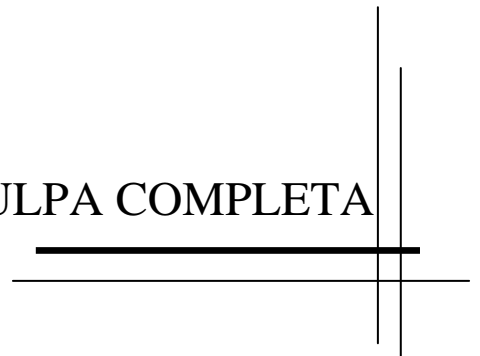


## **PARTE A**

### **TRATAMIENTO DE PULPA COMPLETA**



En esta Parte A del Capítulo 5 se estudia el efecto del sistema *Trametes hirsuta lacasa-HBT* sobre una pulpa completa kraft no blanqueada de fibra larga reciclada. Se realiza un rastreo de las condiciones de trabajo en donde se evalúan distintas cargas de enzima y mediador sobre las propiedades papeleras. A modo de comparación se estudia también el efecto de este sistema sobre pulpas con mayor drenabilidad. Estos resultados son preliminares a lo realizado en la Parte B de este capítulo.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1. Preparación de la pulpa. Pulpa completa (Pulpa A-300).

Se partió de una pulpa virgen kraft no blanqueada de coníferas (número *kappa*: 85,0) en forma de planchas secas. Ésta se humectó durante 24h y se desintegró en un *pulper Black Clawson* de 150 L de capacidad al 1,2 % de consistencia de pulpa durante 20 min. La drenabilidad fue 810 mL CSF (mL *Canadian Standard Freeness*).

Se refinó al 3% de consistencia en refinador de disco *Sprout Waldron* y la pulpa obtenida se secó en estufa a 120°C durante 20 min y en forma desintegrada (sin restricción a la compresión). Luego se desintegró nuevamente en el *pulper*. La drenabilidad final fue 280 mL CSF.

Se realizó una clasificación por longitud de fibra cuantitativa en clasificador *BauerMcNett* (tiempo 15 min - Norma SCAN). Los resultados se muestran en la **Tabla 5.2**. El alto contenido de fracciones medias (30/50 y 50/100) y finos (100/200 y -200) indica que la pulpa ha sido refinada.

**Tabla 5.2.** Clasificación por longitud de fibra cuantitativa en clasificador *BauerMcNett*

Mallas	Fracción másica (%)
R30	56,2
30/50	15,5
50/100	10,7
100/200	5,7
-200	11,8

### **5.2.1.1. Acondicionamiento de la pulpa antes de los tratamientos enzimáticos**

La pulpa refinada se llevó a pH 5,0 (pH óptimo de trabajo de la enzima) colocándola en agua destilada al 4 % de consistencia y agregando HCl 0,1N hasta alcanzar ese pH. Se mantuvo en esas condiciones durante 45 min, se espesó por centrifugación, se dispersó y se le determinó sequedad. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

### **5.2.2. Actividad lacasa**

La lacasa utilizada fue provista por el Instituto de Investigación VTT, Espoo, Finlandia. Sus características se detallan en el Capítulo 3.

En esta serie de experiencias se tomaron como condiciones de trabajo las informadas por este Instituto como de máxima actividad de la enzima:

- Temperatura óptima: 40°C
- pH: 5,0 (utilizando ácido acético)
- Actividad enzimática (sustrato ABTS): 5250 nkat/ mL extracto enzimático

### **5.2.3. Preparación del HBT**

Debido a que la solubilidad del HBT (1-hidroxibenzotriazol, *ICN Biomedical*) es baja (5 g/L a 30°C), antes de cada tratamiento enzimático se preparó la solución de HBT disolviéndolo en agua destilada a 40°C. El pH de la solución fue 3,0-3,2 el cual se ajustó a 5,0 con el agregado de aproximadamente 10 mL de NaOH 5 g/L.

#### **5.2.4. Selección de la carga de enzima y mediador**

Se eligió la carga de enzima y la carga de mediador teniendo en cuenta referencias bibliográficas en las que se aplican lacasas sobre pulpas no blanqueadas.

Sobre pulpas termomecánicas de alto contenido de lignina (27%), Grönqvist y col. (2003) aplicaron lacasas aisladas del hongo *Trametes hirsuta* con distinta actividad enzimática (lacasa<sub>1</sub>: 7600 nkat/ml y lacasa<sub>2</sub>: 4400 nkat/ml medidas sobre sustrato ABTS). Para los tratamientos utilizaron una carga de 1000 nkat/g pulpa seca.

Sobre pulpas no blanqueadas kraft de coníferas (número *kappa* 50) Haynes (1998) utilizó una carga de enzima correspondiente a una carga de proteínas de 0,96% sobre pulpa seca y 2% de HBT.

Por otro lado, Nelson y col. (1998) sobre una pulpa de latifoliada de *kappa* 10,5 utilizó cargas de enzima de 200 nkat/g pulpa seca.

Poppius-Levin y col. (1999) aplicaron el sistema lacasa-HBT con una carga de 670 nkat/g pulpa (medido sobre sustrato ABTS) sobre pulpas de coníferas de número *kappa* 8,6 y 24,7. La carga de HBT fue de 1% y 3% HBT respectivamente.

Teniendo en cuenta que en este trabajo se utilizó una pulpa de conífera con alto contenido de lignina (número *kappa* 85,0 o aproximadamente 12-13 % de lignina Klason) se optó por utilizar cargas de enzima entre las utilizadas por Nelson y col. (1998) y las utilizadas por Grönqvist y col. (2003).

Inicialmente en esta Tesis se evaluaron dos niveles de carga de enzima: 202 y 610 nkat/g pulpa seca teniendo en cuenta la actividad enzimática informada por el Instituto VTT.

Con respecto a la carga de mediador se optó por evaluar el efecto de una carga menor y una mayor a las utilizadas por otros autores. Estos fueron: 1,16 % y 3,5% de HBT sobre pulpa seca.

### 5.2.5. Diseño experimental

Para evaluar el efecto de la carga de enzima y de mediador sobre las propiedades papeleras se llevó a cabo un diseño experimental unifactorial como se detalla en la **Tabla 5.3**. En esta tabla también se muestra cómo se identificaron los distintos tratamientos del diseño experimental.

**Tabla 5.3.** Diseño experimental unifactorial.

**Factor:** Tratamiento enzimático.

Niveles del factor	Carga enzima (nkat/g pulpa)	Carga Mediador (%)	Identificación
0	0	0	L <sub>0</sub> H <sub>0</sub>
1	202	0	L <sub>1</sub>
2	202	1,16	L <sub>1</sub> H <sub>1</sub>
3	202	3,5	L <sub>1</sub> H <sub>3</sub>
4	610	0	L <sub>3</sub>
5	610	1,16	L <sub>3</sub> H <sub>1</sub>
6	610	3,5	L <sub>3</sub> H <sub>3</sub>

<sup>a</sup>En base a la actividad determinada sobre sustrato ABTS e informada por el Instituto VTT, Finlandia.

En la **Tabla 5.4** se muestran las variables de respuesta estudiadas.

