, A., Tenkanen, M., Siika-Aho, M., Niku-Paavola, M.L., Viikari, L. and Buchert, J., 2000. *Trichoderma reesei* cellulases and their core domains in the hydrolysis and modification of chemical pulp. Cellulose, 7(2): 189-209.
- Teeri, T.T., 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. Trends in Biotechnology, 15(5): 160-167.
- Teleman, A., Hausalo, T., Tenkanen, M. and Vuorinen, T., 1996. Identification of the acidic degradation products of hexenuronic acid and characterisation of hexenuronic acid-substituted xylooligosaccharides by NMR spectroscopy. Carbohydrate Research, 280(2): 197-208.
- Tenkanen, M., Gellerstedt, G., Vuorinen, T., Teleman, A., Perttula, M., Li, J. and Buchert, J., 1999. Determination of hexenuronic acid in softwood kraft pulps by three different methods. Journal of Pulp and Paper Science, 25(9): 306-311.
- Tomme, P., Warren, R.A. and Gilkes, N.R., 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. Advances in Microbial Physiology, 37(1): 1-81.
- Torres López, A.L., 1988. Últimos avances en la tecnología del refinado. Introducción al refinado: Aspectos generales. Tecnología Papelera E.T.S.E.I.A.T. Universidad Politécnica de Cataluña, Terrassa.
- Torres, A.L., Roncero, M.B., Colom, J.F., Martinez, J.A. and Vidal, T., 2004. Application of an experimental design to modeling of ozone bleaching stage in TCF processes. Ozone: Science and Engineering, 26(5): 443-451.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itävaara, M., 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. Bioresource Technology, 72(2): 169-183.

- Valchev, I., Valchev, V. and Ganev, I., 1999. Improved elemental chlorine-free bleaching of hardwood kraft pulp. *Cellulose Chemistry and Technology*, 33(1): 61-66.
- Valls, C. and Roncero, M.B., 2008. Influence of different enzymatic bleaching stages on hexenuronic acids. First European workshop on biotechnology for lignocellulose biorefineries - Cost, Copenhagen.
- Valls, C., 2008. Aplicació de nous sistemes enzimàtics pel blanqueig de pasta kraft d'eucaliptus. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Universidad Politécnica de Cataluña. Terrassa, España.
- Van Lierop, B., Berry, R.M. and Roy, B.R., 1997. High-brightness bleaching of softwood kraft pulps with oxygen, ozone and peroxide. *Journal of Pulp and Paper Science*, 23(9): 428-432.
- Vidal, T., Munoz, M. and Colom, J.F., 1998. Xylanase bleaching of Eucalyptus kraft pulp - an economical TCF process. *Proceedings of the International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, 3: 11-14.
- Vuorinen, T., Fagerstrom, P., Buchert, J., Tenkanen, M. and Teleman, A., 1999. Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps. *Journal of Pulp and Paper Science*, 25(5): 155-162.
- Vuorinen, T., Fagerstrom, P., Buchert, J., Tenkanen, M. and Teleman, A., 1999. Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps. *Journal of Pulp and Paper Science*, 25(5): 155-162.
- Wagberg, L., 2000. Polyelectrolyte adsorption onto cellulose fibres - A review. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 15(5): 586-597.
- Walker, L.P. and Wilson, D.B., 1991. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. *Bioresource Technology*, 36(1): 3-14.
- Wang, X., Maloney, T.C. and Paulapuro, H., 2003. Internal fibrillation in never-dried and once-dried chemical pulps. *Appita Journal*, 56(6): 455-459.
- Wang, X., Maloney, T.C. and Paulapuro, H., 2006. Improving the properties of never-dried chemical pulp by pressing before refining. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 21(1): 135-139.
- Wang, X., Maloney, T.C. and Paulapuro, H., 2007. Fibre fibrillation and its impact on sheet properties. *Paperi ja Puu/Paper and Timber*, 89(3): 148-151.
- Weise, U., 1998. Hornification - mechanisms and terminology. *Paperi ja Puu/Paper and Timber*, 80(2): 110-115.
- Widsten, P. and Kandelbauer, A., 2008. Laccase applications in the forest products industry: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(4): 293-307.

