

Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado. Maestrías en Madera, Celulosa y Papel

Maestranda
María Claudia Taleb

Tratamientos enzimáticos de fibras celulósicas a partir de papel reciclado

**Tesis de Maestría presentada para obtener el título de “Magíster en Ciencias de la Madera, Celulosa y Papel”
OCyP**

Director
Dra. Mirtha Maximino

Posadas, 2002



Esta obra está licenciada bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

**“TRATAMIENTOS
ENZIMÁTICOS DE FIBRAS
CELULÓSICAS A PARTIR
DE PAPEL RECICLADO”**

MARÍA CLAUDIA TALEB

**Tesis presentada a la
Universidad Nacional de
Misiones como exigencia parcial
de la Maestría en Ciencias de
Madera, Celulosa y Papel.**

Directora: Dra. Mirtha G. Maximino.

**A mi esposo, Daniel y
a mi hija, Florencia.**

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Tesis, Mirtha Maximino, por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis dentro del proyecto CAI+D 2000 de la Universidad Nacional del Litoral: “Modificaciones Enzimáticas de Fibras Celulósicas de Papeles Reciclados” y por su dedicación en la orientación del mismo.

A los integrantes del PROCyP y en particular a María Cristina Area, por su amabilidad, esmero y buena predisposición que ofrece, para poder llevar a cabo la Maestría.

Al personal del Instituto de Tecnología Celulósica, en particular a Emilio Fernández, Ana María Adell, Federico Yabale, Luis Mina y Victorio Marzocchi, por todo el apoyo brindado; y a Nora Pratta, por su ayuda en la parte de estadística.

A mis compañeros de Maestría, por la amistad brindada.

A la empresa Papel Misionero S.A., por las planchas de pasta y a Humberto Venturini de la firma Genencor International Inc., por el suministro de la enzima.

RESUMEN

La fibra reciclada ha llegado a ser un elemento importante en la industria papelera. Además de ser una fuente de fibra de bajo costo, sirve para preservar y economizar los recursos forestales, minimiza la polución medio ambiental y contribuye a la conservación del agua y la energía. A nivel mundial, más de 1/3 del papel producido se hace a partir de fibras recicladas. Se sabe que, a medida que aumenta el número de ciclos de utilización de pastas químicas, paralelamente disminuye la capacidad del grado de unión entre las fibras, reflejándose esto en pérdidas significativas en las propiedades de resistencias. La práctica industrial incrementa nuevamente las propiedades de resistencia a través de la acción mecánica de refino, generando mayor cantidad de finos celulósicos, los cuales disminuyen la velocidad de drenaje de las pastas y por ende, su capacidad de producción. Además, a medida que se aumenta el tratamiento mecánico, se limita la recuperación posterior de propiedades en futuros ciclos.

Este trabajo apunta a mejorar la calidad papelera de pastas provenientes de papeles reciclados, y tiende a potenciar su aprovechamiento técnico-económico como fuente de materia prima en la industria papelera. Se evaluaron los efectos del tratamiento enzimático con Pergalase A 40 (mezcla de celulasas y hemicelulasas), sobre las propiedades de las fibras y propiedades de resistencia de una pasta kraft de pino no blanqueada, reciclada en laboratorio. Se analizaron los factores carga de enzima sobre fibra y tiempo de tratamiento a través de un diseño central compuesto + centros + estrellas. El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en las propiedades analizadas, a un nivel de confianza del 95% mostró, a través de sus correspondientes ecuaciones de regresión, las diferentes variaciones de las mismas con los factores estudiados. Tomando uno de los puntos del diseño, se realizó una curva de refino en molino PFI de la pulpa tratada con la enzima, analizando consumo de energía y propiedades físicas alcanzadas versus el tratamiento mecánico estándar. Se alcanzaron para todos los casos del tratamiento enzimático, mejoras importantes de drenabilidad y de índice de tracción respecto al estado de referencia. A bajas cargas de enzima se produjo una reducción en el contenido de finos, corroborándose el posible efecto de floculación. Para la pasta con los tratamientos combinados de enzima y refino, se verificó un mayor grado en la drenabilidad y un consumo específico de energía menor comparándola con el estado de referencia.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ÍNDICE	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FOTOGRAFÍAS	xii
CAPÍTULO 1: DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO	1
1.1. Introducción.	2
1.2. Antecedentes.	3
1.3. Objetivos.	12
1.4. Justificación.	13
CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA	15
2.1. Metodología.	16
2.2. Plan de actividades.	16
CAPÍTULO 3: ENZIMAS	21
3.1. Características generales	22
3.2. Modo de acción del complejo enzimático	22
3.3. Descripción de la enzima de trabajo	24
3.3.1. Aplicaciones	24
3.3.2. Beneficios	25
CAPÍTULO 4: DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	26
4.1. Pasta reciclada.	27
4.1.1. Materia prima y preparación de la pasta reciclada.	27
4.1.2. Evaluación de la etapa de reciclo.	27
4.2. Determinación de la actividad enzimática.	29
4.2.1. Determinación de la actividad enzimática frente a carboximetilcelulosa.	30
4.2.2. Resultados obtenidos para la CMC.	34
4.2.3. Determinación de la actividad enzimática frente al xilano.	36

4.2.4. Resultados obtenidos para el XILANO.	37
4.2.5. Determinación de la actividad enzimática frente al papel de filtro.	40
4.2.6. Resultados obtenidos para el PAPEL DE FILTRO.	43
4.2.7. Resultados de la actividad enzimática para la enzima Pergalase A-40.	45
4.2.8. Curva de calibrado con estándares de glucosa.	45
4.2.9. Resultados obtenidos para la curva de calibrado de GLUCOSA.	47
4.3. Tratamientos enzimáticos según el diseño experimental.	48
4.3.1. Resultados obtenidos según el diseño experimental.	50
4.4. Tratamientos combinados de enzima con refino.	56
4.4.1. Resultados obtenidos en los tratamientos combinados.	56

CAPÍTULO 5: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE

RESULTADOS - CONCLUSIONES

5.1. Análisis y discusión de resultados.	62
5.1.1. Según el diseño experimental desde el punto de vista estadístico.	63
5.1.2. Según el diseño experimental desde el punto de vista del mejoramiento de las propiedades papeleras.	75
5.1.3. Tratamientos combinados de enzima con refino.	81
5.2. Conclusiones.	85

BIBLIOGRAFÍA

87

ANEXO A:

89

Decodificaciones de las propiedades analizadas según el diseño experimental.

90

LISTA DE FIGURAS

2.1.	Plan de actividades.	20
4.1.	Esquema de la metodología seguida para realizar la Curva Glucosa / Buffer / CMC.	31
4.2.	Esquema de la metodología seguida para determinar la Actividad enzimática frente a la CMC.	32
4.3.	Curva de regresión correspondiente a Glucosa / Buffer / CMC.	34
4.4.	Curva de regresión de la determinación de la actividad enzimática frente a la CMC.	35
4.5.	Curva de regresión correspondiente a Xilosa / Buffer / XILANO.	38
4.6.	Curva de regresión de la determinación de la actividad enzimática frente al XILANO.	39
4.7.	Esquema de la metodología seguida para realizar la Curva Glucosa / Buffer / PF.	41
4.8.	Esquema de la metodología seguida para determinar la Actividad enzimática frente al PF.	42
4.9.	Curva de regresión correspondiente a Glucosa / Buffer / PF.	43
4.10.	Curva de regresión de la determinación de la actividad enzimática frente al PF.	45
4.11.	Esquema de la metodología seguida para realizar la Curva de calibrado con Glucosa.	46
4.12.	Curva de calibrado con estándar de glucosa.	47
4.13.	Diseño Central Compuesto 2^2 + estrellas + centros.	49
5.1.	Superficie de respuesta y curvas de nivel correspondientes a la determinación en el licor residual de los azúcares reductores producidos durante la hidrólisis enzimática.	65
5.2.	Superficie de respuesta y curvas de nivel del CSF de la pasta entera en función de los factores carga de enzima y tiempo de tratamiento.	66
5.3.	Superficie de respuesta y curvas de nivel del WRV_t de la pasta entera en función de los factores.	67
5.4.	Superficie de respuesta y curvas de nivel para la cuantificación de los finos en la pasta entera.	67

5.5.	Superficie de respuesta y curvas de nivel correspondientes a la densidad aparente de la pasta entera en función de los factores en estudio.	68
5.6.	Residuales para el Índice de tracción en función del número de tratamiento según el diseño experimental.	69
5.7.	Superficie de respuesta y curvas de nivel correspondientes al índice de tracción de la pasta entera.	69
5.8.	Superficie de respuesta y curvas de nivel del índice de rasgado de la pasta entera.	70
5.9.	Superficie de respuesta y curvas de nivel del CSF correspondiente a la fracción fibrosa.	71
5.10.	Superficie de respuesta y curvas de nivel del valor de retención de agua total de la fracción fibrosa en función de los factores en estudio de EF.	72
5.11.	Superficie de respuesta y curvas de nivel correspondientes al índice de tracción de la fracción fibrosa.	73
5.12.	Superficie de respuesta y curvas de nivel correspondientes al índice de rasgado de EF.	74
5.13.	Superficie de respuesta y curvas de nivel correspondientes al scattering de EF.	74
5.14.	Evolución de los azúcares reductores en función de la carga de enzima a diferentes tiempos de tratamiento enzimático.	75
5.15.	Evolución de los finos en función de la carga de enzima a diferentes tiempos de tratamiento enzimático.	76
5.16.	Variación del CSF en función de la carga de enzima a diferentes tiempos de tratamiento.	77
5.17.	Evolución del grado de polimerización en función de la carga de enzima a diferentes tiempos de tratamiento correspondiente a la pasta entera y a la fracción fibrosa.	78
5.18.	Curvas de refino: CSF vs. revoluciones correspondientes a la pasta reciclada (RE) y a la pasta con tratamiento combinado ($EE_{(b)}$).	82
5.19.	Curvas de refino: Consumo de energía específica en función de las revoluciones correspondientes a la pasta reciclada (RE) y a la pasta con tratamiento combinado ($EE_{(b)}$).	82
5.20	Índice de Tracción en función del consumo específico de energía correspondientes a las pastas enteras con refino, reciclada (RE) y con tratamiento enzimático ($EE_{(b)}$).	83

- 5.21. Valor de retención de agua total e intrafibra de la fracción F+100 de las pastas refinadas de referencia y tratada con enzimas. 84**
- 5.22. Relación drenabilidad vs. índice de tracción de las pastas enteras refinadas de referencia y con tratamiento enzimático. 84**