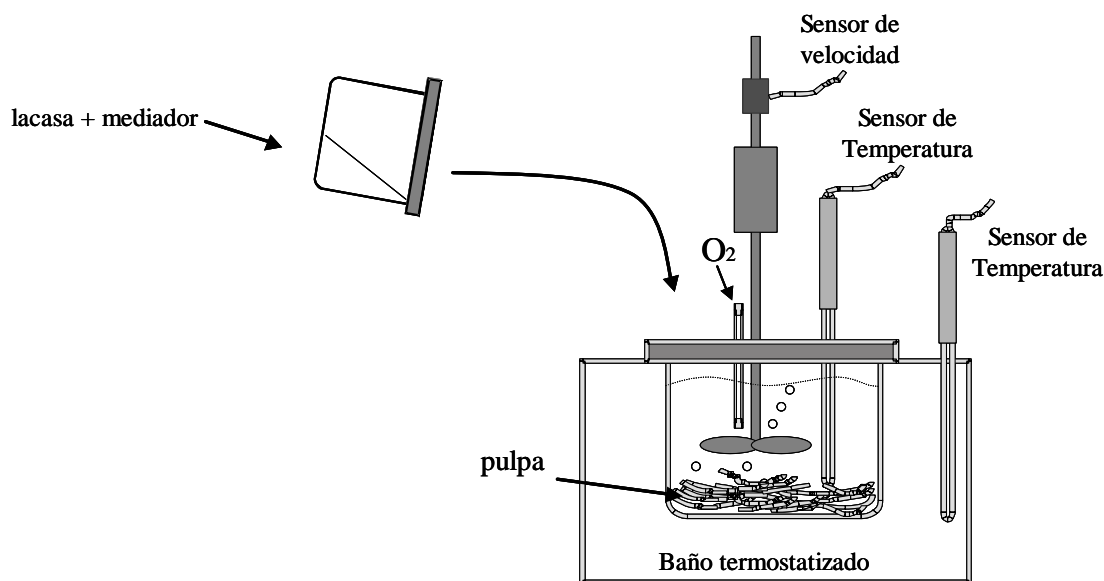
**Tabla 5.4.** Variables de respuesta estudiadas sobre la pulpa completa, los finos y las hojas de ensayo formadas con la pulpa completa.

En la pulpa completa	Drenabilidad
	Valor de retención de agua (WRV)
En los finos	Número <i>kappa</i> (sobre determinadas pulpas)
	Grupos ácidos totales (sobre determinadas pulpas)
	Coficiente de absorción de luz (k) <sub>(a 457 nm)</sub>
En las hojas de ensayo de pulpa completa	Número <i>kappa</i>
	Resistencia a la tracción
	Resistencia al aplastamiento de onda (CMT)
	Densidad aparente
	Nitrógeno total Kjeldahl (sobre determinadas pulpas)

Las metodologías utilizadas para determinar estas propiedades y para la formación de las hojas de ensayo de gramaje 130 g/m<sup>2</sup> se detallan en el Capítulo 3 de esta Tesis.

### 5.2.6. Tratamientos enzimáticos

Para llevar a cabo los tratamientos enzimáticos se utilizó un reactor de vidrio de 3L de capacidad, con agitación a una velocidad de 1500 rpm y con ingreso continuo de oxígeno en la zona de agitación de manera de asegurar la dispersión de las burbujas (**Figura 5.10**).



**Figura 5.10.** Equipo utilizado para los tratamientos enzimáticos. Reactor de 3 L con agitación controlada y burbujeo de oxígeno. Sobre la pulpa termostatizada se agregó la mezcla de lacasa-HBT en dos etapas: al inicio y a la mitad del tiempo total de tratamiento.

Debido a que la actividad enzimática puede disminuir durante el transcurso del tratamiento, se optó por agregar la enzima y el mediador en dos etapas, al principio y a la mitad del tratamiento.

El tratamiento se llevó a cabo al 1,7 % de consistencia final de la pulpa, pH=5,0 y T=40°C durante 3 h. Inicialmente se colocó en el reactor 1500 mL agua destilada y se termostató a 40°C. Se le agregaron 100 g de pulpa húmeda (35 g pulpa seca) y se agitó durante 5 min. Para mantener ese pH se agregó 15 mL de ácido acético 0,2 N (concentración final 1,5 mM).

En un vaso de precipitados se disolvió la mitad de la carga total de HBT, se llevó a pH 5,0 con el agregado de NaOH 5,0 g/L y se termostató a 40°C. A esta solución se le agregó la mitad de la carga total de enzima, y la solución resultante (aprox. 130 mL) se agregó rápidamente al reactor conteniendo la pulpa para iniciar el tratamiento. La consistencia en esta etapa fue de 2,0 %.

Pasada la mitad del tiempo previsto (1,5 h) se agregó el resto de HBT y de enzima en una solución ajustada a 40°C y a pH 5,0 (130 mL más). La consistencia final de la pulpa fue de 1,7 %.

Al final del tratamiento (3 h), se verificó que la conductividad sea menor a 450  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y que el pH esté en el rango 5,0-5,2. Se filtró y se recirculó el filtrado sobre la mata de fibras. Finalmente se espesó la pulpa por centrifugación.

Para detener la actividad enzimática se colocó la pulpa nuevamente en agua destilada y se llevó a pH 8,0 con una solución de NaOH 1g/L. Se dejó en esas condiciones durante 30 min, se lavó varias veces consecutivas con agua destilada hasta pH 6,0-6,5, se centrifugó y se almacenó a 4°C.

El tratamiento control se realizó utilizando el mismo procedimiento que para el tratamiento enzimático pero sin el agregado de enzima ni mediador. Finalizado el tratamiento control se colocó en solución de NaOH pH 8,0 durante 30 minutos y bajo agitación.

A continuación se resumen las condiciones generales de los tratamientos:

- Consistencia final de la pulpa = 1,7% (g pulpa seca / 100 g suspensión)
- Temperatura =  $40 \pm 1^\circ\text{C}$
- Duración del tratamiento = 3 horas
- pH 5,0 (ajustado con ácido acético)
- Burbujeo continuo de oxígeno.
- Carga total de mediador HBT y de enzima: según diseño experimental. Agregados en dos etapas.
- Desactivación final de la enzima: NaOH pH 8,0 y agitación durante 30 min y luego agua destilada hasta pH 6,0-6,5.

### **5.2.7. Obtención de la fracción de finos**

Veinte gramos secos de la pulpa tratada enzimáticamente y la pulpa control se clasificaron en porciones de diez gramos en equipo *Bauer McNett* usando las mallas 30, 50 y 100. Además, se recolectó la totalidad del volumen conteniendo la fracción -100 (aproximadamente 300 L) que según la clasificación cuantitativa mostrada en la **Tabla 5.2** representa el 17,5% del material inicial (luego de dos clasificaciones en los 150 L habrá 3,5 g secos de finos).

Para concentrar esta última fracción, se agregó HCl hasta pH 2,0 para lograr la floculación y precipitación. Se dejó en estas condiciones durante 12 h. Luego, el sobrenadante se extrajo lentamente por succión hasta que se obtuvo un volumen final de 800 mL.

La suspensión se centrifugó durante 10 min a 1750 g (en volúmenes de 200 mL) y nuevamente se extrajo el sobrenadante por succión.