- Widsten, P., Laine, J.E. and Tuominen, S., 2002. Radical formation on laccase treatment of wood defibrated at high temperatures. Part 1. Studies with hardwood fibers. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 17(2): 139-146.
- Wong, K.K.Y. and Mansfield, S.D., 1999. Enzymatic processing for pulp and paper manufacture: a review. *Appita Journal*, 52(6): 409-418.
- Wong, K.K.Y., Anderson, K.B. and Kibblewhite, R.P., 1999. Effects of the laccase-mediator system on the handsheet properties of two high kappa kraft pulps. *Enzyme And Microbial Technology*, 25(1-2): 125-131.
- Wong, K.K.Y., Richardson, J.D. and Mansfield, S.D., 2000. Enzymatic treatment of mechanical pulp fibers for improving papermaking properties. *Biotechnology Progress*, 16(6): 1025-1029.
- Yadav, S.K., Singh, N., Prasad, K.D. and Arora, S.S., 2006. Chlorine dioxide substitution during bleaching of pulp - An attempt towards AOX reduction in effluent. *IPPTA: Quarterly Journal of Indian Pulp and Paper Technical Association*, 18(SPEC ISS): 111-117.
- Yerkes, W.D., 1968. Process for the digestion of cellulosic material by enzymatic action of *Trametes suaveolens*. U.S. pat. 3406089.
- You, J., Meng, J., Chen, X. and Ye, H., 2008. Study on direct delignification with laccase/xylanase system. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 28(3): 227-239.
- Zhang, Y., Sjogren, B., Engstrand, P. and Htun, M., 1994. Determination of charged groups in mechanical pulp fibres and their influence on pulp properties. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 14(1): 83-102.
- Zhao, H., Kwak, J.H., Conrad, Z.Z., Brown, H.M., Arey, B.W. and Holladay, J.E., 2007. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 68(2): 235-241.
- Zhou, G., Li, J., Chen, Y., Zhao, B., Cao, Y., Duan, X. and Cao, Y., 2009. Determination of reactive oxygen species generated in laccase catalyzed oxidation of wood fibers from Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) by electron spin resonance spectrometry. *Bioresource Technology*, 100(1): 505-508.
- Zverlov, V.V., Velikodvorskaya, G.A. and Schwartz, W.H., 2003. Two new cellulosome components encoded downstream of cell in the genome of *Clostridium thermocellum*: the non-processive endoglucanase CelN and the possibly structural protein CseP. *Microbiology*, 149(2): 515-524.

Normativa

- ISO-16065:2001 Pulps - Determination of fibre length by automated optical analysis. Part 1: Polarized light method.
- ISO-187:1990 Paper, board and pulps - Standard atmosphere for conditioning and testing and procedure for monitoring the atmosphere and conditioning of samples.
- ISO-302:2004 Pulps - Determination of Kappa number.
- ISO-534:1995 Paper and board - Determination of thickness, density and specific volume.
- ISO-536:1995 Paper and board - Determination of grammage.
- ISO-1924:1994 Paper and board - Determination of tensile properties. Part 1: Constant rate of loading method.
- ISO-1974:1990 Paper - Determination of tearing resistance (Elmendorf method).
- ISO-2470:1999 Paper, board and pulps - Measurement of diffuse blue reflectance factor (ISO brightness).
- ISO-23714:2007 Pulps - Determination of water retention value (WRV).
- ISO-2758:2001 Paper - Determination of bursting strength.
- ISO-3688:1999 Pulps - Preparation of laboratory sheets for the measurement of diffuse blue reflectance factor (ISO brightness).
- ISO-5263:2004 Pulps - Laboratory wet disintegration. Part 1: Disintegration of chemical pulps.
- ISO-5264:2002 Pulps - Laboratory beating. Part 2: PFI mill method.
- ISO-5267:1999 Pulps - Determination of drainability. Part 1: Schopper-Riegler method.
- ISO-5269:2004 Pulps - Preparation of laboratory sheets for physical testing. Part 2: Rapid-Köthen method.
- ISO-5270:1998 Pulps - Laboratory sheets -Determination of physical properties.
- ISO-5630:1996 Paper and board - Accelerated ageing - Part 3: Moist heat treatment at 80 °C and 65 % relative humidity.
- ISO-5351:2004 Pulps - Determination of limiting viscosity number in cupri-ethylenediamine (CED) solution.
- ISO-5636:1992 Paper and board - Determination of air permeance (medium range). Part 3: Bendtsen method.