LISTA DE TABLAS

4.1.	Propiedades de pasta Kraft de pino sin blanquear antes y después del tratamiento de reciclo.	28
4.2.	Condiciones empleadas en la determinación de las actividades enzimáticas frente a los sustratos.	29
4.3.	Absorbancias medidas a 540 nm en función de la cantidad de glucosa en mg/0,5ml.	34
4.4.	Absorbancias medidas a 540 nm para la determinación de la actividad enzimática frente a la CMC	35
4.5.	Absorbancias medidas a 540 nm en función de las cantidades de xilosa en mg/0,5ml.	37
4.6.	Absorbancias medidas a 540 nm para la determinación de la actividad enzimática frente al XILANO.	38
4.7.	Absorbancias medidas a 540 nm en función de las cantidades de glucosa en mg/0,5ml.	43
4.8.	Absorbancias medidas a 540 nm para la determinación de la actividad enzimática frente al papel de filtro.	44
4.9.	Actividades de la enzima Pergalase A40.	45
4.10	Absorbancias medidas a 540 nm en función de la cantidad de estándar de glucosa en mg/0,5ml.	47
4.11.	Condiciones de los diferentes tratamientos enzimáticos.	49
4.12.	Propiedades del licor residual después de las diferentes combinaciones de los tratamientos enzimáticos según el diseño experimental (EE).	51
4.13.	Propiedades de la pasta entera reciclada después de las diferentes combinaciones de los tratamientos enzimáticos según el diseño experimental (EE) y de la pasta entera reciclada de referencia (RE).	52
4.14.	Propiedades de la fracción fibrosa reciclada después de las diferentes combinaciones de los tratamientos enzimáticos (EF) y de la fracción fibrosa reciclada de referencia (RF).	53
4.15.	Propiedades físicas de la pasta entera reciclada después de los diferentes tratamientos enzimáticos (EE) y de la pasta entera reciclada de referencia (RE).	54
4.16.	Propiedades físicas de la fracción fibrosa reciclada después de los diferentes tratamientos enzimáticos (EF) y de la fracción fibrosa reciclada de referencia (RF).	55
4.17.	Propiedades de la pasta entera reciclada de referencia (RE) y con tratamiento de refinado (RE₂₀₀₀, RE₄₀₀₀ y RE₅₀₀₀) y propiedades de la pasta entera reciclada con tratamiento enzimático a 0,1 % y 90 min (EE(b)) y con	

- tratamiento combinado de enzima y refino (EE(b)₂₀₀₀, EE(b)₄₀₀₀ y EE(b)₆₀₀₀). 57
- 4.18.** Propiedades de la fracción fibrosa reciclada de referencia (RF) y con tratamiento de refino (RF₂₀₀₀, RF₄₀₀₀ y RF₅₀₀₀) y propiedades de la fracción fibrosa reciclada con tratamiento enzimático a 0,1 % y 90 min (EF(b)) y con tratamiento combinado de enzima y refino (EE(b)₂₀₀₀, EE(b)₄₀₀₀ y EE(b)₆₀₀₀). 58
- 4.19.** Propiedades físicas de la pasta entera reciclada de referencia (RE) y con tratamiento de refino (RE₂₀₀₀, RE₄₀₀₀ y RE₅₀₀₀) y propiedades físicas de la pasta entera reciclada con tratamiento enzimático a 0,1 % y 90 min (EE(b)) y con tratamiento combinado de enzima y refino (EE(b)₂₀₀₀, EE(b)₄₀₀₀ y EE(b)₆₀₀₀). 59
- 4.20.** Propiedades físicas de la fracción fibrosa reciclada de referencia (RF) y con tratamiento de refino (RF₂₀₀₀, RF₄₀₀₀ y RF₅₀₀₀) y propiedades físicas de la fracción fibrosa reciclada con tratamiento enzimático a 0,1 % y 90 min (EF(b)) y con tratamiento combinado de enzima y refino (EF(b)₂₀₀₀, EF(b)₄₀₀₀ y EF(b)₆₀₀₀). 60
- 5.1.** Efectos producidos de los factores carga de enzima y tiempo de tratamiento. 64
- 5.2.** Densidad aparente, índice de tracción e índice de rasgado de tratamientos enzimáticos producidos a bajas cargas de enzima. 77

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

4.1.	Vista general del reactor Batch.	50
4.2.	Interior del reactor.	50
5.1.a.	Coloración diferencial de Simons correspondiente a la pasta reciclada de referencia (RE).	79
5.1.b.	Coloración diferencial de Simons correspondiente a la pasta reciclada de referencia (RE).	80
5.2.a.	Coloración diferencial de Simons correspondiente a la pasta reciclada con tratamiento enzimático EE(b) (0,1 % - 90min.).	80
5.2.b.	Coloración diferencial de Simons correspondiente a la pasta reciclada con tratamiento enzimático EE(b) (0,1 % - 90 min.).	81

CAPÍTULO 1

Descripción del Trabajo

1.1. Introducción

La fibra reciclada ha llegado a ser un elemento importante en la industria papelera. Además de ser una fuente de fibra de bajo costo, sirve para preservar y economizar los escasos recursos forestales, minimiza la contaminación medio ambiental y contribuye en la conservación del agua y la energía. A nivel mundial, más de 1/3 del papel producido se hace a partir de fibras recicladas (1).

La producción de papel y cartón a partir de 100 % de fibras recicladas, presentan algunas dificultades en relación a la fibra virgen. Los obstáculos principales son, la resistencia de las fibras y la velocidad de drenaje en la máquina papelera. Las diferencias entre fibras reciclada y virgen son especialmente evidentes en fibras de pulpas químicas (2).

Durante los últimos 30 años se ha estudiado intensamente lo que se ha denominado "*el efecto general del reciclado*", es decir, cómo son afectadas las propiedades de las fibras en los procedimientos de reciclado y los efectos resultantes en el papel que se fabrica a partir de ellas (3) (4).

Se sabe que, a medida que aumenta el número de ciclos de utilización de pastas químicas, paralelamente disminuye la capacidad del grado de unión entre las fibras, reflejándose esto en pérdidas significativas en las propiedades de resistencia. Esta pérdida de unión podría ser función de dos parámetros: flexibilización de la fibra, es decir, conformabilidad en húmedo y condición superficial, o, cambios que ocurren en la superficie de las fibras (5).

El consenso es que se pierde la capacidad de hinchamiento de la fibra reciclada y que la irreversibilidad del proceso se incrementa con el nivel y duración del secado. Esta propiedad de swelling irreversible se denomina cornificación (hornification), atribuyéndose estos cambios al cierre irreversible de los poros de la pared celular de la fibra (6) (7). Se piensa además que la cornificación es una de las razones por la cual las fibras recicladas se fracturan y fácilmente generan finos durante el refinado y de este modo hace que la pulpa drene lentamente (2).

Un recurso típico para recuperar las propiedades de resistencia de las fibras recicladas es refinando, pero dicha acción mecánica de refinado, genera mayor cantidad de finos celulósicos, los cuales disminuyen la velocidad de drenaje de las pastas y por ende su capacidad de producción. Además, a medida que se aumenta el

tratamiento mecánico se limita la recuperación posterior de propiedades en futuros ciclos (8) (2).

En el presente trabajo, se utilizó pasta kraft de pino sin blanquear, con más de una etapa de reciclado. Sobre dicha pasta se efectuaron, previos al refino en molino PFI, los diferentes tratamientos enzimáticos (con una mezcla de celulasas y hemicelulasas). Luego, se evaluaron los efectos resultantes, determinando distintas propiedades de las fibras, a fin de intentar explicar las posibles causas de las pérdidas en propiedades de resistencia durante el reciclado y lograr algunas modificaciones en las fibras, tendientes a disminuir el inevitable tratamiento mecánico posterior.

Por otro lado, sobre la misma pasta reciclada, se estudió el efecto del refino en combinación con un previo tratamiento enzimático, sobre el consumo de energía en el tratamiento mecánico y las propiedades de las pastas así obtenidas.

1.2. Antecedentes

El tratamiento con enzimas para modificar pulpas de madera no es nuevo y es un tema de creciente interés en los últimos años. En una patente publicada en 1942, *Diehm* informó que las hemicelulasas podrían ayudar en el refino de las pulpas, incrementando la velocidad de hidratación de las fibras.

Otras patentes, como la de *Bolaksi & Gallatin* (11) se refirieron al “refino enzimático”, es decir, el tratamiento mecánico en presencia de las enzimas, como una forma de ahorrar energía durante el batido de las pulpas.

Paquot et al informaron resultados de sus estudios relacionados a la biodegradación de la celulosa y explicaron que si la reacción enzimática no es limitada y controlada, las fibras podrían ser afectadas por el efecto de peeling, conduciendo a una reducción de la longitud de fibra promedio. (Citado en *Enzymes in Pulp and Paper Processing – Chapter 3*).

Posteriormente, *Noe et al* (13) propusieron el uso de xilanasas para fibrillar externamente pulpas kraft blanqueadas, como una manera de reducir la demanda de energía en el proceso de producción de papel y para ayudar a liberar la lignina de la matriz hemicelulosa-lignina.

Oltus et al investigaron el tratamiento con enzimas de distintos tipos de papeles usados, para revertir la cornificación y recuperar la actividad superficial de la fibra original. Todas las muestras exhibieron disminución de propiedades de resistencia a la tracción, explosión y desgarró. Inicialmente la hidrólisis enzimática fracturó la fibra, lo cual finalmente resultó en una completa desintegración de la fibra. Además, dedujeron que la hidrólisis enzimática de papel reciclado provocó la desintegración radial de las fibras en lugar de algún efecto de fibrilación ó fisión esperado, concluyendo que por tratamiento enzimático no se alcanzó ninguna revitalización de las fibras recicladas. (Citado en *Enzymes in Pulp and Paper Processing – Chapter 3* (1997) y en *Tappi J. 76 (3)147* (1993)).