A la suspensión final obtenida se le realizaron dos lavados ácidos consecutivos agregando 700 mL de HCl 0,1N (conductividad aproximada de 36 mS/cm), dejándola en esas condiciones durante 45 minutos, centrifugando y succionando el sobrenadante. Luego se lavó agregando agua destilada, centrifugando y succionando el sobrenadante hasta conductividad menor a 390  $\mu$ S. Finalmente se llevó la suspensión a 450 mL y se ajustó la conductividad a 390  $\mu$ S con HCl. La suspensión se almacenó a 4°C.

De los aproximadamente 3,5 g secos de finos, se recuperaron 2,5 g secos (70% del material).

Sobre esta suspensión se determinaron los grupos ácidos totales y el número *kappa*.

#### **5.2.8. Grupos ácidos totales en finos por titulación conductimétrica**

Para la determinación de grupos ácidos totales en los finos se utilizó el método propuesto por Katz y col. (1984) con la modificación propuesta por Lloyd y Horne (1993) al igual que para la pulpa completa (sección 3.1.2 del Capítulo 3).

Inicialmente se aseguró que la suspensión de finos se encuentre a una conductividad de 390  $\mu$ S por el HCl  $10^{-3}$  N presente en el medio. De esta forma, cuando se alcanza la meseta de la curva de titulación, la conductividad de la solución corresponde a NaCl  $10^{-3}$  N que es la especificada en la técnica. Se llevó a cabo la titulación conductimétrica, de la misma manera que para la determinación de grupos ácidos de las fibras celulósicas utilizando como titulante NaHCO<sub>3</sub> 0,1N.

Una vez finalizada la titulación, la suspensión de finos se llevó a un volumen de 500 mL, se agitó y se tomaron 100 mL para determinar el peso seco de finos. Para el cálculo se restó el peso

de los iones ( $\text{NaCl}$  y  $\text{NaHCO}_3$ ) presentes al final de la titulación. El resto de la suspensión se utilizó para determinar el número *kappa*.

#### **5.2.9. Número *kappa* en los finos**

La técnica estándar de determinación de número *kappa* descrita en la sección 3.3.1. del Capítulo 3 se aplicó sobre una muestra que consistió en una suspensión de finos de concentración conocida.

### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.3.1. Número *kappa* y grupos ácidos totales

##### 5.3.1.1. Pulpa completa

De acuerdo al análisis de variancia para el número *kappa* se encontró que existe diferencia significativa entre los tratamientos ( $p=0,0088$ ). La **Tabla 5.5** de comparación de medias muestra que respecto a la pulpa control ( $L_0H_0$ ), existe una disminución significativa de esta propiedad por acción de la enzima sola o por acción del SLM.

**Tabla 5.5.** Test de rangos múltiples de Duncan para el número *kappa* de la pulpa completa.

Factor: Tratamiento enzimático	Media	Grupos homogéneos <sup>1</sup>
$L_3H_3$	82,7 (s= 0,3)	X
$L_3$	82,8 (s=0,5)	X
$L_1$	83,7 (s=0,3)	XX
$L_1H_1$	83,7 (s=0,2)	XX
$L_3H_1$	83,7 (s=0,6)	XX
$L_1H_3$	83,9 (s=0,6)	X
$L_0H_0$	85,0 (s=0,1)	X

<sup>1</sup>Existe diferencia significativa al 95% entre los distintos grupos homogéneos, s: desviación estándar del ensayo realizado por duplicado.

##### 5.3.1.2. Finos

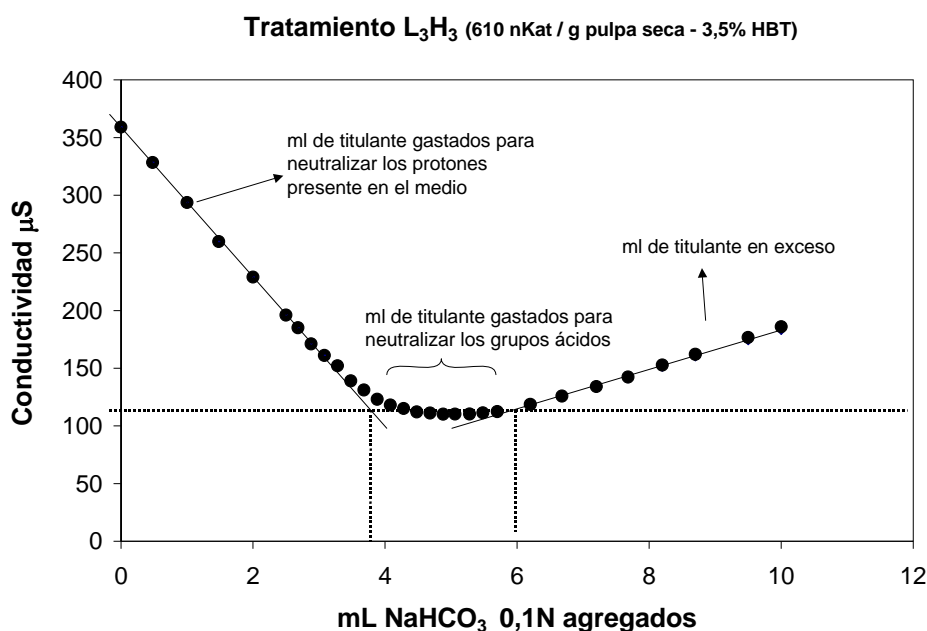
Sobre los finos (fracción -100) se determinó el N° *kappa* y el contenido de grupos ácidos totales. Los finos de la pulpa tratada con la máxima carga de enzima y mediador ( $L_3H_3$ ) mostraron un aumento en el contenido de grupos ácidos totales y una reducción significativa ( $p=0,0019$ ) del número *kappa* en relación a la pulpa referencia o control ( $L_0H_0$ ) (**Tabla 5.6**). El tratamiento con la enzima sola ( $L_3$ ) no mostró cambios en el contenido de grupos ácidos en los finos.

**Tabla 5.6.** Grupos ácidos totales y número *kappa* de los finos (fracción -100) de pulpa referencia ( $L_0H_0$ ) y de pulpas tratadas con enzima sola ( $L_3$ ) y con enzima-mediador ( $L_3H_3$ )

Tratamientos	Grupos ácidos totales en finos (µeq/g pulpa seca)	Número <i>kappa</i> en finos ( $p=0,0019$ )
$L_0H_0$ (control)	92,5	114,9 (s=0,6)
$L_3$ (enzima)	87,9	nd.
$L_3H_3$ (enzima + HBT)	106,3	103,3 (s=0,4)

s= desviación estándar del ensayo determinado por duplicado; nd: no determinado

La **Figura 5.11** muestra una de las curvas típicas de titulación conductimétrica obtenidas de la fracción -100.



**Figura 5.11.** Curva de titulación conductimétrica de la fracción -100 de la pulpa tratada con 610 nKat/g de pulpa seca de lacasa y 3,5 % de HBT ( $L_3H_3$ ). Los mL de  $NaHCO_3$  0,1 N consumidos para neutralizar los grupos ácidos de la pulpa, corresponden a los mL gastados en la zona de la meseta (conductividad 110  $\mu S$ ).

A pesar del alto contenido de lignina de la pulpa en estudio, el tratamiento enzimático produjo una leve reducción en el número *kappa* aún en presencia del mediador que amplía la acción de las enzimas a sustratos no fenólicos y en el interior de la pared.