- ISO-5626:1993 Paper - Determination of folding endurance.
- ISO-9184:1990 Paper, board and pulps - Fibre furnish analysis. Part 3: Herzberg staining test.
- Tappi-271, cm-02 Fiber length of pulp and paper by automated optical analyzer using polarized light.
- Tappi-322, cm-01 Fiber length of pulp by projection.
- Merkblatt-IV/33/57, Bestimmung des Wasserückhaltevermögens von Zellstoffen.

ANEXO.

Acondicionamiento de las superficies de refinado

1 VERIFICACIÓN DEL “MOLINO PFI”

En el año 1992 los laboratorios de la Especialidad Papelera y Gráfica adquirieron un molino de refino PFI para realizar estudios de investigación en la modificación de fibras y elaboración de papel; el trabajo mecánico que realiza el molino sobre las fibras celulósicas se manifiesta en las propiedades físicas de las pastas refinadas y del papel, de ahí el interés de comprobar el efecto del refinado del Molino PFI, su revisión provee información si el equipo ha sufrido algún cambio desde el momento de su adquisición; se puede presentar un efecto de mayor refinado incrementando las propiedades fisicomecánicas del papel o por el contrario un efecto de menor refinado. La verificación depende de su uso y es cuestión de experiencia. No obstante, bajo condiciones normales el efecto de refinado deberá mantenerse por un largo periodo. Se recomienda guardar una o dos pastas bien almacenadas como pastas de referencia o patrón para la verificación y acondicionamiento del molino PFI.

Este estudio inicia con la confrontación de las propiedades fisicomecánicas entre los refinados de una pasta de referencia “*Eucalyptus Montañesa*” del año 1992 con los datos obtenidos en un nuevo refinado del año 2004. De esta confrontación se deduce que debe realizarse un acondicionamiento de las superficies de refinado y, posteriormente determinar la bondad de dicho acondicionamiento mediante un estudio comparativo con otros equipos (refinadores) y una nueva pasta de control (*Eucalyptus* ENCE Ref. Muestra 5807). El objetivo de este estudio es determinar si el estado final del molino PFI es correcto y, en su caso, poder proceder a futuras calibraciones del equipo.

1.1 Refinados años 1992 y 2004

La posible evolución de la operación de refinado se analiza con la confrontación de un historial [Contraste 1992] con un refinado actual [Ensayos 2004]. El historial del año

1992 corresponde al refinado de la pasta de referencia "*Eucalyptus Montañesa*" [Ref. Mg 5000] en el molino PFI a 5000 rev. y presión: 3.33 kN/mm, estas condiciones de operación se conservan para hacer una correcta comparación entre los resultados finales de la caracterización de la pasta y papeles obtenidos.