Pommier et al (9) proporcionaron la evidencia más definitiva de mejora de resistencia de fibras secundarias por tratamiento enzimático. Estudiaron la acción de una preparación de enzima comercial, Liftase A 40, una mezcla de celulasas y hemicelulasas y su capacidad para revertir el perjudicial descenso en las propiedades de drenaje inherente a la fibra reciclada. Además, informaron que un incremento en la drenabilidad ocurre en los primeros 30 minutos de tratamiento y observaron una ligera pérdida en el índice de explosión. Por otro lado, especularon que las enzimas actúan sobre la superficie de las fibras produciendo un efecto de pelado, como lo describieron también *Lee y Kim*. (Citado en *Enzymes in Pulp and Paper Processing – Chapter 3* (1997) y en *Tappi J. 76 (3)147* (1993)). Si este efecto de peeling fuera limitado y controlado, la enzima podría solamente remover algunos pequeños elementos o componentes que tienen gran afinidad por el agua, los cuales contribuyen ligeramente en el potencial de unión hidrógeno de las fibras. Esta reducción de la interacción fibra - agua permitiría un mejor drenaje de la pulpa sin afectar las propiedades mecánicas finales del papel. Cuando la reacción enzimática comienza, el efecto de peeling causa un marcado incremento en el drenaje de la pulpa. Este efecto está directamente relacionado con la fibrilación de las fibras y, de este modo, al área de la superficie específica disponible para que la enzima actúe (10) (12).

Posteriormente, *Bhat et al* (8) confirmaron los hallazgos de *Pommier et al* (9) y verificaron lo encontrado por *Lee y Kim* (Citado en *Enzymes in Pulp and Paper Processing – Chapter 3* (1997) y en *Tappi J. 76 (3)147* (1993)) usando fibras kraft de

conífera blanqueada y no-blanqueada. Sin embargo, ni *Bhat* ni *Pommier* propusieron un mecanismo de acción para los fenómenos observados.

Algunos de los efectos básicos del tratamiento enzimático han sido resueltos por *Jackson et al* (10). Estos autores usaron pulpa kraft de coníferas como sustrato y analizaron tres preparaciones de enzimas: una de celulasas, otra de hemicelulasas y una tercera una mezcla de celulasas y hemicelulasas. El Canadian Standard Freeness (CSF) aumentó con el tratamiento con celulasas, pero no con la preparación de hemicelulasas, demostrando que durante el tratamiento con celulasas ocurre la hidrólisis de la fibra. Dosajes bajos de enzima resultaron en una reducción del contenido de finos, lo cual fue relacionado con la floculación de éstos con la enzima, similar a lo que ocurre con los aditivos de ayuda de drenaje con polímero. Los más altos dosajes de enzima condujeron a un incremento en el contenido de finos. Esto fue atribuido a la desintegración de las fibras inducidas por celulasas, como lo describieron *Oltus et al* en *Enzymes in Pulp and Paper Processing – Chapter 3* (1997).

En un extenso review sobre fundamentos de pérdida de resistencia de papeles reciclados, *Nazhad y Paszner* (6) enfatizan la necesidad de conocer los fundamentos que expliquen la causa de estos cambios y poder establecer cuál de los factores - pérdida de flexibilización de la pared y/o cambios en la condición superficial de las fibras recicladas - juega el rol preponderante en la pérdida de resistencia.

Fuentes y Robert (14) encontraron que tratando fibras secundarias con celulasas y hemicelulasas comerciales se incrementó el drenaje de 18 a 20 %, aunque la resistencia se redujo. Sin embargo, la resistencia podría mejorarse refinando la pulpa antes del tratamiento con enzima o adicionando almidón como carga.

Un gran número de diferentes celulasas y hemicelulasas pueden ser usadas para mejorar la drenabilidad, aunque los mejores resultados se han obtenido con celulasas comerciales a partir de *Trichoderma reesei* (9). A baja concentración de enzima, la drenabilidad aumenta sin pérdida significativa en las propiedades mecánicas del papel. Mientras el efecto inicial de la enzima es beneficiado enormemente, sería perjudicial extender el tiempo de la reacción con altas concentraciones de enzima. Estos estudios fueron extendidos a escala piloto en industrias de fábricas de papel (15). Seleccionaron 30 fábricas diferentes en las que

realizaron experiencias piloto. En muchos casos, observaron un incremento en la drenabilidad de la pulpa causado por la acción de la enzima y sin pérdida de propiedades mecánicas del papel fabricado en una máquina papelera piloto. Cuando el refinado mecánico precedió al tratamiento enzimático, obtuvieron mejores propiedades físicas con una drenabilidad similar a la de la pulpa sin tratamiento (15) (9). El incremento en la drenabilidad puede mejorar la capacidad en la planta de preparación de fibras secundarias, ya sea incrementando la velocidad de la máquina o diluyendo la pulpa en la cabeza de máquina, y finalmente producir un papel de mejor calidad. Las condiciones deben ser modificadas para cada situación particular para maximizar el incremento en la drenabilidad. Además, incrementando la drenabilidad, el uso regular de las enzimas bajo condiciones apropiadas, puede producir efectos secundarios beneficiosos tales como una mayor seguridad en la máquina papelera. Se encontró que produce el 50% menos del papel de inferior calidad (substandard), particularmente debido a una baja frecuencia de roturas (<20%).

Karsila et al (16) publicaron que la drenabilidad de las pulpas mecánicas pueden ser mejoradas mediante la adición de hemicelulasas. Los autores reivindican que estas enzimas mejoran la drenabilidad de pulpa reciclada destintada, sin efecto perjudicial sobre las propiedades de resistencia a la tracción. Comparativamente, el índice de rasgado decreció para pulpas tratadas con celulasas. Este hallazgo sugiere que la xilanasas podría ser mucho más efectiva que las celulasas o mezclas de xilanasas/celulasa. La xilanasas, sin embargo, remueve hemicelulosas que comprometen la unión interfibra, un efecto que puede además conducir a propiedades del papel de mala calidad.

Jeffries et al informaron que las xilanasas podrían mejorar la drenabilidad de fibras químicas pero no de las mecánicas. Ellos compararon los efectos de una celulasa comercial (Celluclast™) con una xilanasas comercial conteniendo actividad de celulasa (Pulpzyme HA™) y una xilanasas libre de celulasa a partir de *Aureobasidium pullulans*. Los efectos encontrados son significantes. En el caso de la xilanasas *A. pullulans*, que actúa sobre las fibras químicas, la drenabilidad fue mejor que la observada con celluclast™, cuando ambas fueron usadas a un mismo nivel de dosaje de enzima. (Citado en *Enzymes in Pulp and Paper Processing – Chapter 3 (1997)*).

Bhardwaj et al (1) examinaron la efectividad de diversas enzimas comerciales, celulasas y hemicelulasas, para mejorar el drenaje de las fibras secundarias. Usaron una pulpa de papel reciclado conteniendo principalmente recortes de corrugado kraft y cajas usadas de cartón corrugado. El mejor drenaje, comparado con el de control, se logró con Pergalase (una mezcla de celulasas y hemicelulasas) y con Maxazyme (una celulasa) seguido por un pequeño incremento, pero aun significativo, con LYX *Aspergillus niger* (una celulasa). Para pulpas de diferentes drenabilidades iniciales, encontraron que el tratamiento con Pergalase dio la mayor ganancia para la de más baja drenabilidad. Esta mejora fue de 11,7% con una carga de enzima de 0,1% y de 21,3% con 0,2% de enzima para un tiempo de residencia de 30 minutos. Aumentando el tiempo a 180 minutos mejora el drenaje a 25,4 % y 31,7% para cargas de 0,1% y 0,2% de enzima respectivamente. El tratamiento con 0,1 % de enzima y 45 minutos ó 0,2% y 30 minutos permitió mantener las propiedades de resistencias, deteriorándose las mismas, al incrementar el tiempo de residencia por encima de 30 minutos con 0,2% de enzima. Finalmente, los autores concluyeron que, bajo condiciones apropiadamente controladas, es posible mejorar la drenabilidad sin pérdida de las propiedades de resistencias del producto final y que esta mejora puede ser utilizada para aumentar la velocidad de la máquina o incrementar la dilución de la pulpa en la cabeza de la máquina, mejorando la formación de la hoja y las propiedades mecánicas del papel resultante.

Sarkar et al (17) investigaron la interacción de varios tipos de celulasas y polímeros para mejorar la drenabilidad de las fibras recicladas en el laboratorio y en la fábrica. Al realizar los tratamientos independientes con enzima o con polímero, mejoraron la drenabilidad de la pulpa y en el caso del tratamiento de fibras recicladas solamente con polímero, se puede producir flóculos. Pero, al combinar dichos tratamientos, con bajos dosajes de enzima y polímero, obtuvieron incrementos significativos en la drenabilidad y produjeron una hoja potencialmente más uniforme.

Unos años después *Bhardwaj et al* (18), evaluaron los efectos producidos por diferentes aditivos químicos, funcionales y de mejora de procesos, y tratamientos enzimáticos con Pergalase sobre el drenaje y las propiedades de resistencia de una pulpa conteniendo recortes de corrugado kraft y cajas corrugadas. Encontraron que el efecto del tratamiento con enzima fue limitado para mejorar el drenaje a 39,6% sobre el de control, sin ningún apreciable cambio en las propiedades de resistencia de las

pulpas. Sin embargo, el tratamiento de pulpa con varios aditivos químicos resultó en una importante mejora en el drenaje, con las mismas propiedades de resistencia que la de la pulpa reciclada. Los mejores resultados obtenidos fueron cuando usaron una poliacrilamida aniónica.

Oksanen et al estudiaron el efecto de celulasas y hemicelulasas purificadas sobre las propiedades de pulpas kraft recicladas. Emplearon una pulpa kraft reciclada blanqueada ECF con posteriores etapas de secado y refino. La pulpa reciclada fue tratada con hemicelulasas, celulasas y combinación de ambas a partir de *Trichoderma reesei*. Los cambios causados en las propiedades de la fibra por los tratamientos enzimáticos fueron caracterizados midiendo el valor de retención de agua, el valor SR y las propiedades de resistencia de las hojas de laboratorio. Las pérdidas de propiedades de resistencia y WRV sobre el secado pueden ser recuperadas, casi al nivel inicial, refinando entre los ciclos. El índice de tracción aumentó como una función de los reciclados mientras que el índice de desgarró descendió ligeramente. Sin embargo un intenso refino ocasionó un deterioro en las propiedades de drenaje, por ejemplo, incrementó el valor del SR. La enzima endoglucanasa fue más efectiva en mejorar el drenaje, mientras la celobiohidrolasa no tuvo prácticamente efecto. La resistencia de la pulpa fue, sin embargo, negativamente afectada hasta con bajos dosajes de endoglucanasa. Los tratamientos con xilanasa y mananasa mejoraron los cambios solo ligeramente. Aunque el drenaje puede ser mejorado mediante tratamientos enzimáticos, ninguna de las enzimas puede mejorar el hinchamiento de las fibras recicladas. (Citado en *Enzymes in Pulp and Paper Processing – Chapter 3 (1997)*)

Stork et al (19) examinaron todas las enzimas posibles del sistema de celulasas y hemicelulasas relacionadas a su capacidad para mejorar pulpa reciclada. Ellos concluyeron que la presencia de actividad de endoglucanasa es un prerrequisito para mejorar el drenaje de fibras recicladas por medios enzimáticos. Cuando la actividad de la celobiohidrolasa y la xilanasa está presente, ellas actúan sinérgicamente con la endoglucanasa para mejorar sus efectos. Los efectos de las celulasas sobre fibras de pulpa química y fibras conteniendo lignina fueron poco diferentes. Las fibras de pulpa química fueron severamente dañadas y completamente desintegradas en una incubación prolongada, pero las propiedades de resistencia de fibras de pulpa mecánica reciclada fueron solo ligeramente afectadas.