Esta limitada delignificación puede deberse a que tanto las lacasas como el SLM reaccionaron principalmente con los finos (fracción -100; 17,5% de la pulpa) y por lo tanto, el valor del número *kappa* de la pulpa completa no se afectó considerablemente.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Wong y col. (1999). Estos autores estudiaron el efecto del SLM sobre pulpas *kraft* no blanqueadas de coníferas y encontraron una leve disminución en el número *kappa* desde 84,1 a 81,6 y desde 60,8 a 58,0 por acción del SLM.

Por otro lado, Bourbonnais y col. (1997) sobre una pulpa *kraft* (número *kappa* 10,0) de conífera aplicaron el tratamiento enzimático seguido de un tratamiento alcalino y utilizando distintos mediadores. Encontraron que con algunos mediadores, a pesar de que se liberó metanol en

el filtrado por demetilación de la lignina, no disminuyó significativamente el número *kappa*. Concluyeron que la demetilación no es suficiente para que se pueda remover la lignina.

### **5.3.2. Capacidad de absorción de agua (WRV)**

Se determinó la capacidad de absorción de agua de la fracción fibrosa (R30) luego de tratar enzimáticamente la pulpa completa y clasificarla. Respecto a la pulpa control (L<sub>0</sub>H<sub>0</sub>), no se observaron cambios significativos (p=0,4197) por acción del tratamiento con la enzima sola o por acción del sistema lacasa-mediador. La **Tabla 5.7** muestra los valores medios obtenidos.

<b>Tabla 5.7.</b> Valores medios para el WRV de la fracción fibrosa (R30).	
<b>Factor: Tratamiento enzimático</b>	<b>Media</b>
L <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	136,6 (s=1,6)
L <sub>3</sub>	134,0 (s=3,5)
L <sub>1</sub>	132,0 (s=1,1)
L <sub>1</sub> H <sub>1</sub>	136,3 (s=3,8)
L <sub>3</sub> H <sub>1</sub>	137,3 (s=3,0)
L <sub>1</sub> H <sub>3</sub>	136,3 (s=2,5)
L <sub>0</sub> H <sub>0</sub>	132,0 (s=1,0)

### **5.3.3. Drenabilidad**

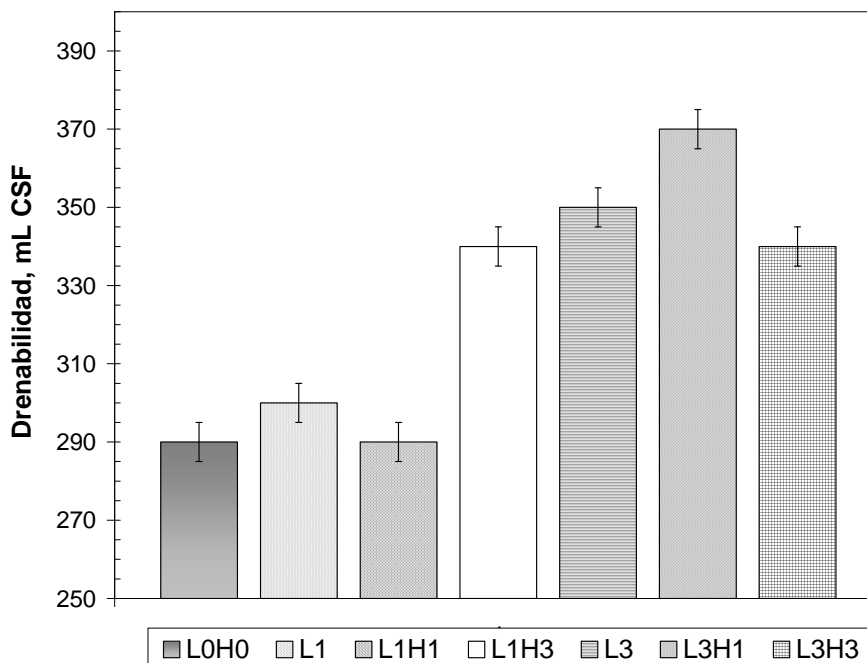
De acuerdo al análisis de variancia, los tratamientos enzimáticos modificaron significativamente (p=0,0000) la drenabilidad. La **Tabla 5.8** de comparación de medias muestra que, respecto a la pulpa control (L<sub>0</sub>H<sub>0</sub>), bajas cargas de enzima (L<sub>1</sub>) o bajas cargas de enzima-mediador (L<sub>1</sub>H<sub>1</sub>) no modificaron esta propiedad. Sin embargo, para las mayores cargas de enzima o de mediador esta propiedad fue favorecida significativamente por acción de la enzima sola o por acción del SLM.

**Tabla 5.8.** Test de rangos múltiples de Duncan para la drenabilidad.

<b>Factor: Tratamiento enzimático</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos homogéneos<sup>1</sup></b>
L <sub>0</sub> H <sub>0</sub>	290	X
L <sub>1</sub> H <sub>1</sub>	290	X
L <sub>1</sub>	300	X
L <sub>1</sub> H <sub>3</sub>	340	X
L <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	340	X
L <sub>3</sub>	350	X
L <sub>3</sub> H <sub>1</sub>	370	X

<sup>1</sup>Existe diferencia significativa al 95% entre los distintos grupos homogéneos

La **Figura 5.12** muestra estos resultados. El mayor incremento (27,6 %) lo produjo el tratamiento con la máxima carga de enzima y 1% de HBT ( $L_3H_1$ ). Para pulpas recicladas un aumento de esta magnitud en drenabilidad puede ser interesante.



**Figura 5.12.** Drenabilidad en función de los distintos tratamientos. L: lacasa; H: HBT. Las barras de error indican el +/- según la desviación estándar del ensayo realizado por duplicado.

Estudios de aplicación de otras enzimas sobre pulpas celulósicas muestran aumento en la drenabilidad. Jackson y col. (1993) encontraron que la acción de una mezcla de enzimas celulasas y hemicelulasas (Pergalase A40) sobre pulpas *kraft* de coníferas mejora la retención de finos. Adjudicaron este comportamiento a la floculación de los finos en la pulpa tratada por la enzima.

Fuentes y Robert (1988) encontraron que la drenabilidad de fibras recicladas se favoreció por acción de celulasas y hemicelulasas comerciales, pero en paralelo encontraron un detrimento en las propiedades de resistencia.

#### **5.3.4. Coeficiente de absorción de luz (k)**

Del análisis de variancia de los resultados del coeficiente de absorción de luz medidos a 457 nm para los distintos tratamientos y considerando el coeficiente de dispersión de luz  $30 \text{ m}^2/\text{kg}$ ,

se encontró que existe diferencia significativa ( $p=0,0028$ ) entre los distintos tratamientos. La **Tabla 5.9** y la **Figura 5.13** muestran que cuando se aplicó la máxima carga de enzima ( $L_3$ ), el coeficiente de absorción de luz aumentó. Sin embargo, cuando se utilizó el sistema lacasa-mediador el aumento en esta propiedad fue aún mayor.

El aumento en el coeficiente  $k$  está relacionado con el aumento en el contenido de grupos cromóforos posiblemente provenientes de la oxidación de grupos fenólicos y no fenólicos de la lignina a cetonas, aldehídos o ácidos carboxílicos. En la Parte B de este capítulo se determina el contenido de estos grupos en la lignina aislada.