Los resultados más relevante del análisis comparativo entre el refinado del 2004 y 1992 (Tabla I) se refieren a la permeabilidad Bendtsen (variación del 71%) y al Shopper - Riegler (°SR). El papel elaborado con la pasta refinada 2004 tiene una mayor resistencia al paso del flujo de aire y paralelamente hay una disminución del volumen específico del papel, estos resultados sugieren un mayor efecto de refinado al incrementar sus propiedades de resistencia que pueden ser reflejo de una mayor fibrilación externa e interna, formación de finos y acortamiento de fibra, existe una mayor modificación de las fibras que a su vez se confirma con las propiedades de la pasta %IRA y °SR; a partir de estas conclusiones se toma la decisión de acondicionar el equipo siguiendo el método descrito en "Operating manual for the PFI – mill" del fabricante.

Tabla I. Propiedades fisicomecánicas de la pasta y papeles. [Ref. Mg 5000]

Refinados	Volumen cm ³ /g	Pb. Bendtsen μm/(Pa.s)	Log. Rotura m	I.Estallido kPa.m ² /g	% IRA	°SR
Contraste 1992	1,66	10,90	5766	4,00	141	39
Ensayos 2004	1,32	3,14	6067	3,79	150	54
%CV	15,9	78,1	3,6	3,8	4,3	23,3

1.2 Acondicionamiento del Molino PFI

Presumiblemente con el paso del tiempo las cuchillas del molino se encuentran más afiladas (°SR es demasiado alto); con el acondicionamiento se busca pulir o suavizar las superficies de las cuchillas para volver al estado inicial (refinado 1992). El método de "acondicionamiento de las superficies de refinado" se realiza (de acuerdo con el Operating manual for the PFI – mill) en el siguiente orden:

1. Girar el tornillo de ajuste hasta obtener un huelgo de aprox. 2 mm entre los elementos de refinado.
2. Fijar el número deseado de revoluciones del molón que puede variar en función del grado de aspereza del esmerilado. Un número apropiado puede ser 10000 revoluciones.

3. Cargar la carcasa del refinador con una mezcla de 30 g de pasta seca y 15 g de polvo carborundum referencia H237300240.
4. Seguir el procedimiento como en el caso de un refinado ordinario.
5. Limpiar muy cuidadosamente los elementos de refinado con jabón y agua.
6. Girar el tornillo de ajuste para que no actúe.
7. Eliminar los restos de polvo de carborundum refinando una pasta por un periodo correspondiente a 10000 revoluciones.
8. Hacer otro refinado para comprobar el nivel de °SR.
9. Repetir el proceso de acondicionamiento si el valor de °SR es demasiado alto. Si, por el contrario, el valor del °SR es demasiado bajo reestablecer el efecto de refinado.
10. Para verificar si las superficies de refinado están estabilizadas hacer dos refinados más correspondientes a 20000 revoluciones. Verificar el valor del °SR.

Del procedimiento, se omite el paso 9, prefiriéndose realizar las pruebas necesarias de verificación y comparación antes de volver a modificar las superficies.

(La metodología de acondicionamiento es compleja por ser un método de error y ensayo: si el valor del °SR es demasiado bajo se debe seguir el procedimiento de Reestablecer el efecto de refinado con aceite y polvo; si, por el contrario el valor de °SR es demasiado alto se debe volver al acondicionamiento de las superficies).

1.3 Pruebas de Verificación

Las pruebas de verificación dan información del estado del molino PFI tras realizar su acondicionamiento, según el procedimiento descrito en el apartado anterior; inicialmente se realizan varios refinados a 5000 rev. hasta garantizar la estabilización del equipo. En estas pruebas de verificación fue necesario realizar ocho refinados, de los cuales se descartan los refinados iniciales debido a las fluctuaciones detectadas en los análisis físicos de la pasta (°SR, %IRA) -es un comportamiento coherente tras realizar el acondicionamiento de las superficies-, con las pruebas iniciales de verificación se eliminan posibles restos de “polvo carborundum” y al mismo tiempo se obtiene la estabilización del equipo.

