

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

RESUMEN

En este capítulo se realiza una introducción general a los temas clave de la presente tesis. En el mismo se plantea la utilización de fibras de lino para la fabricación de papel, el blanqueo químico de pastas no madereras, la utilización de procesos de blanqueo TCF, y concretamente, el uso de la biotecnología para mejorar secuencias de blanqueo TCF. Asimismo, se analizan los diferentes sistemas enzimáticos que se aplican y su forma de actuación. Finalmente, se describen el planteamiento y los objetivos de trabajo de la tesis.

1.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años la producción de papel ha aumentado y las expectativas hacia el futuro indican que seguirá en aumento. Para poder hacer frente a este incremento es necesaria la utilización de nuevas materias primas y un aumento en la productividad y rendimiento de los procesos, sin que eso cree problemas para el medio ambiente. La aparición de leyes más restrictivas sobre los procesos industriales con el objetivo de minimizar el impacto ambiental, lleva a la introducción de cambios y a la utilización de nuevas tecnologías en muchas áreas industriales. La industria papelera es uno de estos sectores que ha sufrido numerosos cambios en las tres últimas décadas, centrados especialmente en la sección de blanqueo de pastas, debido a la utilización de cloro y la formación de compuestos organoclorados (AOX) durante el proceso. Las presiones medioambientales impulsan el blanqueo de pastas mundial, en primer lugar, hacia la producción de pastas blanqueadas según secuencias ECF (Elemental Chlorine Free) y en segundo lugar, a la producción de pastas blanqueadas según secuencias TCF (Totally Chlorine Free).

La producción de pasta TCF va en aumento debido a las regulaciones medioambientales tanto para disminuir las descargas de organoclorados como por la necesidad del cierre de la planta de blanqueo a través del reciclado de los filtrados. La

recirculación completa es difícil con secuencias en las que se utilicen cloro o derivados de éste por sus efectos corrosivos en los equipos, por lo que las secuencias TCF presentan un alto potencial para la reutilización de los filtrados en el ciclo de recuperación (Barascud et al. 1995;Cates et al. 1995;Johansson and Clark 1995).

Por otro lado, la utilización de fibras no madereras para la fabricación de pastas y papeles en países industrializados se basa en la fabricación de pastas de alta calidad para producir papeles de alto valor añadido. Particularmente, dentro de las plantas anuales, las fibras de lino proporcionan papeles finos, resistentes y permanentes. Las cocciones que se realizan a las plantas anuales son, normalmente, cocciones más suaves que las convencionales en madera, como un proceso con hidróxido de sodio y antraquinona. El blanqueo mediante secuencias ECF no comporta graves complicaciones, sin embargo, el problema radica en blanquear este tipo de pastas mediante secuencias TCF. El empleo del ozono para este fin, o la aplicación de técnicas biotecnológicas permiten blanquear estas fibras más fácilmente. Concretamente, para el caso de plantas anuales no existen muchos estudios en los que se apliquen enzimas oxidativas, por lo que se encuentran todavía menos trabajos sobre el blanqueo enzimático de pasta de lino (Da Silva et al. 1997;García 2003;Giovannozzi-Sermanni 1997;Martínez et al. 2000).

1.1.1 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

1.1.1.1 Constituyentes de la pasta de papel

Los constituyentes químicos mayoritarios presentes en la pasta son los hidratos de carbono (celulosa y hemicelulosas) y la lignina.

La celulosa es un polímero lineal, cuya unidad básica es la D-glucosa que se enlaza sucesivamente a través de un enlace glucosídico en la configuración β (1-4), dando lugar a la unidad de celobiosas que es la unidad más pequeña que se repite exactamente en la cadena polimérica (Fig. 1-1).

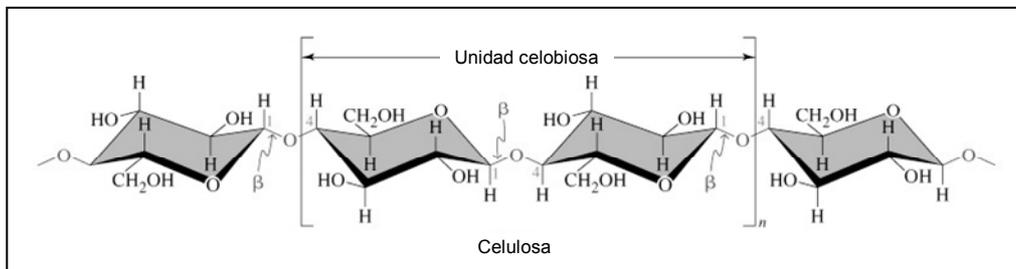


Fig. 1-1. Molécula de celobiosas en la cadena de celulosa.

Las moléculas de celulosa tienden a formar enlaces por puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, y su presencia influye en la morfología, rigidez, orientación, resistencia y reactividad de las cadenas celulósicas. Son los enlaces de hidrógeno intermoleculares los que permiten una estructura fibrilar ordenada, es decir, de una alta cristalinidad. Las zonas de elevada cristalinidad son difíciles de penetrar por disolventes y reactivos, al contrario que las zonas relativamente más desordenadas (amorfos), que son más accesibles y susceptibles a todas las reacciones químicas, y que además favorecen el hinchamiento, el alargamiento y la flexibilidad de la fibra (García Hortal 2007; Martínez et al. 2000). En la pared celular, las cadenas de celulosa se agregan formando las microfibrillas, que es el elemento base de los materiales celulósicos. Las dimensiones de estas microfibrillas varían en función de su origen y su posición dentro de la pared celular.

Las propiedades de los materiales celulósicos están relacionadas con el grado de polimerización de la molécula de celulosa (DP). La resistencia del papel es debida en parte a la resistencia individual de las cadenas de celulosa, que disminuye si éstas se degradan. Durante el blanqueo de la pasta se pretende eliminar el color que dan otros componentes (lignina), pero se puede producir una degradación de la celulosa, que se traduce en una disminución del rendimiento y en una posible disminución de las propiedades físicas y mecánicas de la fibra. Esta degradación puede ser de tipo hidrolítico, oxidante, alcalino, térmico, microbiológico o mecánico.

Las hemicelulosas son polisacáridos químicamente heterogéneos, constituidos por combinaciones de monosacáridos de cinco carbonos (xilosa y arabinosa) y seis carbonos (glucosa, manosa y galactosa) enlazados no uniformemente. Algunas hemicelulosas están asociadas a la porción celulósica, mientras que otras lo están con la lignina. Actúan como matriz soporte para las microfibrillas de celulosa en la pared celular, y además son de menor peso molecular, más accesibles, más fácilmente degradables y más fáciles de disolver que la celulosa. Al mismo tiempo, son amorfas y muy hidrofílicas, por lo cual tienen un papel importante en la capacidad de absorber agua durante la operación de refinado, promoviendo la fibrilación interna de la fibra y mejorando las propiedades físico mecánicas que dependen del área de enlace interfibras (Annergren 1996; Dence and Reeve 1996).

La lignina es muy diferente estructuralmente de la celulosa y de las hemicelulosas. Es un polímero fenólico, muy ramificado, tridimensional y amorfo, cuyo principal papel es el de actuar como material incrustante entre la lámina media y las paredes de la fibra. Tiene un carácter muy hidrofóbico, por lo que su presencia en las pastas inhibe la absorción de agua, el hinchamiento de la fibra y dificulta el refinado. Su cantidad y distribución a través de las paredes celulares difiere según sus orígenes, así, por ejemplo, las coníferas poseen un mayor porcentaje de lignina que las frondosas.

La estructura básica de la lignina difiere entre coníferas y frondosas. En las coníferas, la estructura predominante que se repite se conoce como la unidad Guayacilo (G), la cual contiene un único grupo metoxilo en el anillo fenilpropano. En las frondosas, la lignina es un copolímero o mezcla entre unidades Guayacilo y Siringilo (S), conteniendo ésta última dos grupos metoxilo por núcleo fenilpropano (Parham 1983) (Fig. 1-2). Asimismo, es conocido que las unidades S son más reactivas que las unidades G, por lo tanto, la lignina en que predominen las unidades S será más fácil de eliminar (del Río et al. 2001; Dence and Reeve 1996). Como consecuencia, la lignina de la madera de coníferas se elimina con mayor dificultad. La lignina de las fibras de origen no maderero es más similar a la lignina de coníferas o a la de frondosas según las unidades que predominen (G o una mezcla de S y G).