En publicaciones recientes, *Eriksson et al* (2) investigaron el efecto del refino en combinación con tratamiento enzimático (Pergalase A 40) sobre la drenabilidad y las propiedades de resistencia de distintas pastas reciclada. Los resultados presentados por los autores mostraron que la Pergalase A 40 puede ser usada como agente de mejora de drenaje para fibras secundarias, presentando mínimas pérdidas de resistencia especialmente para grado cartón.

Pere et al (20) examinaron los efectos de 4 celulasas (2 endoglucanasas y 2 celobiohidrolasas) purificadas a partir de *Trichoderma reesei* sobre las propiedades de resistencia de una pulpa kraft de pino no blanqueada. Las 4 celulasas exhibieron diferencias significativas en su modo de acción sobre la pulpa, todo esto considerado a partir de los productos de la hidrólisis y la viscosidad de la pulpa. Las celobiohidrolasas (CBH) solamente tuvieron un efecto muy modesto sobre la viscosidad de la pulpa. En contraste, en las endoglucanasas (EG) la viscosidad descendió dramáticamente incluso a bajo dosaje de enzima. Es claro que las 4 celulasas purificadas de *T. reesei* tuvieron efectos profundamente diferentes sobre las propiedades de la pulpa. Por otra parte, los resultados demuestran que no todas las celulasas son perjudiciales para las propiedades de resistencia (17).

Yamaguchi y Yaguchi (21) publicaron los efectos de un pretratamiento con enzima sobre el batido aplicado a papeles especiales, como papel para condensador, glassine y papel delgado o fino, con el propósito de reducir el consumo de energía durante el batido. Emplearon pulpa kraft de conífera no blanqueada en la investigación de papeles condensados y pulpa kraft blanqueada de conífera y latifoliada en la investigación de papeles glassine y finos y en cuanto a las enzimas que evaluaron en este estudio, fueron 5 enzimas comerciales. Los resultados que obtuvieron fueron satisfactorios para los 3 tipos de papeles, ahorrando entre un 10 a 20 % de energía en la etapa de refino.

Mansfield et al (22) examinaron el potencial uso de enzimas hidrolíticas para mejorar las características de las fibras de pulpas química y mecánica derivadas de Douglas-fir, particularmente la fracción gruesa de ellas. El efecto del tratamiento enzimático sobre las propiedades varió con la carga de enzima. Una carga de 1 mg de proteína por gramo de pulpa seca mejoró la densidad de la hoja y la lisura, incrementó la drenabilidad de la pulpa y redujo el grosor de la fibra, aunque disminuyeron levemente las propiedades de resistencia. En general, las fracciones de

fibras largas encontraron la misma respuesta al tratamiento como la pulpa total no fraccionada. Sin embargo, la resistencia a la tracción para la fracción de pulpa kraft incrementó con el tratamiento con enzima, mientras que, la pulpa no fraccionada, sufrió una ligera declinación. Esto sugiere la posibilidad de mejorar las propiedades de la pulpa con tratamientos selectivos de las fracciones de fibras individuales.

Kanterlinen et al (23) buscaron visualizar los cambios morfológicos en la estructura de las fibras causados por un tratamiento enzimático, con el propósito de mejorar el drenaje en una pulpa kraft de conifera blanqueada. Emplearon para los tratamientos enzimáticos una enzima comercial (Pergalase A 40) constituida por una mezcla de celulasa y hemicelulasa. Como resultados de sus experiencias lograron mejoras significativas en el drenaje pero no hubo un descenso en la cantidad total de finos. Durante los tratamientos, muy poca cantidad de azúcares fueron solubilizados, e informaron que no fue dañada la estructura de la fibra.

Clark et al (24) ampliaron el trabajo realizado por *Pere et al* (20). Describieron los efectos de 6 enzimas purificadas (dos Xilanasas, una celobiohidrolasa y tres endoglucanasas a partir de *T. reesei*) sobre las propiedades de pulpas kraft de pino radiata blanqueada y no blanqueada. Estudiaron las características de las enzimas y sus efectos sobre la química y resistencia de las fibras. La segunda parte de este estudio estuvo enfocado sobre los efectos de las propiedades de la fibra y del papel. En las pulpas blanqueadas encontraron un incremento en la remoción de carbohidratos, después del tratamiento con algunas enzimas. La depolimerización de la celulosa después de los tratamientos con endoglucanasas fue correlacionada fuertemente con el descenso de la resistencia de las fibras, es decir, índice de la tracción zero span en húmedo. La resistencia de las fibras descendió después del tratamiento con endoglucanasa, también correlacionada fuertemente con la pérdida de resistencia de las hojas de ensayo. Ellos sugirieron que el debilitamiento de las hojas de ensayo en húmedo por el tratamiento con endoglucanasas fue mantenido debido al debilitamiento de las fibras individuales y no a cambios en el grado de unión interfibras o disminución en la longitud de las fibras.

Mansfield y Saddler (25) propusieron como objetivo verificar si las enzimas hidrolíticas podrían ser utilizadas para mejorar las características de las pulpas químicas derivadas del Douglas-fir. Si estas enzimas pudieran selectivamente actuar

sobre la pared celular o en la pared S_2 , el lumen o simultáneamente en ambos, es posible que la naturaleza inflexible y rígida de las fibras gruesas pudiera modificar para mejorar la colapsabilidad y la unión interfibras; todo esto para que las fibras de Douglas-fir puedan ser empleadas en el mercado aparte de las aplicaciones tradicionales de pulpa kraft. Emplearon pulpa química de Douglas-fir, la que fue fraccionada en el clasificador Bauer-Mc Nett y los diferentes tratamientos enzimáticos fueron realizados con celulasa preparada a partir de *Humicola insolens* y xilanasa comercial, obtenida a partir de *Trichoderma longibrachiatum*. Los tratamientos enzimáticos realizados resultaron en alteraciones en las características de las fibras de pulpa kraft, lo cual finalmente es trasladado a cambios en las propiedades del papel. Ellos concluyeron que la reducción de la resistencia de las fibras observada con los tratamientos enzimáticos estaría directamente relacionada a la remoción de material superficial de las fibras.

Kibblewhite y Wong (26) propusieron verificar las observaciones realizadas en estudios previos (24) usando una pulpa kraft de pino radiata y bajo dosaje de enzima, con la necesidad de mejorar las calidades de fabricación del papel para retener y/o mejorar sus ventajas competitivas en el mercado. Para ello evaluaron el potencial uso de enzimas que degradan carbohidratos, aplicando cinco endoglucanasas y una xilanasa. En el tratamiento con xilanasa, encontraron que se pueden aumentar selectivamente las propiedades de las hojas de ensayo y esto, posiblemente, debido al mantenimiento en la resistencia de las fibras. En cuanto a los tratamientos con las endoglucanasas causaron disminución de la resistencia de la fibra, sin disolución significativa de carbohidratos de la pared, cuando se usaron bajas dosis de enzimas.

Seo et al (27) realizaron tratamientos combinados de una enzima rica en celulasa (Liftase A 40) y acción mecánica de refino sobre una pulpa química de conífera y latifoliada. El pretratamiento con enzima acortó el tiempo de refino causando cortes en las fibras, y el tratamiento post enzima removió las microfibrilas a nivel molecular mejorando el drenaje sin bajar significativamente la longitud de fibra. La capacidad de unión de los finos fue disminuida en el caso del pretratamiento enzimático. Ellos concluyeron que estos resultados experimentales podrían ser aplicados a diferentes fábricas, dependiendo de las necesidades o limitaciones de cada una.

Suurnäkki et al (28) estudiaron los efectos producidos por celulasas a partir de *Trichoderma reesei* (EG I, EG II, CBH I, CBH II) sobre las propiedades de una pulpa kraft de conífera blanqueada ECF. Las distintas celulasas empleadas exhibieron diferencias en su modo de acción sobre el material celulósico. En las CBHs la viscosidad descendió menos que en las EGs y además, observaron diferencias entre las CBH I y CBH II. La resistencia de la pulpa fue más reducida por el tratamiento con la EG II que con la EG I y el efecto de las EGs sobre las propiedades de resistencia de la pulpa después del batido fue más dependiente del dosaje de enzima usado en el tratamiento.

Mansfield, Dickson y Saddle (29) evaluaron la combinación del fraccionamiento de fibras con tratamientos enzimáticos, para aumentar la calidad de papel producido a partir de una pulpa kraft de conífera totalmente blanqueada. La aplicación de celulasa en la fracción más gruesa permite una menor susceptibilidad en el daño de las fibras largas. Se observaron significativas mejoras en las propiedades de la hoja, antes y después del refino, como resultado del incremento en el área de unión relativa. Las celulasas inducen a alteraciones en la morfología de la fibra resultando tanto en el aumento de la flexibilización como en el colapso de la fibra, lo cual mejora la consolidación de la hoja.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Este trabajo apunta a mejorar la calidad papelera de pastas provenientes de papeles reciclados, tendiente a potenciar su aprovechamiento técnico económico como fuente de materia prima para la industria papelera.

1.3.2. Objetivo Específico

Estudiar las modificaciones producidas por los tratamientos enzimáticos con Pergalase A 40 (una mezcla de celulasas y hemicelulasas) sobre las fibras de una pasta química no blanqueada, reciclada en laboratorio.

Realizar los diferentes tratamientos enzimáticos siguiendo un diseño experimental, con el fin de poder establecer el efecto de cada una de las variables sobre las respuestas y si existe interacción entre ellas.