Los refinados de las verificaciones “ensayos 6 - 7 y 8” indican estabilización en el equipo, y los datos promedios de caracterización de la pasta y papeles obtenidos se toman como referencia para hacer el respectivo análisis del acondicionamiento de las

superficies del molino PFI comparando el estado actual [verificación 2005] con los resultados anteriores a la calibración del molino [ensayos 2004 y contraste 1992 (historial)]. Las propiedades físicas de los papeles elaborados con la pasta refinada después de acondicionar las superficies del molino, indican una aproximación a la caracterización fisicomecánica del contraste 1992, los valores de permeabilidad y la resistencia al desgote -°SR- así lo indican, aunque no se llega a los valores correspondientes del momento de adquisición del equipo (Tabla II). Los resultados del °SR muestran una variación aceptable (del 5%), por lo cual no sería necesario recurrir a reestablecer el efecto de refinado (afilado de cuchillas) con aceite y polvo; sin embargo las propiedades físicas como permeabilidad Bendtsen y longitud de rotura hacen necesaria la continuación del estudio con nuevos ensayos y comparaciones para determinar si se requiere una nueva modificación del equipo.

Tabla II. Respuesta del refinado tras acondicionamiento de superficies. [Ref. Mg 5000]

Refinados	Densidad g/cm ³	Volumen cm ³ /g	Pb. Bendtsen μm/(Pa.s)	Log. Rotura m	I. Estallido kPa.m ² /g	% IRA	°SR
Contraste 1992	0,60	1,66	10,90	5766	*3,35	141	39
Ensayos 2004	0,76	1,32	3,14	6067	3,79	150	54
Verificación 2005	0,66	1,52	15,30	5181	3,19	132	37

1.4 Verificación del molino con pasta patrón ECF “Interlaboratorio”

En el apartado anterior se menciona la necesidad de seguir con el análisis del funcionamiento del equipo, de esta forma se plantea hacer comparaciones de nuestro equipo con otros molinos de características idénticas. La realización de este interlaboratorio es satisfactoria gracias a la colaboración del grupo empresarial ENCE (Pontevedra), Torraspapel (Girona) y la Universidad Complutense de Madrid [UMC]. Los nuevos refinados se realizan por duplicado con una pasta patrón ECF [Muestra 5807 utilizada en verificación del molino PFI], bajo las condiciones sugeridas por ENCE:

- ✓ *Revoluciones* 3000 - 4000
- ✓ *Presión* 3.33 kN/mm
- ✓ *Agua* Destilada
- Refinados denominados como: [Ref. Ed 3000] y [Ref. Ed 4000].

- **Confrontación refinados ENCE – UPC**

El primer análisis comparativo “interlaboratorio” del molino UPC se realiza con un reporte entregado por ENCE que incluye la caracterización fisicomecánica de los refinados (3000 rev. y 4500 rev.) efectuados en sus instalaciones. La confrontación de los equipos, indica un efecto de mayor refinado para el PFI de ENCE (Tabla III); se obtienen diferencias considerables en cada serie de refinados, el índice de estallido y longitud de rotura sugieren la obtención de papeles más resistentes con mayor resistencia al desgote -°SR-.

Tabla III. Propiedades fisicomecánicas UPC - ENCE. [Ref. Ed 3000] - [Ref. Ed 4000]

Refinados		Densidad	Volumen	Pb. Bendtsen	Log. Rotura	I. Estallido	% IRA	°SR
		g/cm ³	cm ³ /g	μm/(Pa.s)	m	kPa.m ² /g		
3000 rev.	UPC	0,69	1,46	14,41	5553	3,69	139	36
	ENCE	0,73	1,37	-	7390	4,85	-	42
4000 rev.	UPC	0,70	1,42	8,94	6236	3,95	143	41
	ENCE	0,75	1,33	-	8177	5,25	-	51