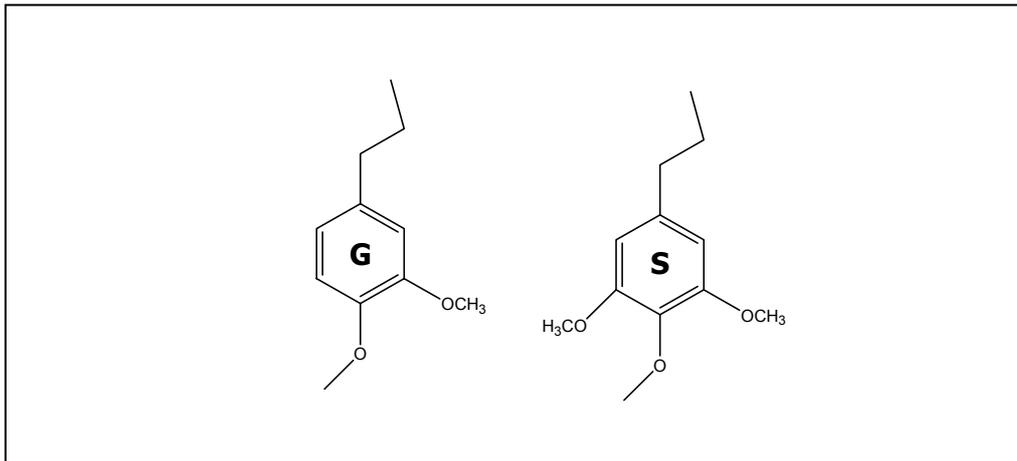


Fig. 1-2. Unidades de lignina Guayacilo (G) y Siringilo (S).

Las células vegetales poseen paredes celulares que contienen microfibrillas de celulosa formando el esqueleto, que a su vez está rodeado de otras sustancias que actúan como matriz (hemicelulosas) y material incrustante (lignina). El modelo generalizado de la organización típica de la pared celular se muestra en la Fig. 1-3. Las fibras están constituidas de varias capas: pared primaria (P), pared secundaria externa (S1), pared secundaria media (S2) y pared secundaria interna (S3). En las células maduras, la parte interna está vacía y se denomina lumen. Las diferentes capas difieren respecto a su espesor, estructura, composición química y orientación de las microfibrillas con respecto al eje de la fibra (deJong et al. 1999; Rydholm 1967).

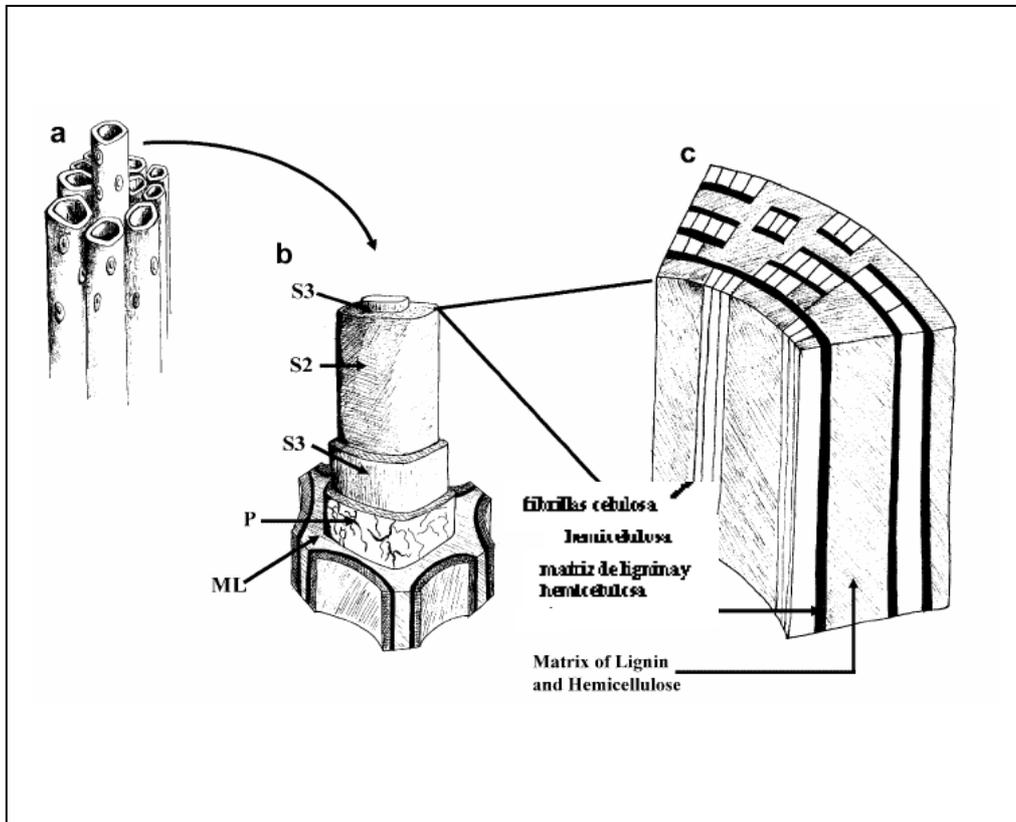


Fig. 1-3. Configuración de la madera (a). Células adyacentes (b), S1, S2, S3 paredes secundarias, P pared primaria, ML lámina media. Distribución de lignina, hemicelulosa y celulosa en la pared secundaria (Kirk and Cullen 1998).

La lignina que se encuentra en la lámina media, se elimina en gran parte en el proceso de cocción, donde se individualizan las fibras. La lignina residual de la fibra a blanquear se localiza principalmente en la pared secundaria media (S2), al constituir ésta la porción principal de la pared celular (Parham 1983).

1.1.1.2 Materia prima no maderera: pasta de lino

Durante casi 2000 años el papel se ha fabricado con fibras celulósicas derivadas de fibras madereras y no madereras. Es conocido que el consumo mundial de fibras madereras es mucho mayor que el consumo de fibras de origen no maderero. Sin embargo, si se tienen en cuenta las diferencias geográficas, se observa que en países en vías de desarrollo las plantas anuales son la mayor fuente de fibra para la fabricación de papel (Moore 1996).

En 1970, la capacidad mundial para la producción de pasta de papel a partir de fibras no madereras fue de tan sólo un 6,7 % del total. No obstante, desde entonces ha tenido lugar un aumento importante en la producción de pastas no madereras. Durante 1993, la capacidad total de pasta para papel a partir de fibras anuales alcanzó el 10,6% del total y en 1998, fue un 11,5 % del total. Desde 1970 hasta ahora, la capacidad de producción de fibras de plantas no madereras ha aumentado en el mundo a un ritmo de dos a tres veces superior al de fibras de madera (Atchinson 1998). Actualmente, la utilización de especies no madereras en países industrializados se basa en la fabricación de papeles especiales de alto valor añadido (papel de seguridad, papel moneda...). Hay tres tipos de fibras no madereras para papel: subproductos de la agricultura como trigo, arroz y azúcar, cosechas como kenaf, cáñamo industrial, lino o plantas salvajes como cañas y hierbas. La ventaja que ofrecen las fibras no madereras es el bajo contenido en lignina y el inconveniente es su alto contenido en sílice (Pande 1998). En los países occidentales existe una creciente necesidad de considerar estrategias alternativas en el sector agrícola, no sólo enfocadas a la industria alimentaria sino también a otros sectores industriales como son el papelerero y el textil (Abramovitz and Matton 1999; Moore 1996). En Europa se mantiene una tendencia de incremento en la demanda de papel en general, y especialmente de algunos tipos particulares de papel. Por otro lado, el consumidor está cada vez más interesado en la posibilidad de disponer de papeles obtenidos a partir de métodos no contaminantes, o en los que se ha sustituido la fibra virgen por fibra reciclada o fibra no maderera. Las mejoras en la utilización de plantas anuales podrían contribuir a preservar y mantener el medio ambiente haciendo posible conseguir una mayor proporción de estas materias primas en la fabricación total de pasta de papel (Croon 1995; Jeyasingam 1998; Jeyasingam 2000). Además, se sabe que utilizando una combinación adecuada de fibras no madereras se puede fabricar cualquier tipo de papel (García Hortal 2007).

Dentro de las plantas anuales, el lino es una planta anual herbácea originaria de Asia que se cultiva por su alto contenido en fibras. De las 150 especies del género *Linum*, sólo una, *Linum usitatissimum*, proporciona fibras útiles comercialmente. La planta, cuando se cultiva por sus fibras y no por sus semillas, se siembra densamente para evitar las ramificaciones en el tallo que crece hasta una altura de 0,9-1,2 m. Las fibras liberianas o corticales de lino (de la corteza) son las utilizadas tradicionalmente en la industria textil y constituyen sólo el 30% del vegetal (García Hortal 2007; McGovern et al. 1987). Estas fibras son interesantes para la industria papelerera, y proporcionan buenas propiedades de resistencia a los papeles fabricados a partir de la pasta, pero, como desventaja tienen un coste muy elevado, por lo que en la industria papelerera se utilizan junto con una pequeña proporción de fibras del leño (lo que se denominan industrialmente “pajas” del lino) y de este modo se abarata el coste de la materia prima. El vegetal original de la tesis contiene un 15 % de fibras leñosas o “pajas”,

siendo el resto fibras liberianas. La longitud de las fibras liberianas varía entre 10 y 55 mm y el ancho entre 12 y 30 μm (Jakson 2000;McGovern et al. 1987). En cambio, las fibras leñosas son más parecidas morfológicamente a las fibras de frondosas, con una longitud entre 0,05 y 0,5 mm y anchura entre 10 y 30 μm . Su contenido en lignina es mucho mayor, lo que las hace más difícilmente blanqueables que las fibras de la corteza o textiles (García Hortal 2007;van Roekel et al. 1999).