Con el tratamiento con enzimas se pretende ejercer una acción hidrolítica controlada sobre los carbohidratos de la pared celular, con el propósito de poder mejorar el potencial de unión (bonding) entre fibras y/o aumentar la capacidad de drenaje de las pastas. Se trata de evaluar si su acción proviene de cambios en la fibrilación externa de las fibras y/o en el contenido de los finos.

Evaluar los resultados de los tratamientos enzimáticos desde el punto de vista de la mejora de la flexibilización de la pared celular y de los cambios en la superficie de las fibras y su trascendencia como alternativa de mejoramiento de pastas recicladas.

Además, se analiza sobre una pasta tratada enzimáticamente, el consumo de energía durante el tratamiento mecánico de refino, en comparación con la pasta de referencia con tratamiento de refino.

1.4. Justificación

Hoy en día el papel usado se recicla en mayores proporciones que cualquier otra materia prima industrial. Se entiende que la reutilización del papel debe potenciarse hasta sus límites posibles, pero ello debe ser compatible con la utilización de fibras vírgenes. Siempre se necesitará un cierto flujo de fibras nuevas, ya que, por un lado, es imposible la recolección del papel viejo utilizable, y por otro lado, el proceso de reciclado produce pérdidas en las distintas etapas de recuperación de las fibras. A esto hay que sumarle la pérdida de propiedades papeleras que sufren las fibras en cada ciclo de uso (4) (6) (8) (12).

El rápido incremento en la utilización de fibras recicladas para usos como papeles y cartones ha estimulado el desarrollo de distintos procesos de mejoramiento de las mismas (4) (7) (8).

Los métodos que se conocen para recuperar alguna o todas las propiedades de resistencia de fibras recicladas son: tratamiento mecánico de refino, aditivos químicos, fraccionamiento, mezclado, tratamientos químicos, tratamientos enzimáticos y modificaciones en la máquina papelera (12).

En este trabajo se estudia el tratamiento enzimático con una mezcla de celulasas y hemicelulasas como una alternativa de mejora de una pasta kraft sin blanquear, de fibra larga reciclada en laboratorio, a través del análisis del efecto de

las distintas variables del tratamiento sobre las propiedades de resistencia y demanda de energía mecánica. Se cuantifica la incidencia de dichas acciones sobre las propiedades básicas de las fibras y su relación con las propiedades físicas de los papeles obtenidos.

Con el uso de enzima, planteado en el trabajo, se espera contribuir al aumento y desarrollo de nuevas aplicaciones, hasta el momento limitadas, en el campo celulósico-papelero.

Los resultados de esta investigación colaborarán en el aumento de la calidad de fibras recicladas, proporcionándoles de este modo un mayor valor económico como fuente de materia prima para la elaboración de papeles, traducándose en un aumento de la tasa de utilización de las mismas, con la consiguiente disminución de su vertido a basurales.

Las usuarias específicas de los resultados del trabajo serán una importante cantidad de pequeñas y medianas empresas dedicadas a la elaboración de papeles onda y/o "test liner" a partir de recortes. Los resultados positivos que se esperan del tratamiento con enzimas serán de aplicación directa por parte de dichos emprendimientos fabriles.

CAPÍTULO 2

Metodología

2.1. Metodología

El trabajo propuesto se fundamenta en la ejecución de un ajustado diseño experimental, para lo cual se utiliza la metodología de superficie de respuesta, con el fin de poder establecer el efecto de cada uno de los factores en estudio en el tratamiento enzimático sobre las respuestas y si existe interacción entre ellos.

Con los tratamientos enzimáticos establecidos según el diseño experimental escogido, se pretende ejercer una acción hidrolítica controlada, altamente específica, sobre los carbohidratos de la pared celular con el objeto de mejorar el potencial de unión de las fibras y/o aumentar la capacidad de drenaje de las pastas.

Se evaluaron dichos resultados desde el punto de vista de cambios en la flexibilización de la pared celular y en las superficies de las fibras y su trascendencia como alternativa de mejora de las fibras a partir de papeles reciclados.

Por otro lado, se estudió el efecto del tratamiento enzimático en combinación con refino mecánico sobre las propiedades de las pastas y papeles. Esta combinación tiene como fin principal el análisis del consumo de energía de la pasta tratada versus la sin tratamiento.

2.2. Plan de Actividades

Las etapas previstas para realizar la presente propuesta son las siguientes y se esquematizan, algunas de ellas, en el cronograma del plan de actividades de la Figura 2.1:

1. Preparación de la pasta reciclada

Se parte de una pasta industrial kraft de pino sin blanquear, secada una vez. Es suficiente un solo ciclo de formación en máquina para lograr cambios importantes en las propiedades de la pasta que se produce con los sucesivos reusos de la pulpa.

Partiendo de la pasta reciclada, preparada en la máquina continua de la planta piloto, se desintegra en hidrapulper para: realizar la caracterización de la misma, los distintos tratamientos enzimáticos (seguidos según el diseño experimental), el refino estándar en molino PFI y los tratamientos combinados de enzima y posterior refino.

2. Caracterización de la pasta reciclada

Para poder estimar las modificaciones que se producen por los distintos tratamientos (enzimáticos, mecánico de refino y combinación de ellos) se realizó la caracterización de la pasta reciclada de partida, estableciéndose así el estado de referencia de la misma. El fraccionamiento y las propiedades medidas a la pasta reciclada son iguales a las que se describen posteriormente en las etapas 6 y 7.

3. Caracterización de la enzima Pergalase A 40

Se determinó la actividad enzimática frente a sustratos estándares: carboximetilcelulosa, papel de filtro y xilano, mediante la estimación de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) según la técnica publicada por la Comisión de Biotecnología de la IUPAC (30).

4. Tratamientos enzimáticos: según el diseño experimental

Siguiendo un diseño experimental central compuesto, con centro y estrella se realizó el análisis de los factores: carga de enzima (s/pulpa seca) y tiempo de tratamiento, ya que se trabajó a la temperatura y pH óptimos de la enzima en particular y a una consistencia fija de 10 %.

En el licor residual, se siguió la hidrólisis enzimática a través de la estimación de azúcares reductores (30) y la determinación del pH final.

5. Tratamiento combinado de enzima y refino en molino de laboratorio

En base a los resultados obtenidos en el punto anterior, se eligió un tratamiento enzimático y con la pasta tratada se realizó una curva de refino en condiciones estándar en el molino de laboratorio PFI a 2000, 4000 y 6000 revoluciones. Se determinó para la pasta tratada y sin tratar el consumo de energía y drenabilidad.

6. Fraccionamiento de las pastas

El análisis de los efectos producidos en los diferentes tratamientos se realizó sobre las propiedades de las pastas enteras y de sus correspondientes fracciones fibrosas F-100 separadas a través del clasificador Bauer McNett, según la Técnica SCAN - M6:69.

Por el examen microscópico de las distintas fracciones obtenidas se decidió seleccionar la fracción F+100 como aquella representativa de la fracción “Fibrosa”.

7. Evaluación de las propiedades en las pastas enteras y sus correspondientes fracciones fibrosas

Se realizó la cuantificación de los finos en condiciones dinámicas con la jarra de drenaje Britt de las pastas enteras, según la Norma Tappi T261 cm – 00. Para ajustar el punto final de la determinación del porcentaje de finos y realizar experiencias comparables, se empleó un turbidímetro portátil Hach, modelo 2100 P - Rango 0,01 a 1000 NTU.

Las drenabilidades, medidas como ml de Canadian Standard Freeness (CSF), de las pastas enteras se determinaron según la Técnica SCAN C 21:65. Se siguió la misma norma para la fracción F+100, pero ajustando previamente el equipo en temperatura y la suspensión fibrosa en temperatura y consistencia, de modo de evitar correcciones posteriores sobre estos parámetros por ser sus valores muy elevados.

Se evaluaron los cambios en el grado de hinchamiento e hidratabilidad de la pared fibrosa tanto a las pastas enteras como a las pastas fraccionadas, a través del valor de retención de agua total (WRV_t) e interfibra (WRV_i). Este último se efectúa desplazando el agua exterior, entre fibras, por intercambio con éter y posterior evaporación del mismo, según (31).

Se prepararon las hojas de laboratorio de las pastas enteras y de las fracciones fibrosas según Técnica SCAN-C 26:76 y se acondicionaron las mismas según Técnica SCAN P2; para luego medir las siguientes propiedades físicas: Densidad Aparente según Norma Tappi T 220 om-88; Gramaje según Norma Tappi T 410 om-98; Espesor según Norma Tappi T 411 om-89; Índice de tracción, según Norma Tappi T 494 om-88; Índice de rasgado, según Norma SCAN-P 11:73 y Coeficiente de dispersión de luz, según Norma Tappi T 425 om-91.

Para visualizar el estado superficial de las fibras se realizaron observaciones por microscopía óptica. Para ello se empleó la coloración diferencial de Simons que es sensible a las variaciones en la accesibilidad a la estructura interna de las fibras según (32).

Se midió la viscosidad intrínseca en cuprietilendiamina para determinar el grado de polimerización (DP) –promedio viscosimétrico- de la fracción de polisacáridos, según Marx-Figini (33).

Pasta Reciclada en Laboratorio

Estado de Referencia de la Pasta Reciclada

Tratamientos Enzimáticos Según Diseño Experimental

Tratamiento Mecánico de Refino en Molino PFI

Tratamiento Combinado Enzima + Refino

Curva de Refino

0 - 2000 - 4000 - 5000 rev.

Curva de Refino

0 - 2000 - 4000 - 6000 rev.

Bauer Mc Nett

Bauer Mc Nett

Bauer Mc Nett

Bauer Mc Nett

Evaluación de la Pasta Entera

Evaluación de la Fracción Fibrosa

Evaluación de la Pasta Entera

Evaluación de la Fracción Fibrosa

Evaluación de la Pasta Entera

Evaluación de la Fracción Fibrosa

Evaluación de la Pasta Entera

Evaluación de la Fracción Fibrosa

Evaluación del Licor

- pH final
- Azúcares

- % Finos
- CSF
- WRV_t y WRV_i
- $Dp_{prom.}$
- Propiedades Físicas

- CSF
- WRV_t y WRV_i
- Propiedades Físicas

CAPÍTULO 3

Enzimas

3.1. Características generales

Las enzimas (34) constituyen un gran número de catalizadores biológicos naturales, altamente específicos, que aceleran y controlan reacciones bioquímicas.