En esta comparación se debe tener en cuenta que los resultados no solo dependen del estado del molino PFI sino también de otros factores que pueden afectar la precisión y/o exactitud de los resultados, tales como diferencias en los procedimientos de caracterización, equipos utilizados en los ensayos físicos y método operacional. El grado de interés de este estudio requiere minimizar todo tipo de error experimental para una mayor confiabilidad en los resultados; de esta manera se plantea una nueva metodología de comparación, donde la única variante sea el molino PFI. En esta metodología se utiliza la pasta patrón ENCE, donde las etapas de acondicionamiento y preparación se realizan en los laboratorios UPC, y es transportada al lugar de interés para efectuar refinados (por duplicado) con otros molinos PFI (sugeridos en el interlaboratorio); además la elaboración de hojas y caracterización física se realiza por el mismo operador en las instalaciones de la Especialidad Papelera y Gráfica; esta metodología disminuye los factores que influyen en las fluctuaciones de los resultados, puesto que la única variante es el molino PFI.

- **Interlaboratorio UPC, Torraspapel y UMC**

Las siguientes verificaciones del funcionamiento del molino PFI (UPC) se efectúa en la empresa Torraspapel (Girona) con un equipo PFI acreditado por el fabricante, y en la

Universidad Complutense de Madrid [UMC] con un molino exento de revoluciones por ser un equipo nuevo que se encuentra en las condiciones iniciales del fabricante.

La caracterización de los refinados de 3000 rev. y 4000 rev. indican que los equipos UPC, Torras y UCM no presentan diferencias significativas en el índice de retención de agua (%IRA); y en la resistencia al desgote se observa una diferencia de 4 °SR en los dos puntos de refino entre el molino UPC y UCM (Tabla IV), en estos resultados el equipo UPC ocupa una posición intermedia.

Tabla IV. Propiedades físicas de la pasta.

Refinados		% IRA	°SR
3000 rev.	<i>UPC</i>	139	36
	<i>Torras</i>	137	39
	<i>UCM</i>	138	32
4000 rev.	<i>UPC</i>	143	41
	<i>Torras</i>	143	42
	<i>UCM</i>	142	37

En las propiedades fisicomecánicas del papel (Tabla V), la confrontación entre el molino UPC y Torraspapel presentan diferencias aceptables para los resultados de densidad, volumen, resistencia al estallido y plegado; en la longitud de rotura se observan variaciones entre 313 m y 725 m para los refinados de 3000 rev. y 4000 rev. respectivamente. Con estas propiedades se puede concluir que el funcionamiento de los dos equipos tienen un efecto de refinado análogo; no obstante se encuentran diferencias en el índice de desgarrado y en la permeabilidad Bendtsen, lo que indica que el papel elaborado con pasta refinada en el molino Torraspapel tiene mayor resistencia al paso del flujo del aire.

La evaluación del molino UPC con el equipo UCM da una visión general del estado actual de nuestro PFI con respecto a uno nuevo. Los resultados de las propiedades fisicomecánicas UPC y UCM (Tabla V) indican que el mayor efecto de refinado lo hace el molino PFI UPC, no obstante la revisión de los puntos máximos y mínimos obtenidos en cada ensayo, revelaron que el papel elaborado con la pasta refinada en el molino UCM cubre parte de la zona definida por el molino UPC (sobrepasa los valores medios UPC), concretamente en la determinación del volumen específico, longitud de rotura, resistencia al desgarrado y plegado. Diferencias más notables se observan en el índice de estallido y permeabilidad Bendtsen, donde los valores

individuales de las hojas de papel obtenidas con el refinado UCM no presentan entrecruzamiento entre los resultados del molino PFI UPC. Las diferencias observadas en la respuesta al refinado también se explican por los consumos de energía; el molino UCM gasta menos energía que el molino UPC, efecto que está relacionado con las condiciones del laboratorio de Madrid, en el lugar de instalación del equipo se trabajó con una temperatura inferior o igual a 6 °C, mientras que los laboratorios UPC y Torraspapel los refinados se realizan a una temperatura promedio de 24 °C.