Las fibras de lino proporcionan unos papeles densos, resistentes y permanentes, ideales para papeles especiales como bolsas de té, papel moneda o papel registro permanente de alta calidad. Además tienen menor contenido en lignina que las fibras madereras (del Río et al. 2001), por lo que pueden ser pasteadas con tratamientos alcalinos suaves. La lignina de lino muestra un predominio de unidades Guayacilo (del Río et al. 2007), lo que indica que la composición de su lignina es más similar a la de pastas de coníferas. El proceso de cocción más utilizado es el proceso con hidróxido de sodio y antraquinona (NaOH-AQ). La operación de refinado para preparar estas fibras para la fabricación del papel consume una gran cantidad de energía (García Hortal 2007;Moore 1996), y ésta es necesaria para obtener papeles finos. Por otro lado, una dificultad añadida al trabajar con este tipo de fibras es su tendencia a adherirse o enredarse unas con otras, lo que dificulta su manipulación tanto en los procesos industriales como en el laboratorio.

1.1.1.3 Materia prima maderera: pasta de eucalipto

La pasta de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) pertenece a las frondosas (“hardwood”). Las fibras de frondosas, en comparación con las de coníferas, son cortas, de pared gruesa y lumen estrecho (García Hortal 2007). La industria de pastas presenta un consumo elevado de eucalipto (1,6 millones de toneladas anuales). Además, esta pasta tiene un gran interés estratégico para España en la Unión Europea, ya que es de crecimiento rápido (10-14 años) y de elevada productividad, y su madera es de alta calidad, lo que le confiere unas propiedades especiales al producto final.

La pasta de eucalipto presenta la siguiente composición química (Sjöström 1993) en tanto por ciento de peso seco de madera: 51,3 % de celulosa; 1,4 % de glucomanano; 19,9% de xilano; 3,9% de otros carbohidratos; 21,9 % de lignina y 1,3 % de extractivos. Tiene una proporción elevada de unidades Siringilo frente a unidades Guayacilo (Ibarra et al. 2007a), que se relaciona con la facilidad de blanqueo. Se caracteriza por contener una gran cantidad de xilanos, que forman parte de las hemicelulosas presentes en las fibras celulósicas (Grant 1992;Senior and Hamilton 1992). En la Fig. 1-4 se muestra la estructura del xilano.

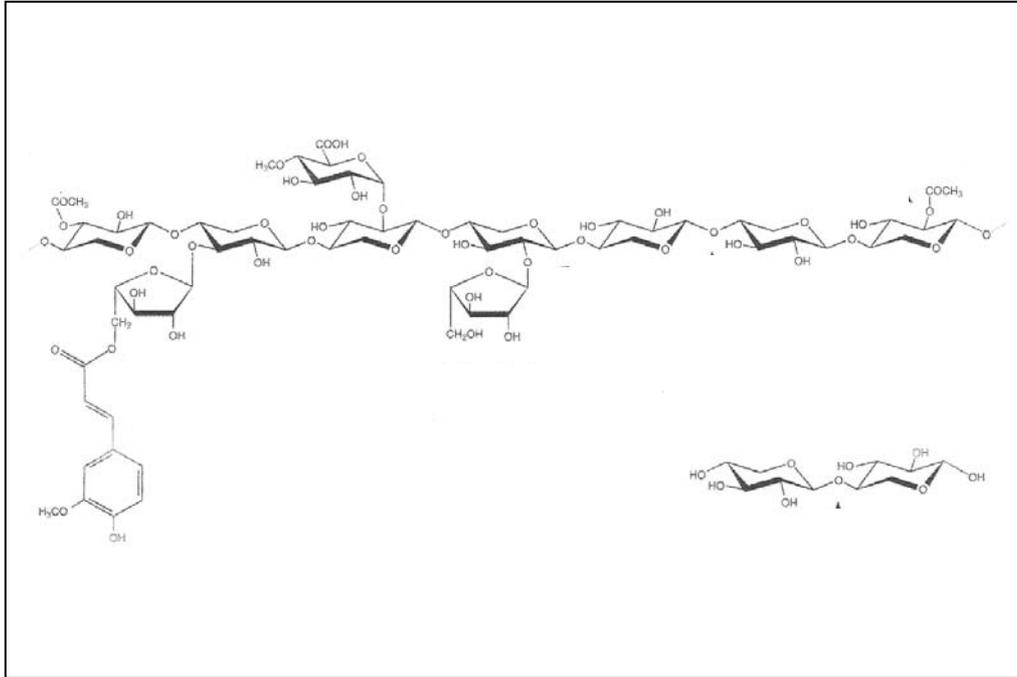


Fig. 1-4. Estructura del xilano.

Ácidos hexenurónicos

Las pastas de frondosas, entre ellas la pasta de eucalipto, se caracterizan por contener una gran cantidad de ácidos hexenurónicos (HexA). Los HexA se forman durante la cocción kraft donde el ácido 4-O-metilglucurónico presente en los xilanos se convierte en su correspondiente ácido insaturado hexenurónico (ácido 4-deoxi-β-L-threo-hex-4-enopiranosilurónico) por la pérdida del metanol tal como se muestra en la Fig. 1-5 (Buchert et al. 1995;Teleman et al. 1995).

La importancia de la presencia de los grupos HexA radica en la influencia que estos tienen en el proceso de blanqueo y en las propiedades finales de la pasta. Los HexA tienen los siguientes efectos: contribución al índice kappa (Gellersted and Li 1996;Vuorinen et al. 1996), consumo de reactivos de blanqueo (Jiang and Van Lierop 2000), participación en la retención de iones metálicos (Vuorinen et al. 1996), contribución a la reversión del grado de blanco (Sevastyanova et al. 2006), contribución a la formación de ácido oxálico (Elsander et al. 2000). Por este motivo últimamente han aparecido investigaciones sobre métodos de eliminación de estos grupos HexA.

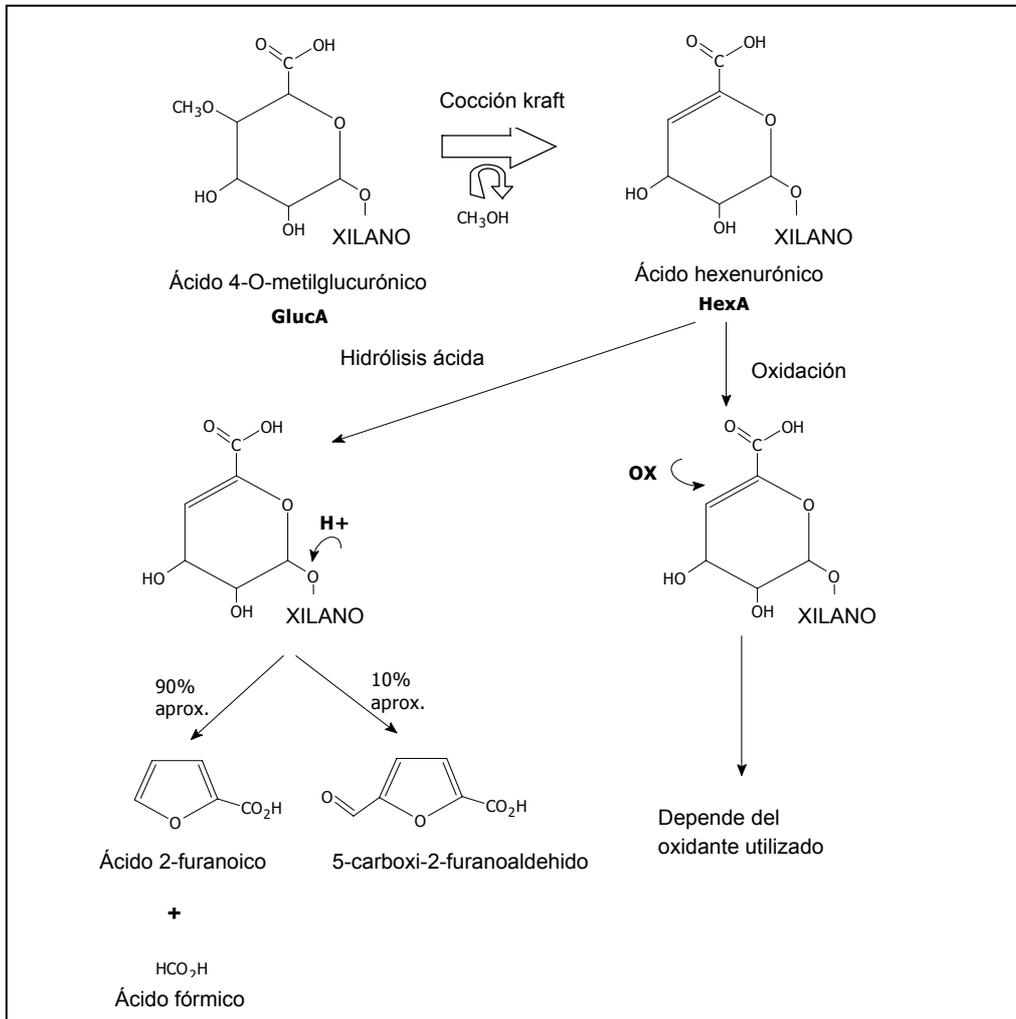


Fig. 1-5. Formación del ácido hexenurónico (HexA) y su destrucción mediante hidrólisis u oxidación (Roncero 2001).