Las enzimas se producen dentro de las células, pero pueden actuar fuera de ella y pueden ser aisladas sin que pierdan su actividad. Estos biocatalizadores son proteínas macromoleculares con una estructura definida. Dependiendo de su lugar de reacción, las enzimas se subdividen en:

- ⊕ Endoenzimas, que actúan dentro de las células y controlan los procesos del metabolismo interno.
- ⊕ Exoenzimas, que son excretadas por la célula para la degradación de un sustrato insoluble en productos solubles capaces de difundirse a través de la membrana celular.

3.2. Modo de acción del complejo enzimático

Estudios sobre las enzimas extracelulares (35) obtenidas a partir de varios hongos celulolíticos, particularmente los de las especies *Trichoderma*, han proporcionado información básica sobre el mecanismo de acción de las celulasas.

Existen opiniones diferentes con respecto a la especificidad de las distintas enzimas y los roles que éstas cumplen en la disolución de la celulosa en sus diversas formas. A pesar de estas diferencias, se puede hacer una generalización respecto del modo de acción y propiedades de los componentes individuales que comprenden el sistema enzimático celulasa.

En el cultivo de hongos celulolíticos, hay al menos tres componentes que juntos constituyen un sistema multienzimático de celulasa que degradan los sustratos celulósicos a azúcares solubles por su acción sinérgica. Los tres principales tipos de enzimas encontradas en el sistema de celulasa que pueden degradar a la celulosa cristalina son:

- ⊕ exocelobiohidrolasa (EC 3.2.1.91, 1,4-β-D-glucan celobiohidrolasa),
- ⊕ endo-1,4-β-D glucanasa (EC 3.2.1.4, 1,4-β-D-glucan glucanohidrolasa) y

⇒ β -glucosidasa (EC 3.2.1.21, β -D-glucosidasa, glucohidrolasa, o celobiasa)

Las *exocelobiohidrolasas* se encuentran como componentes mayoritarios en algunos sistemas de celulasas, pero en la mayoría están ausentes.

Todas las enzimas parecen existir en múltiples formas, las cuales difieren en sus actividades relativas sobre una gran variedad de sustratos.

Las *endo-1,4- β -D glucanasas* hidrolizan las cadenas de celulosa al azar, para producir un rápido cambio en el grado de polimerización. Los sustratos sobre los que actúan estas enzimas incluyen carboximetilcelulosa (CMC), celulosa hinchada en álcali o ácido fosfórico, pero no atacan significativamente la celulosa cristalina tal como la fibra de algodón o Avicel.

La hidrólisis de la celulosa amorfa produce una mezcla de glucosa, celobiosa y otros celooligosacáridos solubles. La velocidad de hidrólisis de las cadenas de celooligosacáridos es alta y aumenta con el grado de polimerización. La glucosa y celobiosa son los principales productos de reacción.

Las *exo-1,4- β -glucanasas* provenientes de hongos, actúan eliminando glucosa o celobiosa a partir del extremo no reductor de la cadena. La celobiohidrolasa es la enzima más común.

La fibra de algodón no es atacada en grado significativo, pero la celulosa hinchada en ácido fosfórico es hidrolizada con una lenta caída en el grado de polimerización. Para la separación y medición de celobiohidrolasa, el Avicel es un sustrato muy útil.

Las *β -glucosidasas* no son estrictamente Celulasas pero son componentes muy importantes en el sistema de celulasas, ya que completan la hidrólisis a glucosa de cadenas cortas de celooligosacáridos y celobiosas, liberadas por otras enzimas.

Los sistemas de celulasas que tienen bajos niveles de β -glucosidasa, tienen escaso poder de sacarificación debido a la inhibición de endoglucanasas y celobiohidrolasas por celobiosa.

3.3. Descripción de la enzima de trabajo: Pergalase A 40

La enzima que se empleó para los diferentes tratamientos enzimáticos es una Enzima líquida cuyo nombre comercial es Pergalase A 40 de Genencor International, Inc.

Pergalase A 40 (36) es una mezcla de enzimas extracelular obtenida a partir de un cultivo seleccionado de *Trichoderma longibrachiatum*.

La mezcla sinérgica de enzimas celulasa y hemicelulasa está especialmente destinada para mejorar el drenaje y el refinado en la producción de papeles o para aumentar la calidad de las fibras.

El principal componente está normalmente referido a la actividad de la celulasa que en este caso particular, presenta una actividad declarada frente a la carboximetilcelulosa de 2500 UI/ml.

Actúan bajo condiciones estrictas de temperatura y pH; si no se usan en condiciones adecuadas se desnaturalizan y se destruyen. Para esta enzima en particular, las condiciones de reacción recomendadas en la hoja técnica son:

- ☞ Temperatura = 35 – 55 ° C
- ☞ pH = 4.0 – 6.5
- ☞ Tiempo de reacción = 20 – 90 min
- ☞ Consistencia de la pulpa = 3 – 4 %

3.3.1. Aplicaciones

Es una enzima fácil de usar y se suministra como solución acuosa y simplemente se mezcla con la pulpa.

La misma se puede adicionar al flujo de pulpa, antes o después del tratamiento mecánico de refinado primario, en una relación de 0,7 a 1,5 l/tn de papel, dependiendo de los requerimientos y la configuración de la máquina.

Es una enzima que se puede aplicar en el tratamiento de distintos tipos de pulpas y papeles a saber:

- ☞ Papeles especiales tales como los altamente refinados en los que el beneficio que aporta la Pergalase se puede reflejar en incrementos de las

velocidades de la máquina o en la calandra, manteniendo la misma calidad del papel, o reflejado en mejorar la calidad del papel manteniendo los niveles de velocidad original.

- Pulpas para onda NSSC-fluting en donde se puede obtener un apreciable incremento en la velocidad de la máquina y mejoras en la runnability.
- Pulpas para papeles de impresión sin pasta mecánica donde el tratamiento con enzima mejora el batido, lo cual incrementa la resistencia de unión interna (scott Bond) y reduce la tendencia al ampollado (blistering).
- Papeles de impresión conteniendo pasta mecánica donde el uso de enzima resulta en mejoras en drenaje y runnability de la máquina reduciendo los problemas de pitch.
- Cartón de fibras recicladas donde la enzima permite aumentar la cantidad de fibras recicladas de baja calidad manteniendo la velocidad de drenaje.
- Papel con resinas de resistencia en húmedo (repulpados de refiles “broke” o papeles de desecho). Esta tecnología reduce o elimina el consumo de químicos agresivos y disminuye el daño en las fibras.

3.3.2. Beneficios

Los beneficios claves que aporta esta enzima en la industria papelera son:

- Incrementos mayores del 10 % en la velocidad de la máquina, resultando en una mejora en el drenaje.
- Ahorros de energía en el tratamiento mecánico de refinó y secado por encima del 20 %.
- Calidades papeleras más estables y más altas.
- Aumento en la resistencia de unión interna.
- Mejora en la transparencia sin problemas relacionados a la floculación.
- Mejoras en la runnability.
- Baja los costos de insumos.

CAPÍTULO 4

Parte Experimental y Resultados

4.1. Pasta reciclada

4.1.1. Materia prima y preparación de la pasta reciclada

La materia prima que se utilizó para obtener la pasta reciclada es una Pasta virgen Kraft de pino no blanqueada, provista por la empresa Papel Misionero S.A. (Argentina) en forma de planchas secas, de N° Kappa 35,2 y de CSF 730 ml.

Las planchas de pasta se desintegraron durante 50 minutos al 1 % de consistencia, en un pulper Black Clawson de 150 l de capacidad. Luego de espesar la pulpa y a fin de caracterizar la misma, se realizó una curva de refino en molino de laboratorio PFI, entre 0 y 12000 revoluciones en condiciones estándar, determinándose consumo de energía y drenabilidad.

En base a estos resultados, se simuló el proceso de reciclado refinando la pasta en molino PFI hasta 445 ml de CSF (**PE**), ya que muchas máquinas papeleras comerciales operan a ó cerca de este nivel de freeness (8). Con posterioridad se secó en la máquina papelera, velocidad máxima 6 m/min, 30 cm de ancho de tabla, equipada con cilindro secador (presión de vapor de trabajo 2 kg/cm²), constituyendo esta última, la materia prima inicial (**RE**) que se utilizó en todo el desarrollo del presente trabajo.

El propósito de esta operatoria fue obtener una pasta reciclada perfectamente caracterizada a partir de un solo tipo de fibra, ya que se consideró más adecuado para el estudio del fenómeno básico involucrado y a su vez, eliminar una variable significativa como es la composición del recorte.

4.1.2. Evaluación de la etapa de reciclado

Para evaluar la efectividad en la etapa de reciclado en laboratorio, se realizó una comparación de las propiedades de la materia prima y de la pasta reciclada, tanto a las Pastas Enteras como a sus correspondientes Fracciones Fibrosas.

En la Tabla 4.1. se muestran las propiedades de la pasta virgen Kraft de pino sin blanquear antes (**PE** y **PF**) y después (**RE** y **RF**) del tratamiento de reciclado. Analizando el cambio porcentual de dichos valores se puede visualizar, tanto la efectividad como la intensidad del tratamiento del reciclado efectuado en laboratorio.

Tabla 4.1: Propiedades de pasta Kraft de pino sin blanquear antes y después del tratamiento de reciclo.

PASTA	WRV_t (gH₂O/gfib)	WRV_i (gH₂O/gfib)	CSF (ml)	Densidad (g/cm³)	I.Tracción (Nm/g)	I.Desgarro (mNm²/g)	Coeff.Scatt. (m²/kg)
Entera							
Inicial PE	1,99	1,68	445	0,602	66,5	13,7	19,0
Reciclada RE	1,73	1,38	495	0,561	42,1	18,4	21,6
Cambio %	-13	-18	-10	-9	-36	+34	+14
Fracción +100							
Inicial PF	1,80	1,51	760	0,599	62,5	16,4	18,3
Reciclada RF	1,40	1,16	745	0,549	38,1	17,7	20,9
Cambio %	-13	-23	-2	-8	-39	+8	+14

4.2. Determinación de la actividad enzimática

Para medir la actividad de la enzima PERGALASE A 40, se seleccionó la metodología establecida por la Comisión de Biotecnología de la IUPAC (30). Esta consiste en determinar la concentración de enzima requerida para alcanzar una determinada acción en un cierto tiempo, es decir, una producción de 0,5 mg de glucosa a partir de carboximetilcelulosa o 0,5 mg de xilosa a partir de xilano o 2 mg de glucosa a partir de papel de filtro.

Según la hoja técnica de la enzima Pergalase A 40 (33), ésta tiene una actividad declarada frente a la carboximetilcelulosa de 2500 UI/ml, definiendo una unidad (IU) como la cantidad de enzima que libera un μmol de azúcares reductores por minuto a condiciones óptimas de pH y temperatura de la enzima.