Chakar y Ragauskas (2000) asumieron que el oscurecimiento de la pulpa por un tratamiento con lacasa-HBT se debe al aumento en el contenido de quinonas. Cuando aplicaron un tratamiento alcalino simple posterior al tratamiento enzimático encontraron aumento en el contenido de grupos ácidos carboxílicos y disminución en el contenido de grupos hidroxilos de ligninas no condensadas utilizando la técnica de  $^{31}\text{P}$ -NMR.

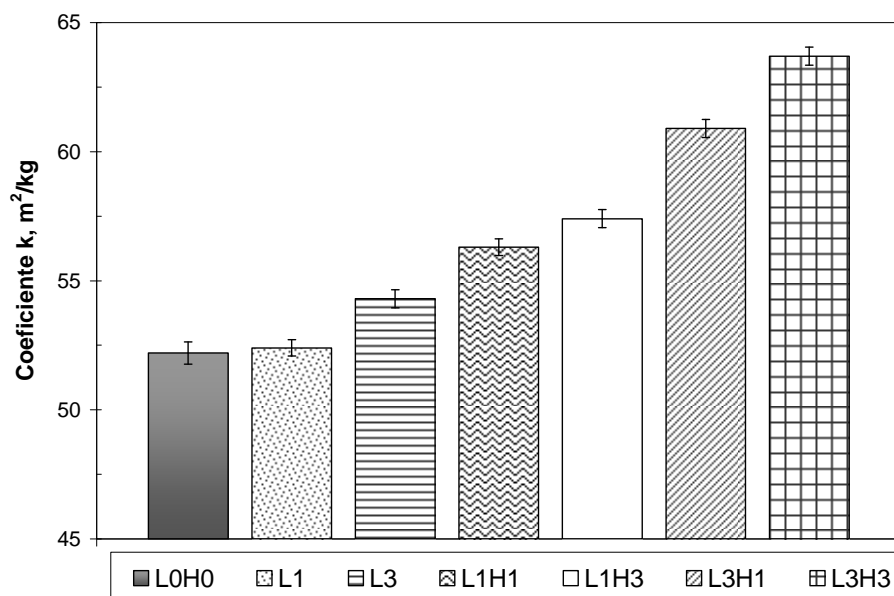
Previamente, Sealey y Ragauskas (1998) mostraron este aumento de grupos ácidos carboxílicos en la lignina por acción del SLM seguido de un tratamiento alcalino pero sobre pulpas *kraft* de bajo número *kappa*.

Haynes (1998) encontró por ESCA un aumento en el contenido de grupos ácidos superficiales por acción del sistema lacasa-HBT sobre pulpas *kraft* de *kappa* 50. Sin embargo, si bien informó que hubo aumento en el contenido de grupos ácidos totales medido por titulación conductimétrica, las diferencias no fueron significativas estadísticamente.

**Tabla 5.9.** Test de rangos múltiples de Duncan para el coeficiente de absorción de luz.

Factor: Tratamiento enzimático	Media	Grupos homogéneos <sup>1</sup>
$L_0H_0$	52,68	X
$L_1$	52,36	X
$L_3$	54,3	X
$L_1H_1$	56,12	X
$L_3H_1$	58,16	X
$L_1H_3$	59,7	X
$L_3H_3$	63,72	X

<sup>1</sup>Existe diferencia significativa al 95% entre los distintos grupos homogéneos



**Figura 5.13.** Coeficiente de absorción de luz ( $k$ ) en función de los distintos tratamientos enzimáticos empleando distintas cargas de enzima y mediador. Las barras de error indican el intervalo de confianza de la media a un 95%.

### 5.3.5. Nitrógeno Total

Sobre las hojas de laboratorio obtenidas de la pulpa referencia ( $L_0H_0$ ), de la pulpa tratada con lacasa sola ( $L_3$ ) y de la pulpa tratada con el sistema lacasa-mediador ( $L_3H_3$ ) se determinó el contenido de nitrógeno total.

La **Tabla 5.10** muestra que el contenido de nitrógeno aumentó, lo cual puede asignarse a que la enzima y/o el mediador quedaron adsorbidos sobre las fibras celulósicas. Esto es importante porque pueden afectarse las características superficiales de las fibras y así, las propiedades de resistencia del papel.

Este comportamiento de la enzima y/o el mediador también fue mostrado por otros autores utilizando otras técnicas.

Wong y col. (1999) analizaron por cromatografía iónica el material disuelto luego de tratar pulpas *kraft* no blanqueadas de coníferas con el sistema lacasa-HBT. Entre los azúcares evaluados no encontraron residuos de manosil (azúcar presente en las lacasas) y concluyeron que la enzima quedó adsorbida sobre la pulpa en una alta proporción.

Por otro lado, Poppius-Levin y col. (1999) analizando los espectros FTIR de la lignina residual de una pulpa *kraft* número *kappa* 24,7 tratada con el sistema lacasa-HBT, encontraron una alta cantidad de nitrógeno en la lignina residual proveniente principalmente de las enzimas.

Kleen y col. (2003) a través de pirólisis fraccionada seguida de cromatografía gaseosa y espectroscopia de masa (*fractionated pyrolysis-GC/MS*) estudiaron el tipo de interacción entre el HBT y la lignina aislada de una pulpa *kraft* delignificada (número *kappa* 8,6) tratada con lacasa/HBT. Encontraron que una parte del HBT residual se encontraba libre, mientras que otra parte más importante se encontraba unida covalentemente a la matriz de lignina.

**Tabla 5.10.** % de Nitrógeno total Kjeldahl presentes en las hojas de ensayo de la pulpa control (C); la pulpa tratada con el SLM (LH) y la pulpa LH lavada con Tween 20 (LH-T)

Tratamientos	% Nitrógeno (Kjeldahl) *
L <sub>0</sub> H <sub>0</sub> (control)	No detectado
L <sub>3</sub> (enzima)	0,035
L <sub>3</sub> H <sub>3</sub> (enzima + HBT)	0,080

\* la desviación estándar del ensayo realizado por triplicado es: 0,003%

### **5.3.6. Propiedades físico-mecánicas**

#### ***5.3.6.1. Índice de tracción***

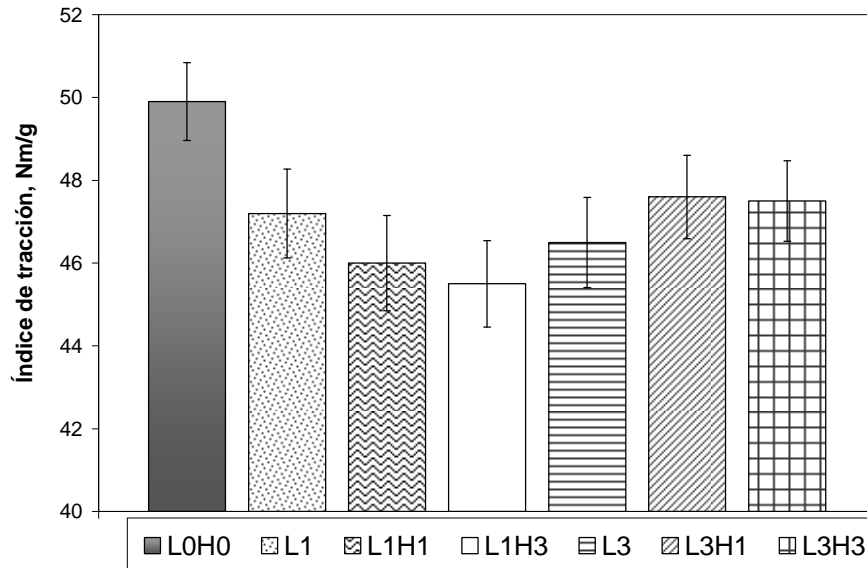
Del análisis de variancia de los resultados del índice de tracción, se encontró que existe diferencia significativa ( $p=0,0000$ ) entre los distintos tratamientos.