1.1.2 BLANQUEO QUÍMICO TCF: OZONO

Obtener pastas TCF implica la utilización de reactivos químicos sin compuestos clorados como el oxígeno o el peróxido de hidrógeno. Sin embargo, la combinación de estos reactivos no es suficiente para obtener la misma eficiencia que en la cloración, en cambio, el empleo de ozono como agente deslignificante de blanqueo aparece como una buena alternativa (Lachenal and Nguyen 1994).

El blanqueo TCF requiere una entrada de pasta de bajo índice kappa (10-12) para obtener las mejores propiedades físicas y ópticas debido a la degradación de las fibras

durante el blanqueo, aunque se pueden obtener blancuras de 89 %ISO sin pérdida de rendimiento. En la pasta TCF blanqueada la cantidad de lignina residual que permanece en la pasta es superior a la de las pasta ECF por lo que se debe establecer este residuo para minimizar el amarillamiento después de la producción.

El ozono es un reactivo muy oxidante, que debido a su inestabilidad debe ser generado en el lugar donde va a ser aplicado. Es un gas tóxico a bajas concentraciones y tiene un olor característico. Reacciona directamente con la mayor parte de la materia orgánica, incluyendo los compuestos lignocelulósicos. Su potencial de oxidación sólo es excedido por el del flúor y el oxígeno atómico. (Dence and Reeve 1996). El ozono reacciona con la mayoría de grupos químicos presentes en la lignina residual, pero su tendencia a reaccionar con los hidratos de carbono, causa una reducción importante de la viscosidad y como consecuencia, también de la selectividad del proceso, por lo que se debe aplicar a dosis bajas. El ozono es menos selectivo hacia la lignina que otros reactivos de blanqueo, tales como el dióxido de cloro, el oxígeno y el peróxido de hidrógeno. La degradación de los hidratos de carbono es el resultado de la formación de grupos funcionales carbonilo y carboxilo, que posteriormente, en un medio alcalino pueden inducir a la rotura de la cadena celulósica por la reacción β -eliminación. Por este motivo, una reducción de la pasta ozonizada con un fuerte agente reductor como el borohidruro de sodio (NaBH_4) convierte los grupos sensibles al álcali en grupos hidroxilo estables, evitando así, la rotura de la cadena de celulosa (Dence and Reeve 1996).

Estos problemas asociados al blanqueo y los altos costes de instalación tienden a dificultar su aplicación en el blanqueo TCF. La etapa de blanqueo con ozono, aún se encuentra en proceso de investigación, y aunque se aplica industrialmente en algunas empresas, todavía requiere estudios de la selectividad del proceso. El blanqueo a través de secuencias TCF utilizando reactivos químicos como el oxígeno o el peróxido de hidrógeno no es novedoso en fibras de origen no maderero. Sin embargo, la utilización de ozono supone una nueva oportunidad de mejora del blanqueo TCF.

1.1.3 BIOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA PAPELERA

La lignocelulosa, el mayor componente de la biomasa, consiste en tres tipos de polímeros (celulosa, hemicelulosa y lignina). Una gran variedad de hongos y bacterias pueden fragmentar estas macromoléculas utilizando una batería de enzimas hidrolíticas o oxidativas (Pérez et al. 2002). Las enzimas son catalizadores proteicos producidos a partir de organismos vivos. Aceleran la velocidad de las reacciones químicas y son altamente específicos del tipo de reacción que catalizan. Se clasifican en seis clases: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

El actual interés de la aplicación de biotecnología en los procesos de fabricación de pasta y papel es consecuencia de las posibilidades que ofrecen los tratamientos biológicos en cuanto a las restricciones ambientales mencionadas anteriormente. La aplicación en el área de blanqueo parece muy prometedora, concretamente se estudió ampliamente en el caso de las enzimas xilanasas y se ha llegado a su implantación industrial obteniendo un ahorro de reactivos de blanqueo, que repercute en una reducción de costes y en una reducción del contenido de compuestos halogenados en el vertido (Jean et al. 1994;Manji 2005a;Manji 2005b;Popovici et al. 2004;Tolan and Thibault 1997;Tolan and Collins 2004;Van der Brught et al. 2002;Vicuña et al. 1997;Yee and Tolan 1997).

1.1.3.1 Enzima oxidativa: lacasa

Durante las dos últimas décadas, se ha incrementado exponencialmente el número de publicaciones científicas referentes a la biodegradación de la lignina. El propósito final de muchos de estos estudios es el potencial de aplicación de enzimas y organismos en la degradación preferente de la lignina (ligninolíticos) en procesos no contaminantes para la fabricación de pasta y papel (llamados procesos de "biopasteado" y de "bioblanqueo"). A partir de hongos de podredumbre blanca pueden obtenerse enzimas ligninolíticas -lignina peroxidasa (LiP), manganeso-peroxidasa (MnP) y lacasa- junto con oxidasas que producen H₂O₂ -como la gioxal oxidasa (GOX) y la aril-alcohol oxidasa (AAO)- y reductasas asociadas al micelio (Aleksandrova et al. 2000;Crestini and Argyropoulos 2001). La caracterización de este tipo de enzimas ligninolíticas abrió un nuevo y prometedor campo de aplicación en el blanqueo de pastas.

La lacasa es una enzima típica de los hongos de podredumbre blanca. La enzima presenta cuatro iones de cobre por molécula, uno de los cuales (tipo 1) está implicado en la oxidación de los sustratos mientras el resto (tipos 2 y 3) participan en el transporte de electrones hasta el oxígeno. Su bajo potencial redox sólo le permite oxidar los compuestos fenólicos. Sin embargo, en presencia de mediadores redox son capaces de oxidar unidades no fenólicas. Entre las aplicaciones de la lacasa se encuentra la deslignificación, producción de etanol, análisis de drogas, clarificación de vino, bioremediación, eliminación de triclorofenol, oxidación de compuestos alcalinos, efluentes industriales coloreados, decolorización de colorantes y degradación de herbicidas (Ibarra 2006;Mayer and Staples 2002).

Las enzimas del tipo oxidativas (lacasas, MnP y lignina peroxidases), estudiadas por muchos autores en los últimos veinte años, sugieren mejoras en el blanqueo de pastas kraft y ahorro de reactivos (Call and Mücke 1997;Paice et al. 1995;Viikari 2000). El bioblanqueo con este tipo de enzimas se encuentra aún en fase de desarrollo, pero, en algunos casos, está cerca su implementación industrial (Eriksson

2000). Particularmente, las enzimas lacasas, que necesitan la presencia de un mediador para su actuación, son las más prometedoras (Paice et al. 2002; Viikari 2000). Es lo que se denomina el sistema lacasa mediador, en el cual la enzima oxida un mediador químico que, a su vez, oxida la lignina. El elevado coste y los potenciales problemas de contaminación de los mediadores han llevado a los investigadores a focalizar sus estudios en la búsqueda de mediadores alternativos y en su recuperación (Wong et al. 1999). El sistema lacasa mediador permite desarrollar secuencias de blanqueo TCF, sustituir la etapa de deslignificación con oxígeno o la de ozono, ahorrar reactivos, blanquear la pasta y reducir el índice kappa. En la literatura de la última década se demuestra que existen muy buenas perspectivas en el blanqueo de pasta aplicando tanto MnP, como lacasas en presencia de mediadores (Bajpai 1999; Bourbonnais et al. 1997; Camarero et al. 2004; Chakar and Ragauskas 2000a; Chakar and Ragauskas 2000b; Ibarra et al. 2006; Ibarra et al. 2007b; Nelson et al. 1998; Paice et al. 1995).

En cuanto al mecanismo de oxidación de la lacasa, las enzimas necesitan la presencia de oxígeno para actuar, de manera que: la lacasa reduce el oxígeno molecular a agua, oxidándose, después ella se reduce oxidando la lignina presente en la pasta (Fig. 1-6). Este mecanismo es capaz de oxidar sólo los grupos fenólicos de la lignina, por lo que es poco efectivo. Un inconveniente adicional es el limitado acceso de la lacasa a la lignina de la pared celular, debido a su gran peso molecular (Bourbonnais and Paice 1995). Por este motivo es necesaria la presencia de un mediador, el cual es un compuesto de bajo peso molecular que es capaz de difundirse en la fibra y reaccionar con las fracciones de lignina (fenólicas y no fenólicas), y así deslignificar la pasta (Freudenreich et al. 1998). El modo de actuación en presencia del mediador es: la lacasa reduce el oxígeno molecular a agua, oxidándose, después ella se reduce oxidando el mediador que a su vez oxida la lignina presente en la pasta (Fig. 1-7). Este segundo mecanismo es capaz de oxidar tanto los grupos fenólicos como los no fenólicos de la lignina residual, por lo que es más eficaz que el anterior. Los mediadores más utilizados en la literatura son el ABTS (2,2'-azinobis-(3)-etilbenzotiazolona-6-sulfonato) y el HBT (1-hidroxibenzotriazol) (Fig. 1-8). Aunque en estos momentos se estudia la aplicación de mediadores naturales, derivados de la lignina (Fillat et al. 2007).