1 UI = $1\mu\text{mol min}^{-1}$ de producto liberado en la hidrólisis.

1 UI = $0,18\text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}$ cuando el producto es glucosa (PM Glucosa = 180 gr/mol)

1 UI = $0,15\text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}$ cuando el producto es xilosa (PM Xilosa = 150 gr/mol)

La caracterización de la enzima se realizó determinando su actividad frente a sustratos estándares: carboximetilcelulosa (Fluka), xilano (Sigma: Xylan from Birchwood) y papel de filtro (Whatman N°1), mediante la estimación de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (30) y es el propuesto para seguir la hidrólisis en los diferentes tratamientos enzimáticos sobre las pastas.

Las condiciones empleadas en las determinaciones de las actividades enzimáticas frente a los diferentes sustratos antes mencionados, se listan en la Tabla 4.2.

Las mediciones de las absorbancias a 540 nm se realizaron en un espectrofotómetro marca SHIMADZU UVPC de doble haz.

Tabla 4.2: Condiciones empleadas en la determinación de las actividades enzimáticas frente a los sustratos.

Sustrato	Tiempo de tratamiento	pH	Temperatura
CMC	30 min.	6 (Buffer fosfato)	45 °C
XILANO			
PAPEL DE FILTRO	60 min.		

4.2.1. Determinación de la actividad enzimática frente a la carboximetilcelulosa (CMC) por el método del ácido dinitrosalicílico

Sustrato:

Solución de Carboximetilcelulosa al 1,5 % en solución de buffer fosfato 0,1 M, pH 6.

Procedimiento:

En las Figuras 4.1. y 4.2. se muestran los esquemas de preparación de los tubos para hacer la curva de calibrado de glucosa / buffer / CMC y para la determinación de la actividad enzimática frente a la CMC.

A un tubo de ensayo de 25 ml se le agregan 0,5 ml de solución de enzima diluida en buffer fosfato. Se deben hacer por lo menos dos diluciones de cada muestra de enzima investigada, de modo tal que presenten una producción levemente mayor y otra levemente menor que 0,5 mg de azúcares reductores expresados como glucosa en las condiciones de reacción.

A cada uno de los tubos se le adicionan 0,5 ml de solución de sustrato y se mezcla bien, luego se colocan en un baño termostático a 45 °C durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se retiran del baño, se les agregan 3 ml de reactivo DNS y se mezcla.

Se hierven por exactamente 5 minutos en un baño de agua, a ebullición vigorosa.

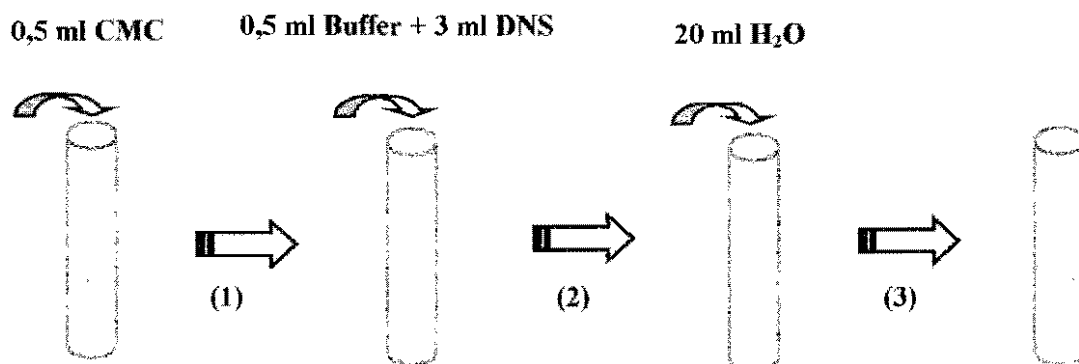
El procedimiento seguido a las muestras, blanco de enzimas, estándar de glucosa y el cero del espectro, es el mismo que el de la muestra de enzima, pero sólo se adicionan los 0,5 ml de sustrato estándar y es importante que se hiervan juntas.

Luego, se transfieren inmediatamente a un baño de agua fría. Se agregan 20 ml de agua destilada y se mezcla, por inversión completa del tubo varias veces; la solución debe separarse del fondo del tubo en cada inversión.

Se acondicionan a 30°C y se mide el color formado contra el cero del espectro a 540 nm. Cuando es necesario (cuando se usan diluciones pequeñas) el color formado en el blanco de enzima es restado del color del tubo de muestra.

Figura 4.1.: Esquema de la metodología seguida para realizar la Curva Glucosa / Buffer / CMC.

Espectro Cero



Estándar de Glucosa

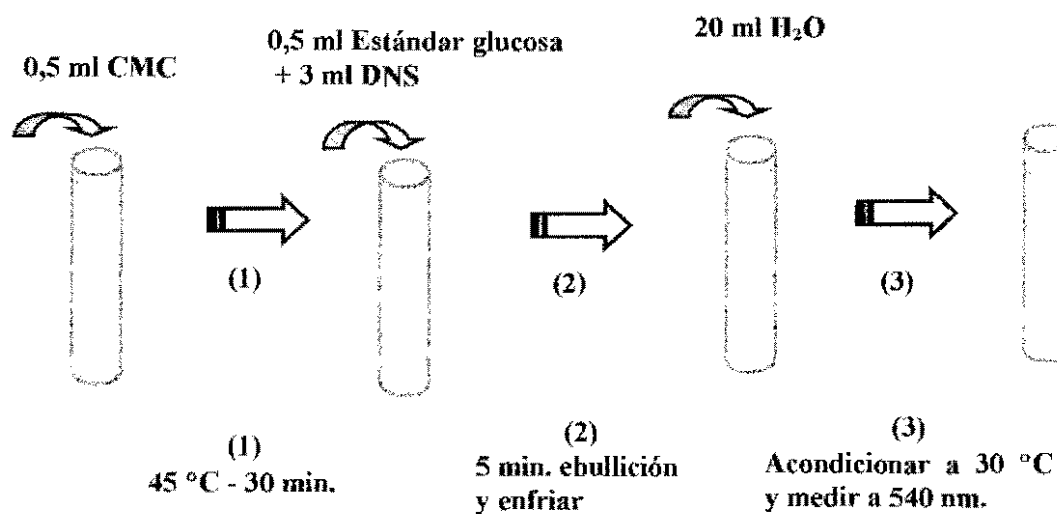
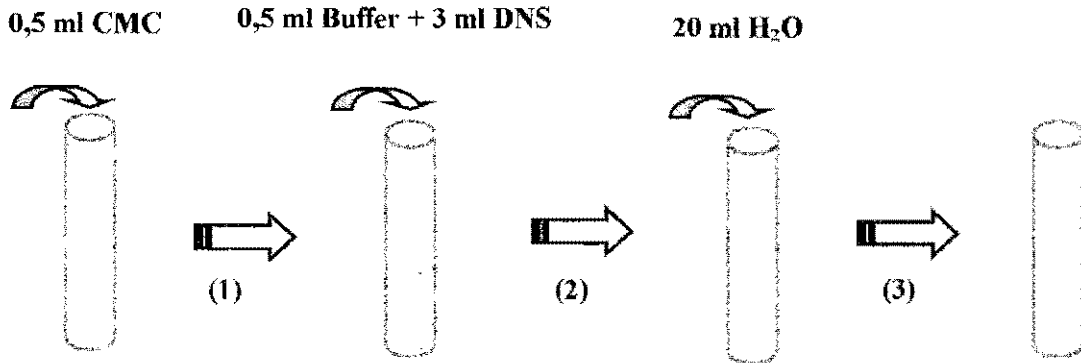
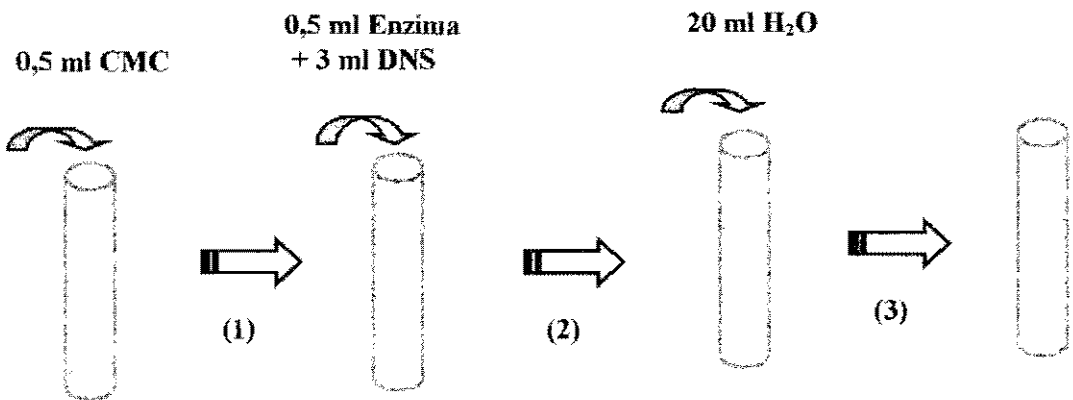


Figura 4.2.: Esquema de la metodología seguida para determinar la Actividad enzimática frente a la CMC.

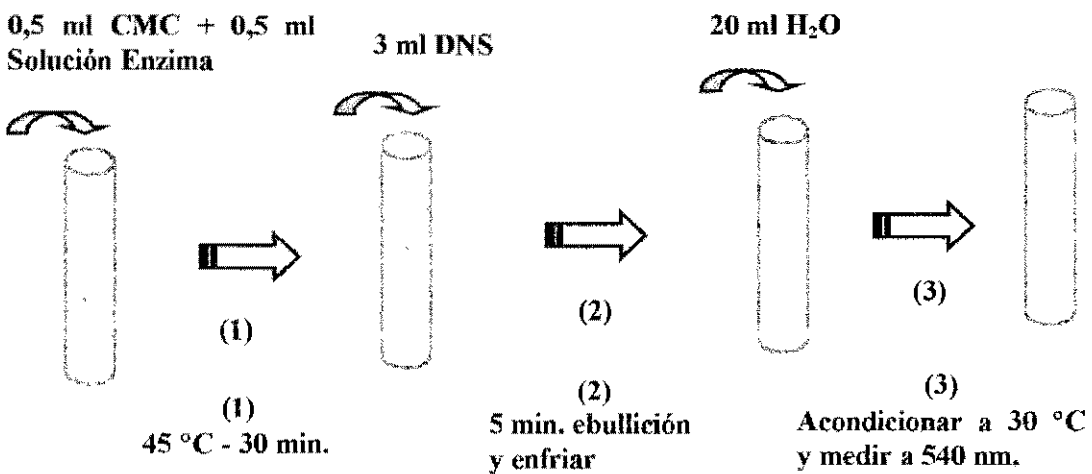
Espectro Cero



Blanco de Enzima



Muestra de Enzima



La absorbancia de la muestra se transforma (corregida, si es necesario, por sustracción del blanco de enzima) en producción de glucosa durante la reacción, usando la curva de calibrado de estándar de glucosa / buffer / CMC.