La **Tabla 5.11** y la **Figura 5.14** muestran que, respecto al control (LoHo), las pulpas tratadas enzimáticamente presentan menor resistencia a la tracción. Los valores más bajos fueron para las pulpas L<sub>1</sub>H<sub>3</sub> y L<sub>1</sub>H<sub>1</sub>.

**Tabla 5.11.** Test de rangos múltiples de Duncan para el índice de tracción.

Factor: Tratamiento enzimático	Media	Grupos homogéneos <sup>1</sup>
L <sub>1</sub> H <sub>3</sub>	45,5	X
L <sub>1</sub> H <sub>1</sub>	45,9	X
L <sub>3</sub>	46,5	XX
L <sub>1</sub>	47,2	XX
L <sub>3</sub> H <sub>1</sub>	47,5	X
L <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	47,6	X
L <sub>0</sub> H <sub>0</sub>	49,9	X

<sup>1</sup>Existe diferencia significativa al 95% entre los distintos grupos homogéneos



**Figura 5.14.** Índice de tracción en función de los distintos tratamientos. L: lacasa; H: HBT. Las barras de error indican el intervalo de confianza de la media del ensayo a un 95%.

### 5.3.6.2. CMT

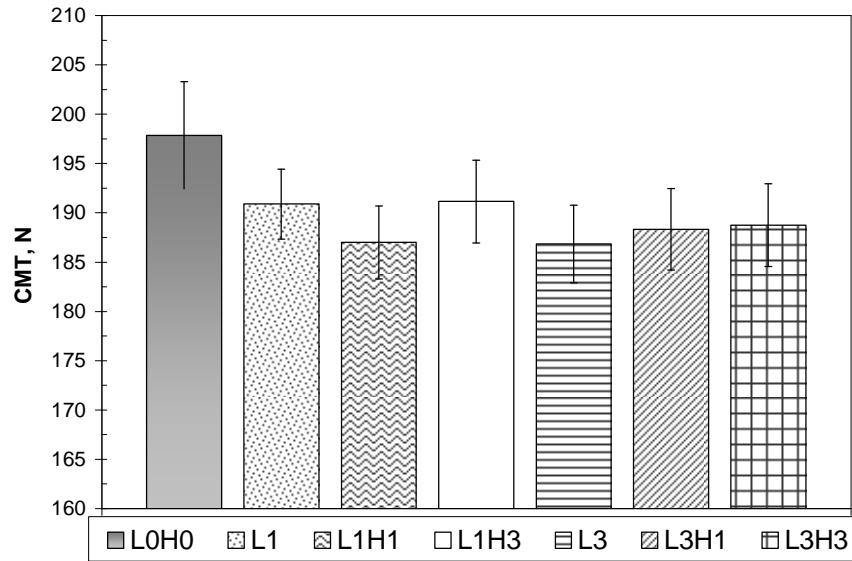
Del análisis de variancia de los resultados del resistencia al aplastamiento de onda, se encontró que existe diferencia significativa ( $p=0,0028$ ) entre los distintos tratamientos.

La **Tabla 5.12** y la **Figura 5.15** muestran que los tratamientos  $L_1$ ,  $L_1H_3$ ,  $L_3H_3$ , y no modificaron esta propiedad respecto al control ( $L_0H_0$ ). Sin embargo, los tratamientos  $L_3$ ,  $L_1H_1$  y  $L_3H_3$  la disminuyeron significativamente a un 95% de nivel de confianza.

**Tabla 5.12.** Test de rangos múltiples de Duncan para la resistencia al aplastamiento de onda

Factor: Tratamiento enzimático	Media	Grupos homogéneos <sup>1</sup>
$L_3$	186,8	X
$L_1H_1$	187,0	X
$L_3H_1$	188,3	X
$L_1$	192,5	XX
$L_1H_3$	192,8	XX
$L_3H_3$	193,2	XX
$L_0H_0$	199,2	X

<sup>1</sup>Existe diferencia significativa al 95% entre los distintos grupos homogéneos



**Figura 5.15.** Resistencia al aplastamiento de la onda (CMT) en función de los distintos tratamientos. L: lacasa; H: HBT. Las barras de error indican el intervalo de confianza de la media del ensayo a un 95%.

### 5.3.6.3. Densidad

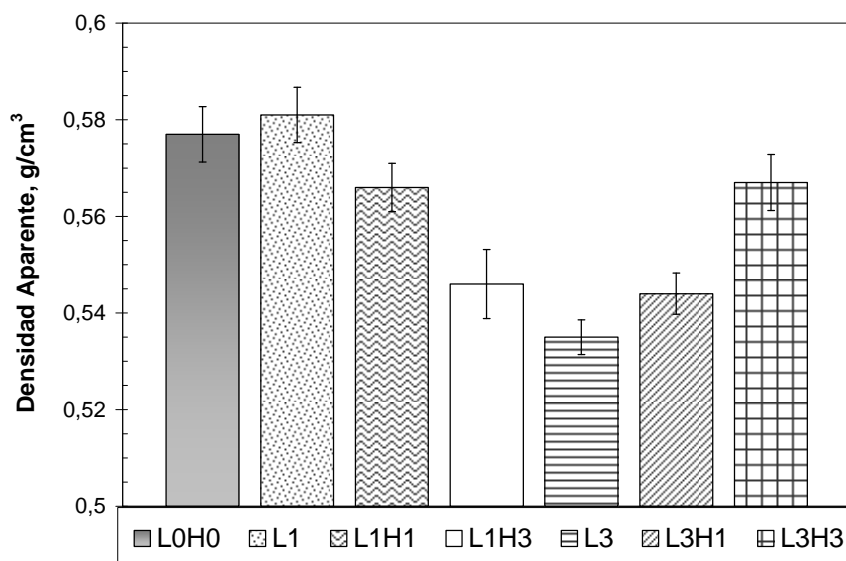
Del análisis de variancia de los resultados de densidad aparente, se encontró que existe diferencia significativa ( $p=0,0000$ ) entre los distintos tratamientos.

De la **Tabla 5.13** y la **Figura 5.16** se observa que la densidad disminuyó luego de los tratamientos enzimáticos, excepto luego del tratamiento  $L_1$ .