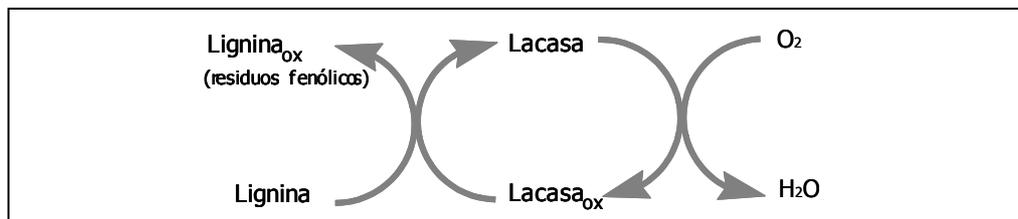


Fig. 1-6. Mecanismo de actuación de la lacasa sobre la lignina.

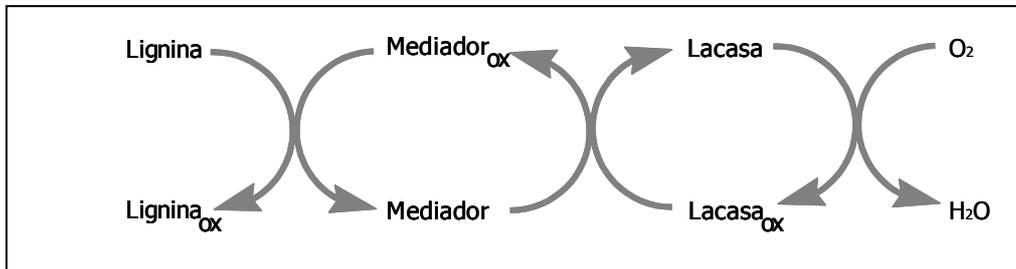


Fig. 1-7. Mecanismo de actuación del sistema lacasa mediador sobre la lignina.

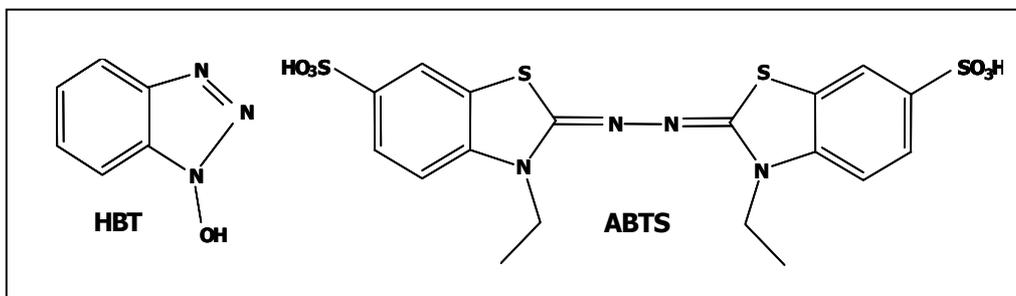


Fig. 1-8. Fórmula química de los mediadores HBT y ABTS.

El potencial redox de las lacasas es muy variable, y normalmente el valor está entre 400 mV y 800 mV. Este valor es suficiente para oxidar al mediador a través de la abstracción de un electrón (Camarero et al. 2007; Fabbrini et al. 2002). Sin embargo, lacasas que provienen de diferentes fuentes, oxidan en grados diferentes a los mismos compuestos modelos de lignina. La efectividad de un sistema lacasa-mediador para degradar la lignina depende de las propiedades de la lacasa, del mediador, y de su combinación (Li et al. 1999). En cuanto a los mediadores, aquellos con grupos funcionales N-OH, como el caso del HBT, se oxidan a su radical correspondiente en el tratamiento con la lacasa, por lo tanto existe un mecanismo vía radicales en el sistema lacasa-mediador. Es conocido que el HBT se convierte parcialmente a BT (benzotriazol) en las condiciones del sistema lacasa-mediador (Bourbonnais et al. 1997; Potthast et al. 2001; Sealey and Ragauskas 1998) y dicho compuesto actúa como oxidante transfiriendo un átomo de oxígeno a la lignina. Según varios autores, en los sistemas lacasa-mediador se forman especies radicales de oxígeno que actúan sobre la lignina (Crestini and Argyropoulos 2001) y también sobre los hidratos de carbono produciendo su oxidación; como también se observa en los tratamientos con ozono (García et al. 2003; Roncero 2001).

1.1.3.2 Enzima hidrolítica: xilanasa

Las xilanasas son hidrolasas que catalizan la hidrólisis de xilanos que forman parte de las hemicelulosas presentes en las fibras celulósicas. Estas hemicelulosas se encuentran, en cierta forma, en una situación intermedia entre las cadenas ordenadas de celulosa y la fracción amorfa de lignina. El efecto positivo de la xilanasa se atribuye a la eliminación de estos xilanos, haciendo que desaparezca la unión existente entre celulosa y lignina, por lo que al encontrarse más libre ésta última facilita su eliminación en posteriores etapas de blanqueo. En anteriores trabajos se demostró que el pretratamiento de pastas kraft con xilanasa era efectivo, aumentando tanto la deslignificación como la blancura, además de reducir la cantidad de cloro necesaria en las siguientes etapas de blanqueo (Herpöel et al. 2002; Viikari et al. 1986). Varias enzimas parecen estar relacionadas en la degradación de xilanos y atacan de diferente manera las cadenas de xilanos (Clarke et al. 1997; Ninawe and Kuhad 2006; Teixeira Duarte et al. 2003), por lo que las xilanasas tienen diferentes capacidades de influir en el blanqueo (Elegir et al. 1995). El beneficio de la aplicación de xilanasas depende del tipo de secuencia de blanqueo utilizada, así como también del contenido en lignina residual de la pasta (Viikari 2000).

Se han propuesto distintas hipótesis para explicar el mecanismo de actuación de la xilanasa en el blanqueo de pastas, tales como:

- Lignina atrapada físicamente

Durante el período de calentamiento de la cocción kraft, cuando la concentración de álcali es elevada, parte de los xilanos se disuelven en las lejías de cocción. Como durante la cocción la concentración de álcali disminuye igual que el pH, cadenas cortas de xilanos precipitan de una forma más o menos cristalina en la superficie de las fibras de celulosa. Los depósitos de xilano pueden atrapar la lignina residual en la superficie de las fibras provocando una disminución de la accesibilidad de la pared de la fibra. La eliminación de xilano precipitado facilita tanto la difusión de la lignina hacia el exterior de la matriz de la fibra, como permite la accesibilidad de los químicos. Esta eliminación de xilano formaría poros parecidos a los de las macromoléculas eliminadas (Wong et al. 1997a).

- Complejos lignina-xilano

El xilano reprecipitado puede estar químicamente enlazado a la lignina residual de la pasta; los enlaces lignina-carbohidrato en la pasta kraft impiden la eliminación de esta lignina residual. La eliminación de la parte de carbohidrato del complejo lignina-xilano facilita la deslignificación por eliminación del componente de lignina o por la reducción

en el tamaño de las macromoléculas que contienen lignina residual (Wong et al. 1997a).

- Cromóforos provenientes de los xilanos

Durante la cocción kraft, la xilosa y las macromoléculas de xilanos se modifican y se forman estructuras coloreadas con enlaces dobles y algunos grupos ácido 4-O-metilglucurónicos presentes en los xilanos se convierten al correspondiente ácido hexenurónico insaturado (HexA) por eliminación de metanol. Los HexA aumentan el número kappa, consumen reactivos de blanqueo, retienen iones metálicos, favorecen el amarillamiento de la pasta y contribuyen a la formación de ácido oxálico (Roncero et al. 2003;Wong et al. 1997a). El tratamiento con xilanasa podría eliminar estos compuestos cromóforos (Garg et al. 1996;Jeffries et al. 1999;Wong et al. 1997b) así como disminuir el contenido en ácidos hexenurónicos (Elegir et al. 1995;Valls et al. 2005;Viikari 2000).

- Hinchamiento de fibra

Las interacciones de adsorción entre la celulosa y el xilano contribuyen a la integridad de las fibras de pasta. La eliminación de xilano accesible a xilanasa puede abrir la estructura de la fibra. Este hinchamiento generaría poros más grandes que las moléculas de xilano eliminadas (Wong et al. 1997a).

La combinación de estos factores permite que el tratamiento con xilanasa en el blanqueo de pastas produzca un aumento de la deslignificación y de la blanca (Roncero et al. 2005;Siles et al. 1996;Valls et al. 2005), un ahorro de agentes de blanqueo (Popovici et al. 2004;Robles et al. 2006;Roncero et al. 2000;Siles et al. 1996;Torres et al. 2000) y una reducción del contenido en compuestos halogenados en el efluente (Buchert et al. 1994;Manji 2005a;Siles et al. 1996).