Tabla V. Propiedades fisicomecánicas del papel. Molinos UPC, Torraspapel y UCM

Refinados		Densidad	Volumen	Pb. Bendtsen	Log. Rotura	I. Estallido	I. Desgarro	R. Plegado
		g/cm ³	cm ³ /g	μm/(Pa.s)	m	kPa.m ² /g	mN.m ² /g	log (Nº pliegues)
3000 rev.	UPC	0,69	1,46	14,41	5553	3,69	9,83	3,02
	Torras	0,70	1,43	10,66	5240	3,65	9,04	3,02
	UCM	0,69	1,46	18,00	5255	3,12	9,36	2,82
4000 rev.	UPC	0,70	1,42	8,94	6236	3,95	9,25	3,06
	Torras	0,72	1,39	7,36	5653	4,01	8,43	3,14
	UCM	0,70	1,42	12,78	5818	3,58	8,67	2,94

Los molinos presentan variaciones en los resultados promedios de las propiedades fisicomecánicas, valores que son atribuidos al estado y condiciones de operación de cada equipo (temperatura), por consiguiente la dispersión de los resultados en los efectos del refinado para los tres equipos analizados se considera que no es significativa, y se puede afirmar que el molino UPC presenta una respuesta al refinado similar o análoga a otros equipos. La siguiente clasificación permite concluir que el molino PFI UPC no necesita otro acondicionamiento de superficies, su estado es satisfactorio con lo cual es posible realizar estudios relacionados con la operación de refinado.

- ✓ *Resultados muy similares*
- % IRA
- °SR (UPC - valor intermedio)
- Volumen y densidad específica
- Longitud de rotura
- Índice de desgarro (UPC - valores mayores)

✓ *Resultados que presentan variación*

- Índice de estallido (UPC y Torras - valores mayores a UCM).
- Resistencia al plegado (UPC y Torras - valores mayores a UCM).
- Permeabilidad Bendtsen (UPC valores intermedios)

2 CONCLUSIONES

La variación inicial del 71% en permeabilidad Bendtsen observada con los datos del historial 1992 y refinados 2004 indica que las superficies del equipo de refinado han evolucionado obteniendo una mayor modificación morfológica de las fibras. La calibración del equipo PFI se hizo necesaria para obtener datos reproducibles y comparables con investigaciones realizadas en el tema de refinado; siguiendo la metodología recomendada por el fabricante para la calibración del equipo se acondicionan las superficies de refinado para conseguir valores equivalentes o comparables a las condiciones iniciales del molino.

El trabajo realizado como “interlaboratorio” con el molino PFI de Torraspapel, UCM, y UPC, muestra que tras el acondicionamiento de las superficies del molino UPC se obtiene una respuesta intermedia entre un equipo exento de revoluciones (UCM) y un equipo PFI revisado y certificado por el fabricante (Torraspapel); las desviaciones encontradas en el efecto de refinado según el análisis de propiedades fisicomecánicas son atribuidas a factores del proceso como temperatura e instalaciones de los respectivos equipos.

Es normal la evolución de las superficies de refinado con el uso y paso del tiempo; donde se puede presentar un caso de aceleración del efecto de refinado o por el contrario obtener una menor respuesta en la modificación de las fibras. Para mantener un control interno del molino PFI es necesario planificar verificaciones periódicas que den información de la estabilidad del equipo de refinado, con este fin se recomienda utilizar pastas de referencia [ECF - Muestra 5807] que cumplan con características de durabilidad (estabilidad de las propiedades físicas - químicas). En estos estudios, la respuesta al efecto del refinado que se determina con la caracterización fisicomecánica de papeles y pasta refinada debe ser comparada con datos correspondientes a un historial.

3 BIBLIOGRAFIA

Operating manual for the PFI mill, (1991). The Norwegian pulp and paper research institute. Edition 521-530

ISO 5264-2 - Pulps -Laboratory beating -Part 2 PFI mill method.