**Tabla 5.13.** Test de rangos múltiples de Duncan para la densidad aparente

Factor: Tratamiento enzimático	Media	Grupos homogéneos <sup>1</sup>
$L_3$	0,534	X
$L_3H_1$	0,544	X
$L_1H_3$	0,547	X
$L_1H_1$	0,566	X
$L_3H_3$	0,567	X
$L_0H_0$	0,577	X
$L_1$	0,589	X

<sup>1</sup>Existe diferencia significativa al 95% entre los distintos grupos homogéneos



**Figura 5.16.** Densidad aparente en función de los distintos tratamientos. L: lacasa; H: HBT. Las barras de error indican el intervalo de confianza de la media a un 95%.

La reducción en resistencias y densidad puede deberse a que la adsorción de la enzima y/o el mediador sobre la superficie de las fibras y finos afectan las posibilidades de enlace entre las fibras celulósicas.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Haynes (1998), quien en su evaluación de la lacasa sola y el sistema lacasa-HBT seguido o no de un tratamiento alcalino sobre pulpas *kraft* de coníferas de número *kappa* 50 encontró que, a pesar de que incrementó el contenido de grupos ácidos superficiales determinado con ESCA, las propiedades de resistencia y la densidad del papel disminuyeron. Ensayos con otros mediadores (N-hydroxyacetanilide, NHAA y ácido violúrico, VIO) mostraron el mismo efecto perjudicial. También adjudicó este comportamiento a la posible contaminación de la superficie de las fibras con enzima o con mediador, mencionando además la posibilidad de adsorción de especies intermedias generadas a partir del mediador o a la incorporación de éste a la matriz de lignina. Por otro lado, encontró que la eliminación de los extractivos reduce el efecto negativo sobre las propiedades, sugiriendo una interacción entre extractivos y enzima o mediador.

## **5.4. ENSAYOS SOBRE OTRAS PULPAS KRAFT DE ALTO KAPPA. COMPARACIÓN.**

*Buscando mejoras en propiedades papeleras, se aplicó el tratamiento enzimático sobre pulpas de mayor drenabilidad que la Pulpa A-300: Pulpa A-370 y Pulpa A-600. Particularmente, a la fracción (-30/100) de la Pulpa A-600 se le evaluó además el efecto del SLM sobre el contenido de grupos ácidos superficiales.*

### **5.4.1. Preparación de las pulpas**

#### **5.4.1.1. Pulpa A-370 y Pulpa A-600**

Se prepararon dos pulpas *kraft* de fibra larga no blanqueada recicladas partiendo de la misma pulpa virgen de número *kappa* 85,0 utilizada para la obtención de la Pulpa A-300 pero menos refinada.

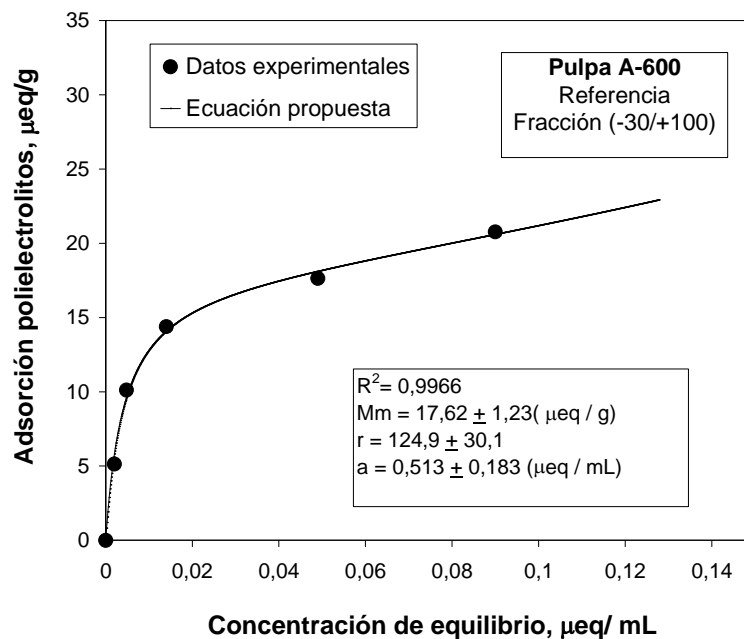
Para obtenerlas se llevó a cabo el mismo procedimiento que para obtener la Pulpa A, excepto por el nivel de refino. La drenabilidad luego del secado al aire, rehumectación y desintegrado fue 370 y 635 mL CSF para la Pulpa A-370 y la Pulpa A-600 respectivamente.

Los tratamientos enzimáticos con lacasa sola o lacasa-mediador se llevaron a cabo de la misma manera que la Pulpa A-300, excepto que se agregaron cargas intermedias de enzima y mediador.

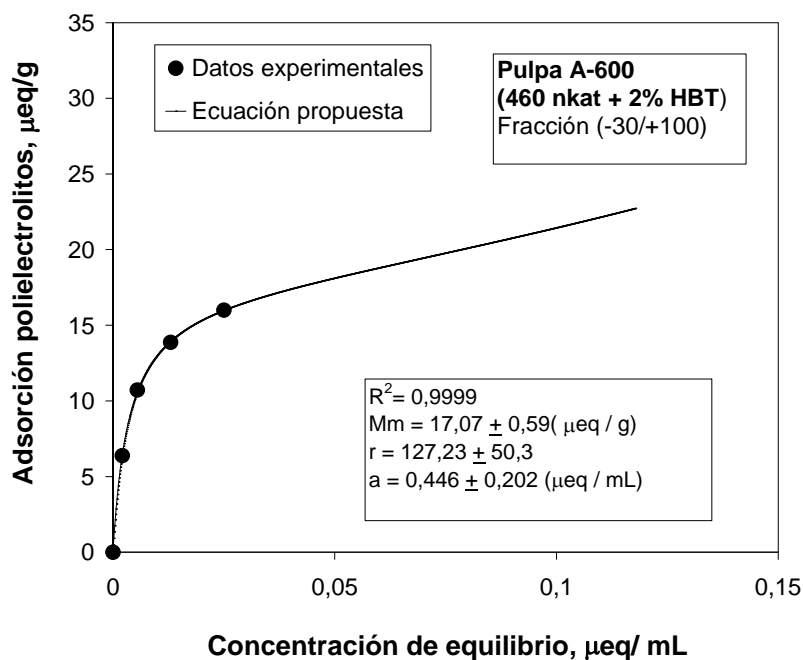
## 5.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.5.1. Pulpa A-600. Grupos ácidos superficiales

Sobre la fracción (-30/+100) de la Pulpa A-600 tratada con una carga de lacasas de 460 nkat / g pulpa seca y 2% HBT se determinó el contenido de grupos ácidos superficiales utilizando el método de adsorción de polielectrolitos. Los datos experimentales se ajustaron con la ecuación 4.20 del Capítulo 4. Las **Figuras 5.17** y **5.18** muestran que no hubo diferencias utilizando este método. El parámetro  $Mm$ , relacionado con el contenido superficial de grupos ácidos, fue 17,62 y 17,07  $\mu\text{eq/g}$  pulpa seca, para las pulpas control y tratada con el SLM respectivamente.



**Figura 5.17.** Isotherma de adsorción de polielectrolitos de la fracción -30/100 de la Pulpa A-600 (Referencia) tratada de la misma forma que con el tratamiento enzimático, pero sin el agregado de enzima ni mediador. Los puntos experimentales son ajustados con la ecuación (4.20). Se muestra el coeficiente de determinación.