Los factores que afectan a la eficiencia de un tratamiento con xilanasa están asociados a las propiedades de la enzima (tipo, actividad, pH óptimo, temperatura óptima, capacidad de penetración), a las características de la pasta (contenido en lignina, secuencia de blanqueo, accesibilidad al sustrato, composición del sustrato) y otros como la consistencia de la pasta, concentración de sales, la adecuada dispersión de la enzima y el tiempo de reacción (Beg et al. 2001;Clarke et al. 1997). En un principio, las aplicaciones de enzimas se realizaron a pH ácidos. Durante la cocción kraft y la deslignificación con oxígeno, los pH son alcalinos y las temperaturas elevadas, lo que lleva a los productores de enzimas a desarrollar formulaciones en las que fueran estables a estos pH y temperaturas para poder ser aplicadas en condiciones más próximas a las industriales (Beg et al. 2001;Van der Brught et al. 2002). Las condiciones óptimas de aplicación de las xilanasas son, pH entre 4 y 9,

temperatura entre 40 y 75 °C y tiempo de reacción entre 15 min y 2 h (Beg et al. 2001;Tolan and Thibault 2000).

1.2 OBJETIVOS

En esta tesis se pretende realizar el estudio de la aplicación de enzimas en el blanqueo de pastas madereras y no madereras. Se han estudiado dos materias primas diferentes; el lino, por la alta calidad de sus fibras, y el eucalipto, por su interés estratégico. En la Fig. 1-9 se muestra el esquema de la tesis.

Estudio del sistema lacasa mediador en pasta de lino

En primer lugar se estudia el equipo piloto de blanqueo con ozono que se dispone en el laboratorio. Se mejora su funcionamiento para la realización de blanqueos de pasta. Se realiza el estudio comparativo de un blanqueo de pasta de lino, químico con ozono, que ya se utiliza industrialmente, con un blanqueo bioquímico con el sistema lacasa mediador, todavía en fase experimental.

La segunda parte de la tesis se dedica al estudio del sistema lacasa mediador en pasta de lino: la influencia de la adición de oxígeno y el tiempo en las propiedades de las pastas y la optimización de las variables de proceso del sistema enzimático en diversas secuencias de bioblanqueo. Así como también, se estudian las propiedades de los efluentes del proceso.

Aplicación de xilanasas en pasta de eucalipto

En la tercera parte de la tesis se evalúa la aplicación industrial, en el blanqueo de pasta de eucalipto, de una etapa de tratamiento enzimático con xilanasas en la línea de blanqueo de la fábrica de pasta y papel de Jacareí de Votoratim Celulose e Papel (Brasil).

En cuanto a los beneficios obtenidos en esta tesis, éstos repercutirán, en primer lugar, en el sector de fabricantes de pasta de papel para papeles especiales y de alto valor añadido, para la obtención de pastas con procesos de blanqueo menos contaminantes y más respetuosos con el medio ambiente. También repercutirán en las empresas fabricantes de equipos de ozonización y en las empresas fabricantes y suministradoras de enzimas del tipo lacasas, xilanasas y de los mediadores.

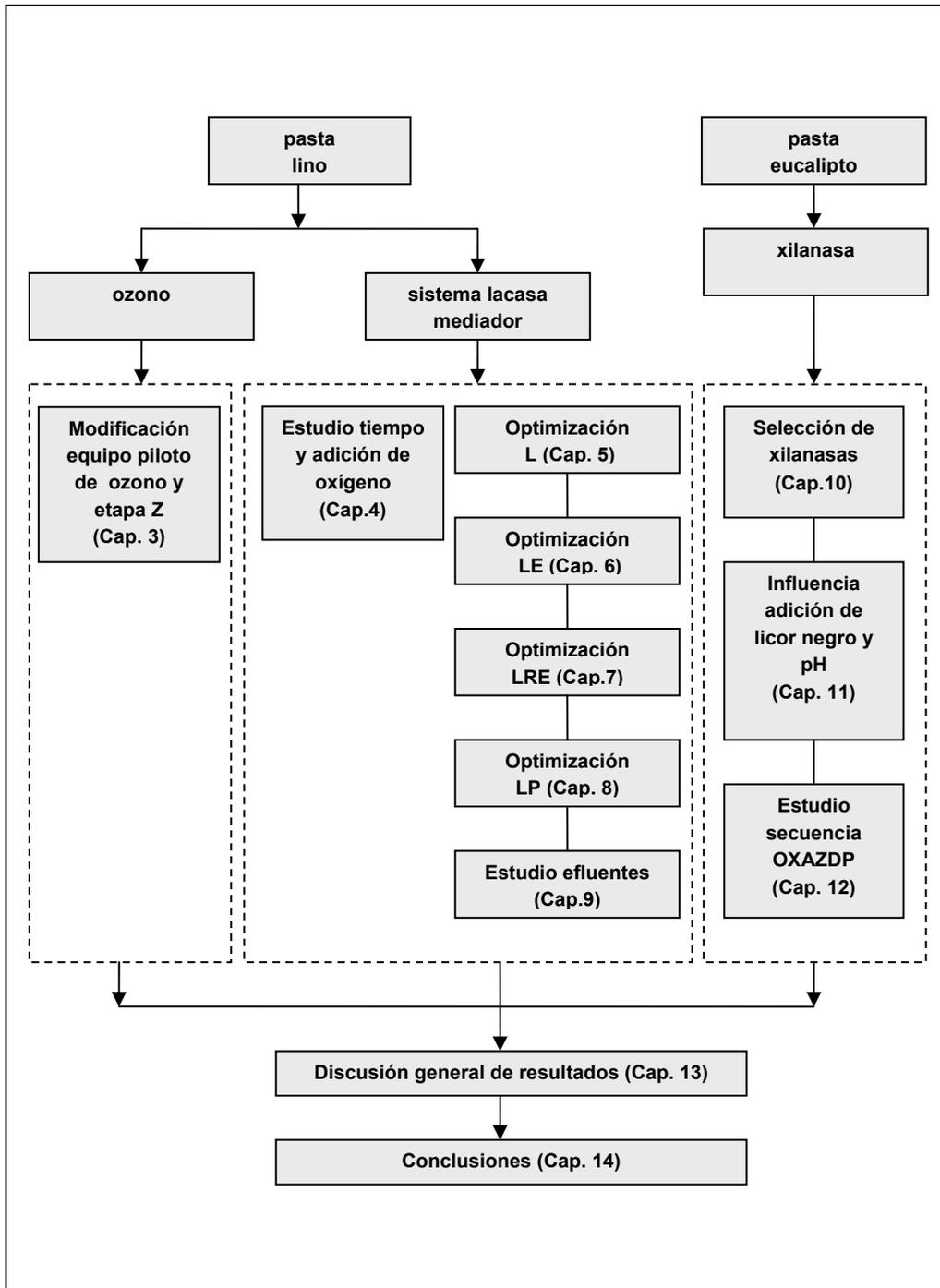


Fig. 1-9. Esquema general de la tesis doctoral.

1.2.1 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS SECUENCIAS QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

La tecnología para la implantación del ozono en un proceso industrial es mucho más compleja que la del sistema lacasa-mediador. Aunque en este último caso todavía existen algunos inconvenientes como puede ser el coste de las enzimas y los mediadores y la potencial toxicidad asociada a algunos mediadores, de manera que se requieren estudios de optimización de procesos y de evaluación de la posible contaminación de efluentes.

Este estudio se centra en el desarrollo de secuencias TCF para blanquear pasta de lino, por un lado con agentes químicos y por otro, incluyendo la aplicación del sistema lacasa mediador. El objetivo del trabajo es el estudio comparativo de dos tipos de blanqueo TCF sobre pasta de lino, uno de ellos utilizando reactivos químicos (ozono) y el otro bioquímico (lacasa). Se pretende realizar una comparación de las propiedades de las pastas y los efluentes obtenidos.

1.2.2 ESTUDIO DE SECUENCIAS DE BIOBLANQUEO CON EL SISTEMA LACASA MEDIADOR

Se realiza un estudio cinético del blanqueo con el sistema lacasa mediador en las propiedades de la pasta, índice kappa, blancura y coordenadas cromáticas, a tiempos largos de tratamiento a presión atmosférica. Así como un estudio de la degradación de carbohidratos a partir de la medida de la viscosidad. También se estudia la influencia de la adición de oxígeno y de la concentración de oxígeno disuelto en el medio durante el tratamiento en las propiedades de las pastas y los efluentes de proceso.

Por otro lado, se pretende determinar la influencia de las variables de proceso del sistema lacasa mediador (etapa L) en las propiedades de las pastas y los efluentes después de cada una de las etapas de las secuencias de blanqueo LE, LP, LRE y LRP. Para ello se realiza un plan estadístico secuencial de cuatro variables (dosis de lacasa, dosis de mediador, tiempo de actuación y presión de oxígeno en el reactor) basado en un diseño factorial.

La caracterización de los efluentes del sistema lacasa mediador es relevante debido a los problemas de contaminación asociados a los efluentes industriales de blanqueo y también debido a la posibilidad de cierre de circuitos de blanqueo que ofrecen las secuencias TCF. No se han encontrado estudios en la bibliografía que describan las propiedades de estos efluentes, por lo que el estudio es novedoso.

1.2.3 ESTUDIO DE LA APLICACIÓN DE XILANASAS

El objetivo de este proyecto es la aplicación de una etapa de tratamiento enzimático con xilanasas en la línea de blanqueo de pasta de la unidad de Jacareí de Votoratim Celulose e Papel (Brasil). En primer lugar se identifica el punto de posible aplicación del tratamiento con xilanasas en la secuencia de blanqueo. Posteriormente se pretende determinar qué enzima, entre las nueve xilanasas comerciales de las que se dispone, es la más efectiva a una temperatura y pH próximos a los del punto de aplicación. Una vez seleccionadas las enzimas, se estudia la influencia del pH y de la presencia de licor negro en la efectividad de los biotratamientos.

Finalmente se realiza el estudio de la influencia del tratamiento enzimático, a pH 9,5, temperatura de 80 °C, tiempo de retención de 60 min y con una cierta cantidad de licor negro, después de cada etapa de blanqueo en la secuencia industrial OXAZDP. Así como también, el posible ahorro de reactivo dióxido de cloro en la etapa D que proporciona la realización de un tratamiento enzimático. Las condiciones de cada una de las etapas de blanqueo de la secuencia son las que se usan en la línea de fibras B de la empresa. Se realiza el refino de las pastas obtenidas al final de la secuencia y se estudia la influencia de la etapa enzimática en las propiedades físicas de los papeles obtenidos a partir de estas pastas.

1.3 BIBLIOGRAFÍA

Abramovitz, J. and Matton, A. (1999) *Paper cuts: recovering the paper landscape*. World Watch Paper.

Aleksandrova, G., Medvedeva, S., Sinitsyn, A. and Okunev, O. (2000) Changes in the structural components of hardwood kraft pulp in the course of biobleaching by xylanases. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* 36, 287-292.

Annergren, G.E. (1996) Pulp bleaching. Principles and practice. Chapter VII-3: Strength properties and characteristics of bleached chemical and (chemi) mechanical pulps. ed. Dence and Reeve pp. 717-748. Tappi Press.

Atchinson, J.E. (1998) Update on global use of non-wood plant fibers and some prospects for their greater use in the United States. pp. 1-3.

Bajpai, P. (1999) Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology Progress* 15, 147-157.

Barascud, M.C., Jacquart, J.C., Nivelon, S. and Pichon, M. (1995) Objectif zero rejet. *Revue ATIP* 49, 88-92.

Beg,Q.K., Kapoor,M., Mahajan,L. and Hoondal,G.S. (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology Biotechnology* 56, 326-338.

Bourbonnais,R. and Paice,M. (1995) Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi Journal* 5, 199-204.

Bourbonnais,R., Paice,M.G., Freiermuth,B., Bodie,E. and Borneman,S. (1997) Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4627-4632.

Buchert,J., Teleman,A., Harjunpaa,V., Tenkanen,M., Viikari,L. and Vuorinen,T. (1995) Effect of cooking and bleaching on the structure of xylan conventional pine kraft pulp. *Tappi Journal* 78, 125-130.

Buchert,J., Tenkanen,M., Kantelinen,A. and Viikari,L. (1994) Application of xylanases in the pulp and paper industry. *Bioresource Technology* 50, 65-72.

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

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

Camarero,S., Ibarra,D., Martínez,M.J., Romero,J., Gutiérrez,A. and del Río,J.C. (2007) Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 2171.

Cates,D.H., Eggert,C., Ynag,J.L. and Eriksson,K.-E.L. (1995) Comparison of effluents from TCF and ECF bleaching of kraft pulps. *Tappi Journal* 78, 93-98.

Chakar,F.S. and Ragauskas,A. (2000a) The kismet of residual lignins during LMS delignification of high-kappa kraft pulps. *Holzforschung* 54, 647-653.

Chakar,F.S. and Ragauskas,A.J. (2000b) The 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, 169-184.

Clarke,J.H., Rixon,J.E., Ciruela,A. and Gilbert,H.J. (1997) Family-10 and Family-11 xylanases differ in their capacity to enhance the bleachability of hardwood and softwood paper pulps. *Applied Microbiology Biotechnology* 48, 177-183.

Crestini,C. and Argyropoulos,D.S. (2001) On the role of 1-hydroxybenzotriazole as mediator in laccase oxidation of residual kraft lignin. *ACS Symposium Series* 785, 373-390.

Croon,I. (1995) After recycling: What's next? *Papermaker* 25-26.

- Da Silva, M.R., de Brito, A.C.H. and Colodette, J.L. (1997) A seqüencia de branqueamento ideal para um processo em circuito fechado. *O Papel* 3, 35-45.
- de Jong, E., van Roekel, G.J., Snijder, M.H.B. and Zhang, Y. (1999) Towards industrial applications of bast fibre pulps. *Pulp and Paper Canada* 100, 19-22.
- del Río, J.C., Gutiérrez, A., Rodríguez, I.M., Ibarra, D. and Martínez, 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, 39-46.
- del Río, J.C., Gutiérrez, S., Camarero, S. and Martínez, A.T. (2001) Lignin and hemicellulose analysis during manufacturing of high-quality flax and kenaf alkaline pulps. *11th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry* pp. 523-526.
- Dence, C. and Reeve, D. (1996) *Pulp bleaching. Principles and practice*. Atlanta: Tappi Press.
- Elegir, G., Sykes, M. and Jeffries, W. (1995) Differential and synergistic action of *Streptomyces* endoxylanases in prebleaching of kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 954-959.
- Elsander, A., Ek, M. and Gellersted, G. (2000) Oxalic acid formation during ECF and TCF bleaching of kraft pulp. *Tappi Journal* 82, 73-77.
- Eriksson, K.-E. (2000) An overview of biotechnology in the pulp and paper industry. *Pulping/Process and Product Quality Conference*.
- Fabbrini, M., Galli, C. and Gentili, P. (2002) Radical or electron-transfer mechanism of oxidation with some laccase/mediator systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 18, 169-171.
- Fillat, A., Colom, J. and Vidal, T. (2007) Exploring enzyme stability during delignification of flax pulp by laccase and natural mediators. *10th International Congress on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Integrating biology with processes*. pp. 86.
- Freudenreich, J., Amann, M., Fritz-Langhals, E. and Stohrer, J. (1998) Understanding the lignozym-process. *International Pulp Bleaching Conference* pp. 71-76.
- García Hortal, J.A. (2007) *Fibras papeleras*. Barcelona: Edicions UPC.
- García, O. (2003) Utilización de fibras de lino en la fabricación de papel. Nuevas secuencias de blanqueo y aplicación a sistemas enzimáticos. Terrassa, España: Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera, Universidad Politécnica de Cataluña.
- 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, 513-519.

Garg,A.P., McCarthy,A.J. and Roberts,J.C. (1996) Biobleaching effect of *Streptomyces thermoviolaceus* xylanase preparations on birchwood kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 18, 261-267.

Gellersted,G. and Li,J. (1996) An HPLC method for the quantitative determination of hexenuronic acid groups in chemical pulps. *Carbohydrate Research* 294, 41-51.

Giovanozzi-Sermanni,G. (1997) Enzymatic pretreatments of nonwoody plants for pulp and paper production. *Tappi Journal* 6, 139-144.

Grant,R. (1992) Enzymes reveal pelnty more potential. *Pulp and Paper International* 34, 75-76.

Herpöel,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, 67-71.

Ibarra,D., Chávez,M.I., Rencoret,J., del Río,J.C., Gutiérrez,A., Romero,J., Camarero,S., Martínez,M.J., Jiménez-Barbero,J. and Martínez,A.T. (2007a) Lignin modification during *Eucalyptus globulus* kraft pulping followed by totally chlorine-free bleaching: a two-dimensional nuclear magnetic resonance, fourier transform infrared, and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55, 3477-3490.

Ibarra,D. (2006) Tecnologías limpias para el blanqueo libre de cloro de pastas de papel: modificación enzimática de la lignina residual. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.

Ibarra,D., Camarero,S., Romero,J., Martínez,M.J. and Martínez,A.T. (2006) Integrating laccase - mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine-free bleaching of eucalypt kraft pulp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81, 1159-1165.

Ibarra,D., Chavez,M.I., Rencoret,J., del Río,J.C., Gutiérrez,A., Romero,J., Camarero,S., Martinez,M.J., Jiménez-Barbero,J. and Martínez,A.T. (2007b) Structural modification of eucalypt pulp lignin in a totally chlorine-free bleaching sequence including a laccase-mediator stage. *Holzforschung* 61, 634-646.

Jakson,M. (2000) The process of technological innovation as it applies to non wood fiber utilization in pulp and paper. *Pulping/Process and Product Quality Conference, Tappi (CD)*.

Jean,P., Hamilton,J. and Senior,D.J. (1994) Mill trial experiences with xylanase: AOX and chemical reductions. *Pulp & Paper Canada* 95, 126-128.

Jeffries,T.W., Davis,M., Rosin,B. and Landucci,L. (1999) Mechanisms for kappa reduction and color removal by xylanases. *7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* pp. 41-43.