**Figura 5.18.** Isotherma de adsorción de polielectrolitos de la fracción -30/100 de la Pulpa A-600 tratada con el SLM: 460 nkat/g pulpa seca de lacasa y 2% HBT. Los puntos experimentales son ajustados con la ecuación (4.20). Se muestra el coeficiente de determinación.

Haynes (1998) encontró aumento en el contenido de grupos ácidos superficiales. Sin embargo, para su determinación utilizó Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS o ESCA *Electron spectroscopy for chemical analysis*) que es una técnica más precisa.

Posiblemente las diferencias producidas por el tratamiento enzimático puedan ser medidas a partir de la determinación química de la lignina aislada. Esto se analiza en la Parte B de este capítulo.

### **5.5.2. Resumen de propiedades. Comparación**

La **Tabla 5.14** muestra los resultados obtenidos luego de tratar pulpas no blanqueadas recicladas de mayor drenabilidad (Pulpa A-370 y Pulpa A-600) con distintas cargas de enzima y mediador. Estos resultados se comparan con los obtenidos para la Pulpa A-300.

Al igual que para la Pulpa A-300, para la Pulpa A-600 se encontró una reducción significativa ( $p=0,0369$ ) en el número *kappa* principalmente para las máximas cargas de enzima y mediador.

Para la Pulpa A-370 no se observaron cambios significativos en esta propiedad ( $p=0,1367$ ).

Respecto a la drenabilidad, se encontró que para la Pulpa A-370 hubo un aumento significativo ( $p= 0,0147$ ). La enzima sola aumentó esta propiedad, sin embargo, la acción del sistema lacasa-mediador la aumentó aún más. Este comportamiento es similar a lo observado para la Pulpa A-300 (**Figura 5.12**).

Para la Pulpa A-600 no se observan cambios en drenabilidad. A altos grados de drenabilidad el error en la determinación es mayor.

Para la Pulpa A-370, se encontró una reducción significativa ( $p= 0,0000$ ) en la resistencia a la tracción y en la densidad ( $p=0,003$ ) por acción del tratamiento enzimático (202 nkat + 1,16 % HBT), igual a lo observado para la pulpa A-300.

Para la Pulpa A-600, se encontró que hubo diferencias significativas entre las medias de resistencias a la tracción de los distintos tratamientos ( $p=0,0004$ ). Respecto al control (Ref), sólo la pulpa tratada con la máxima carga de enzima y mediador (460 nkat + 5% HBT) redujo significativamente esta propiedad.

Para esta última pulpa también se encontraron diferencias significativas ( $p=0,0001$ ) en la densidad. De la comparación de las medias se encontró que, excepto la pulpa tratada con enzima sola (460 nkat), las pulpas tratadas con enzima y mediador disminuyeron esta propiedad.

Esto sugiere pensar en otras alternativas para lograr la mejora de las propiedades de papeles reciclados.

**Tabla 5.14.** Comparación de los resultados obtenidos del tratamiento enzimático sobre una pulpa reciclada no blanqueada *kappa* 85,0 (Pulpa A) previamente refinada a tres niveles (300, 370 y 600 mL CSF) y sobre una pulpa no blanqueada reciclada *kappa* 91,6 (Pulpa B) refinada a 600 mL<sup>a</sup>.

Propiedad evaluada	Pulpa A-300 (290 mlCSF)					Pulpa A-370 (370 mlCSF)			Pulpa A-600 (600 mlCSF)			
	Ref.	202 nkat	202 nkat + 1,16% HBT	610 nkat	610 nkat + 3,5% HBT	Ref.	202 nkat	202 nkat + 1,16% HBT	Ref	460 nkat	460 nkat + 2% HBT	460 nkat + 5% HBT
Número <i>kappa</i>	85,0	83,7	83,7	82,8	82,7	85,0	85,0	84,2	84,4	81,8	83,9	80,6
Drenabilidad (mL CSF)	290	300	290	350	340	370	380	430	635	600	615	650
Densidad (g / cm <sup>3</sup> )	0,577	0,589	0,566	0,534	0,567	0,593	0,579	0,562	0,481	0,478	0,473	0,464
Índice de Tracción (N.m/g)	49,9	47,2	45,9	46,5	47,6	45,3	44,2	40,6	31,15	31,4	30,9	29,4

<sup>a</sup> Se muestran los resultados promedios de las determinaciones.

## 5.6. CONCLUSIONES PARCIALES PARTE A

La acción del tratamiento enzimático sobre pulpas completas *kraft* no blanqueadas recicladas, redujo el número *kappa* de los finos y aumentó sus grupos ácidos. Sin embargo, estos efectos beneficiosos no se reflejaron en las propiedades papeleras de la pulpa completa. Seguramente el efecto negativo de adsorción de la enzima y/o mediador enmascararon los efectos positivos de aumento de grupos ácidos y de leve reducción del número *kappa*.

Este detrimento en las propiedades también puede deberse a que el SLM reaccionó con los extractivos, aumentando el efecto negativo sobre la superficie de las fibras y en consecuencia reduciendo el enlace entre ellas.

Por otro lado, se produjo sólo una leve reducción del número *kappa* de la pulpa completa por acción de la enzima sola o del sistema lacasa-mediador.

Un resultado positivo fue que la drenabilidad de las pulpas aumentó significativamente posiblemente debido a que la enzima y/o el mediador adsorbidos floclaron a los finos.

Respecto al efecto de las distintas cargas de enzima y mediador se observó que el incremento en el coeficiente de absorción de luz ( $k$ ), relacionado con el contenido de grupos cromóforos, fue mayor para el sistema lacasa-HBT, especialmente cuando se utilizaron las máximas cargas de enzima y mediador.

## 5.7. CONSIDERACIONES PARA LA PARTE B DE ESTE CAPÍTULO

A partir de los resultados obtenidos de este rastreo, se plantearon para la sección siguiente de este capítulo las siguientes modificaciones:

- Realizar los tratamientos enzimáticos sobre la fracción fibrosa exclusivamente ( $R_{30}$ ). La acción oxidativa del sistema lacasa-mediador se focaliza así sobre las fibras. Además, al eliminar los finos, se elimina una importante cantidad de extractivos que podrían reaccionar con el SLM.
- Utilizar altas cargas de enzima y mediador sobre esta fracción fibrosa, teniendo en cuenta que las mayores modificaciones químicas sobre la pulpa completa (aumento en el coeficiente de absorción de luz y disminución en el  $N^{\circ}$  *kappa*) se observaron sobre la pulpa tratada con 610 nkat/g pulpa seca y 3,5% de HBT.
- Caracterizar químicamente la lignina aislada. Determinar contenido de grupos ácidos, hidroxilos y carbonilos en la lignina luego de los tratamientos enzimáticos.
- Usar un surfactante luego de los tratamientos enzimáticos para desorber la enzima, intentando minimizar su acción negativa sobre las propiedades papeleras.
- Evaluar el efecto del tratamiento alcalino posterior al tratamiento enzimático para eliminar la lignina oxidada por el sistema lacasa-mediador.

Además se plantearon otras modificaciones:

- Reemplazar el refino en molino *Sprout Waldrom* por el refino en PFI donde el nivel de refino es más simple de controlar.
- Controlar la actividad enzimática inicial y durante todo el tratamiento enzimático.
- Sustituir el ácido acético por buffer ácido acético-acetato de sodio para mantener el pH en 5,0.