- Jeyasingam, J.T. (1998) Practical experience on paper making with non wood fibers. *Pulping Conference, Tappi Proceedings* pp. 767-774.
- Jeyasingam, J.T. (2000) Overview of selected non wood fibers for paper making. *Pulping/Process and Product Quality Conference, Tappi (CD)*.
- Jiang, Z.-H. and Van Lierop, B. (2000) Hexenuronic acids groups in pulping and bleaching chemistry. *Tappi Journal* 83, 167-175.
- Johansson, N.G. and Clark, F.M. (1995) Developing technologies open door to future closure of bleach plant. *Pulp and Paper* 69, 71-75.
- Kirk, K. and Cullen, D. (1998) Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi. In *Environmental friendly technologies for pulp and paper industry*. pp. 273-307. Wiley, New York.
- Lachenal, D. and Nguyen, K.L. (1994) TCF bleaching-which sequence to choose? *Revue ATIP* 2, 49-56.
- Li, K., Xu, F. and Eriksson, K.-E. (1999) Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2654-2660.
- Manji, A.H. (2005a) Utilização prolongada da enzima xilanase para melhoramento do branqueamento de polpa kraft de conífera. *O Papel* 66, 94-101.
- Manji, A. (2005b) Xylanase lowers chemical load, boosts brightness of kraft pulp. *Pulp and Paper* 79, 44-49.
- Martínez, A.T., Camarero, S. and Ruiz-Dueñas, F.J. (2000) Studies on microbial and enzymatic applications in paper pulp manufacturing from non-woody plants based on white-rot fungi from the genus *Pleurotus*. *Pulping/Process and Product Quality Conference*.
- Mayer, A.M. and Staples, R.C. (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60, 551-565.
- McGovern, J.N., Coffelt, A.M., Hurter, N.K., Ahuja, N.K. and Weidemann, A. (1987) *Pulp and paper manufacture. Vol. 3. Secondary fibers and non-wood pulping. IX: Other fibers*. Joint Textbook Committee of the paper Industry.
- Moore, G. (1996) *Nonwood fibre applications in papermaking. A literature review*. Surrey, UK.
- Nelson, P., Chin, C., Viikari, L. and Tenkanen, M. (1998) The use of a laccase mediator stage in bleaching eucalypt kraft pulps. *Appita Journal* 51, 451-455.

Ninawe,S. and Kuhad,R.C. (2006) Bleaching of wheat straw-rich soda pulp with xylanase from a thermoalkalophilic *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technology* 97, 2291-2295.

Paice,M., Bourbonnais,R., Renaud,S. and Labonte,S. (2002) *Pilot plant bleaching trials with laccase and mediator*. Elsevier.

Paice,M.G., Bourbonnais,R., Reid,I.D., Archibald,F.S. and Jurasek,L. (1995) Oxidative bleaching enzymes: a review. *Journal of Pulp and Paper Science* 21, 280-284.

Pande,H. (1998) Non-wood fibre and global fibre supply. FAO - Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.

Parham,R.A. (1983) Pulp and Paper Manufacture. Vol. 1. Properties of fibrous raw materials and their preparation for pulping. VI Ultrastructure and Chemistry. ed. Kocurek,M.J. and Stevens,C.F.B. pp. 35-45.

Pérez,J., Muñoz-Dorado,J., de la Rubia,T. and Martínez,J. (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5, 53-63.

Popovici,C., Messier,M., Thibault,L. and Charron,D. (2004) Multiples avantages du xylanase dans une usine nexfor papiers frader de pâte fraft de feuillus, à Thurso, Québec. *Pulp and Paper Canada* 105, 72-75.

Potthast,A., Rosenau,T. and Fischer,K. (2001) Oxidation of benzyl alcohols by the laccase-mediator system (LMS) - A comprehensive kinetic description. *Holzforschung* 55, 47-56.

Robles,Y.A.M., Bem,E.C., Turner,O. and Ishii,E. (2006) Avaliação em escala laboratorial da inserção da tecnologia enzimática na sequência de branqueamento ECF. 39º *Pulp and Paper International Congress and Exhibition ABTCP-TAPPI*.

Roncero,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. Terrassa, España: Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera, Universidad Politécnica de Cataluña.

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

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

Roncero,M.B., Torres,A.L., Colom,J. and Vidal,T. (2000) Effects of xylanase treatment on fibre morphology in totally chlorine free bleaching (TCF) of Eucalyptus pulp. *Process Biochemistry* 36, 45-50.

Rydholm,S.A. (1967) *Pulping processes. Part. 1. Wood. Fiber Morphology.* Interscience Publishers, John Wiley & Sons.

Sealey,J. and Ragauskas,A.J. (1998) Investigation of laccase/N-hydroxybenzotriazole delignification of Kraft pulp. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 18, 403-416.

Senior,D.J. and Hamilton,J. (1992) Use of Xylanases to Decrease the Formation of Aox in Kraft Pulp Bleaching. *Journal of Pulp and Paper Science* 18, J165-J169.

Sevastyanova,O., Li,J. and Gellersted,G. (2006) Influence of various oxidizable structures on the brightness stability of fully bleached chemical pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 21, 49-53.

Siles,F.J., Torres,A.L., Colom,J. and Vidal,T. (1996) Blanqueo biológico de pasta fraft de frondosas. *Afinidad* 53, 92-102.

Sjöström,E. (1993) *Wood chemistry. Fundamentals and Applications.* San Diego: Academic Press Inc.

Teixeira Duarte,M.C., Cristina da Silva,E., Menezes de,B.G., Nunes Ponezi,A., Princi Portugal,E., Roberto Vicente,J. and Davanzo,E. (2003) Xylan-hydrolyzing enzyme system from *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 and its effects on *Eucalyptus grandis* kraft pulp for.. *Bioresource Technology* 88, 9-15.

Teleman,A., Harjunpaa,V., Tenkanen,M., Buchert,J., Hausalo,T., Drakenberg,T. and Vuorinen,T. (1995) Characterization of 4-deoxy-beta-L-theo-hex-4-enopyranosyluronic acid attached to xylan in pine kraft pulp and pulping liquor by H-1 and C-13 NMR-spectroscopy. *Carbohydrate Research* 272, 55-71.

Tolan,J. and Thibault, L. (2000) Mill scale implementation of enzymes in pulp bleaching. *2000 TAPPI Pulping Process and Product Quality Conference (CD)*.

Tolan,J. and Thibault,L. (1997) Decreasing ECF bleaching costs with enzymes in a mill with oxygen delignification. *Pulp & Paper Canada* 98, 147-150.

Tolan,J.S. and Collins,J. (2004) Use of xylanase in the production of bleached, unrefined pulp at Marathon Pulp Inc. *Pulp and Paper Canada* 105, 44-46.

Torres,A.L., Roncero,M.B., Colom,J., Pastor,F.I.J., Blanco,A. and Vidal,T. (2000) Effect of a novel enzyme on fibre morphology during ECF bleaching of oxygen delignified *Eucalyptus* kraft pulps. *Bioresource Technology* 74, 135-140.

Valls,C., Pastor,F.I.J. and Roncero,B. (2005) Elimination of hexenuronic acid by xilanases in ECF bleaching of indistrial *Eucalyptus* kraft pulps. *2005 International Pulp Bleaching Conference* ed. STFi and SPCI pp. 230-232.

Van der Brught,T., Tolan,J. and Thibault,L. (2002) US Kraft mills lead in xylanase implementation. *2002 TAPPI Fall Technical Conference and Trade Fair*.

van Roekel,G.J., Snijder,M.H.B. and Zhang,Y. (1999) Towards industrial applications of bast fibre pulps. *Pulp and Paper Canada* 100, 19-22.

Vicuña,R., Escobar,F., Osses,M. and Jara,A. (1997) Bleaching of eucalyptus Kraft pulp with commercial xylanases. *Biotechnology Letters* 19, 575-578.

Viikari,L. (2000) Enzymes in the pulp and paper industry. *TAPPI Pulping Process and product Quality Conference.CD*.

Viikari,L., Ranua,M., Sundquist,J. and Linko,M. (1986) Bleaching with enzymes. *3 th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* pp. 67-69.

Vuorinen,T., Teleman,A., Fagerström,P., Buchert,J. and Tenkanen,M. (1996) Selective hydrolysis of hexuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps. *International Pulp Bleaching Conference* pp. 43-51.

Wong,K., De Jong,E., Saddler,J.N. and Allison,R.W. (1997b) Mechanisms of xylanase aided bleaching of kraft pulp. Part I: process parameters. *Appita Journal* 50, 415-422.

Wong,K., De Jong,E., Saddler,J.N. and Allison,R.W. (1997a) Mechanisms of xylanase aided bleaching of kraft pulp. Part 2: target substrates. *Appita Journal* 50, 509-518.

Wong,K.K.Y., Anderson,R. and Kibblewhite,P. (1999) Effects of the laccase-mediator system on the handsheet properties of two high kappa kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 125-131.

Yee,E. and Tolan,J. (1997) Three years experience running enzymes continuously to enhance bleaching at Weyerhaeuser Prince Albert. *Pulp and Paper Canada* 98, 42-49.