Cálculo de unidades:

Se construye una gráfica de absorbancia (A_{540}) versus estándar de glucosa, usando cantidades absolutas de glucosa (mg/0,5 ml).

Utilizando esta curva, se transforman los valores de absorbancias de las muestras de enzima (luego de restarle el blanco de enzima) en glucosa (= mg de glucosa producida durante la reacción).

Luego se estima la concentración de enzima que habrían liberado exactamente 0,5 mg de glucosa, por medio de una gráfica de glucosa liberada versus concentración de enzima en escala semilogarítmica.

Derivación de las unidades CMC:

La unidad CMC se basa en la Unidad Internacional (UI). La cantidad crítica de glucosa en el ensayo con la CMC es 0,5 mg:

$$0,5 \text{ mg glucosa} = 0,5 / 0,18 \text{ } \mu\text{mol}$$

Esta cantidad de glucosa es producida por 0,5 ml en 30 min.

$$0,5 \text{ mg glucosa} = 0,5 / 0,18 \times 0,5 \times 30 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}\text{ml}^{-1}$$

Así, la cantidad estimada de enzima (conc. crítica de enzima, ml ml⁻¹) que da 0,5 mg de glucosa en la reacción contiene 0,185 UI, y:

$$\text{CMC} = 0,185 / \text{concentración crítica de enzima UI ml}^{-1} \quad \text{Ec. 4.1.}$$

4.2.2. Resultados Obtenidos para la CMC

Curva de calibrado de Glucosa / Buffer fosfato / CMC:

Los datos para obtener la curva de calibrado se muestran en la Tabla 4.3. y en la Figura 4.3. se grafica la absorbancia (A_{540}) versus estándar de glucosa, usando cantidades absolutas de glucosa (mg/0,5 ml).

Tabla 4.3.: Absorbancias medidas a 540 nm en función de la cantidad de glucosa en mg/0,5ml.

Glucosa (mg/0,5 ml)	Absorbancia _{540nm}
0	0
0,2	0,134
0,4	0,293
0,8	0,575
1,2	0,727

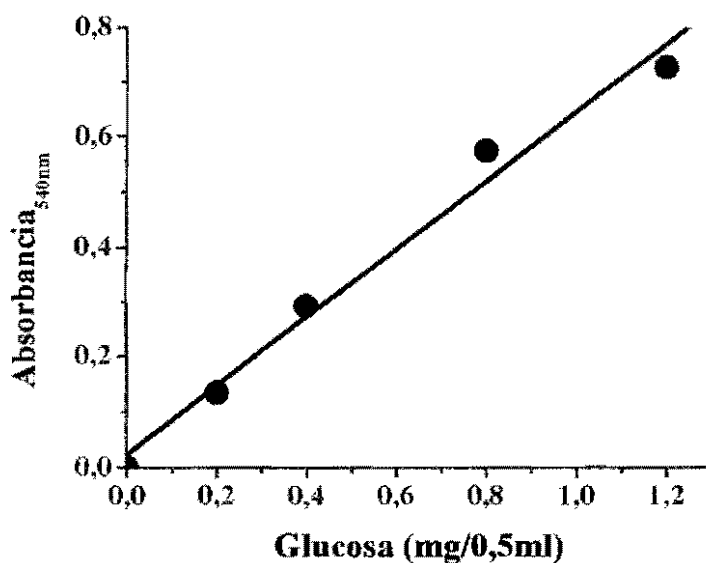


Figura 4.3.: Curva de regresión correspondiente a Glucosa / Buffer fosfato / CMC.

Del análisis de regresión lineal se obtiene la Ecuación 4.2; con un coeficiente de correlación lineal $R = 0,9919$.

$$\text{Absorb}_{540\text{nm}} = 0,0223 + 0,6221 \text{ Glucosa (mg/0,5 ml)} \quad \text{Ec. 4.2}$$

Actividad de la enzima frente a la CMC:

Las diluciones de las enzimas empleadas para la determinación de actividad se muestran en la Tabla 4.4.

A partir de la ecuación 4.2., se transforman los valores de absorbancia en glucosa producida en la reacción, considerando en cada caso la absorbancia del blanco de enzima como se muestra en la Tabla 4.4.

Con el fin de obtener una recta, en la Figura 4.4., se grafica glucosa producida versus el logaritmo de la concentración de la enzima.

Tabla 4.4.: Absorbancias medidas a 540 nm para la determinación de la actividad enzimática frente a la CMC.

Concentración Enzima (%)	Log Conc. Enzima	Absorbancia (*)	Δ Absorbancia (#)	Glucosa Producida
5.25 10 ⁻³	-2.2798	b = 0.000	0.308	0.4592
		E = 0.308		
0,05	-1.30103	b = 0.001	0.480	0.7357
		E = 0.481		
0,1	-1	b = 0.001	0.517	0.7952
		E = 0.518		
0,2	-0.69897	b = 0.002	0.553	0.8530
		E = 0.555		

(*) b = absorbancia del blanco y E = absorbancia de la muestra de enzima.

(#) Δ Absorbancia = Absorbancia_E - Absorbancia_b

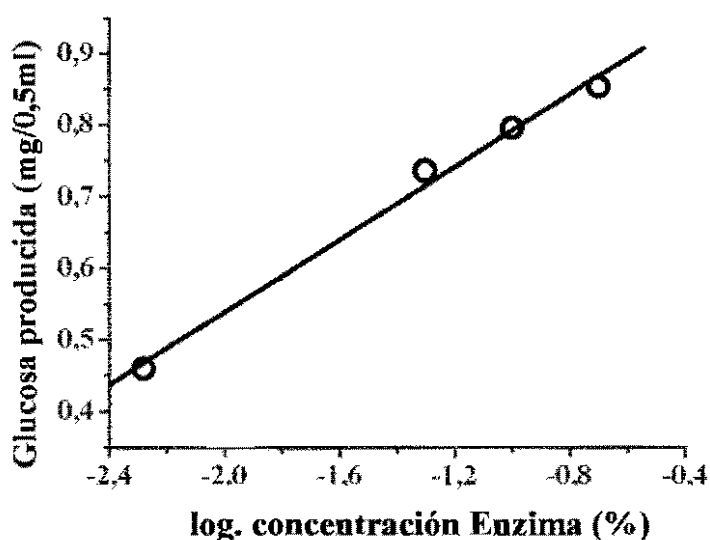


Figura 4.4: Curva de regresión de la determinación de la actividad enzimática frente a la CMC.

Del análisis de regresión lineal, se obtiene la siguiente ecuación, con un coeficiente de correlación lineal $R = 0,9961$

$$\text{Gluc. Prod. (mg/0,5 ml)} = 1,0453 + 0,2534 \log, C_{\text{enz}} \quad \text{Ec. 4.3.}$$

A partir de la ecuación 4.3. se estima la concentración de enzima que habría liberado exactamente 0,5 mg de glucosa, denominada Concentración Crítica. Con ésta y con la ecuación 4.1. se calcula la actividad enzimática frente a CMC, como se muestra a continuación.

Concentración crítica de enzima = $7,05 \cdot 10^{-3} \%$ para 0,5 mg de glucosa

Actividad CMC = $0,185 / \text{concentración crítica de enzima UI ml}^{-1}$

$CMC_{\text{asa}} = 0,185 * 100 / 7,05 \cdot 10^{-3} \text{ UI ml}^{-1}$

$$CMC_{\text{asa}} = 2624 \text{ UI/ml}$$

4.2.3. Determinación de la actividad enzimática frente al Xilano por el método del ácido dinitrosalicílico

Sustrato:

Solución de Xilano al 2,0 % en solución de buffer fosfato 0,1 M, pH 6.

Procedimiento:

En la preparación de los tubos para realizar la curva de calibrado del estándar de xilosa / buffer / XILANO y determinar la actividad frente al XILANO, se procede exactamente de la misma manera como en las Figuras 4.1. y 4.2. pero en este caso se debe colocar como sustrato, solución de Xilano.

Cálculo de unidades:

Se sigue el mismo procedimiento de cálculo que se utilizó para la CMC y a partir de la concentración crítica de enzima, se definen las unidades de xilano.

Derivación de las unidades XILANO:

La unidad del XILANO se basa en la Unidad Internacional (UI). La cantidad crítica de xilosa en el ensayo con el xilano es 0,5 mg:

$$0,5 \text{ mg xilosa} = 0,5 / 0,15 \text{ } \mu\text{mol}$$

Esta cantidad de xilosa es producida por 0,5 ml en 30 min.

$$0,5 \text{ mg xilosa} = 0,5 / 0,15 \times 0,5 \times 30 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}\text{ml}^{-1}$$

Así, la cantidad estimada de enzima (conc. crítica de enzima, ml ml⁻¹) que da 0,5 mg de xilosa en la reacción contiene 0,222 UI, y:

$$\mathbf{XIL = 0,222 / \text{concentración crítica de enzima UI ml}^{-1}} \quad \mathbf{Ec. 4.4.}$$

4.2.4. Resultados obtenidos para el XILANO**Curva de Xilosa / Buffer fosfato / XILANO:**

Los datos para obtener la curva de calibrado se muestran en la Tabla 4.5. y se grafican en la Figura 4.5., utilizando cantidades absolutas de xilosa (mg/0,5 ml).

Tabla 4.5.: Absorbancias medidas a 540 nm en función de las cantidades de xilosa en mg/0,5ml.

Xilosa (mg/0,5 ml)	Absorbancia _{540nm}
0	0
0,24	0,232
0,47	0,447
0,71	0,644
1,18	1,033

Del análisis de regresión lineal se obtiene la Ecuación 4.5., con un coeficiente de correlación lineal R = 0,9992.

$$\mathbf{Absorb_{540nm} = 0,01932 + 0,8709 \text{ Xilosa (mg/0,5 ml)}} \quad \mathbf{Ec. 4.5.}$$

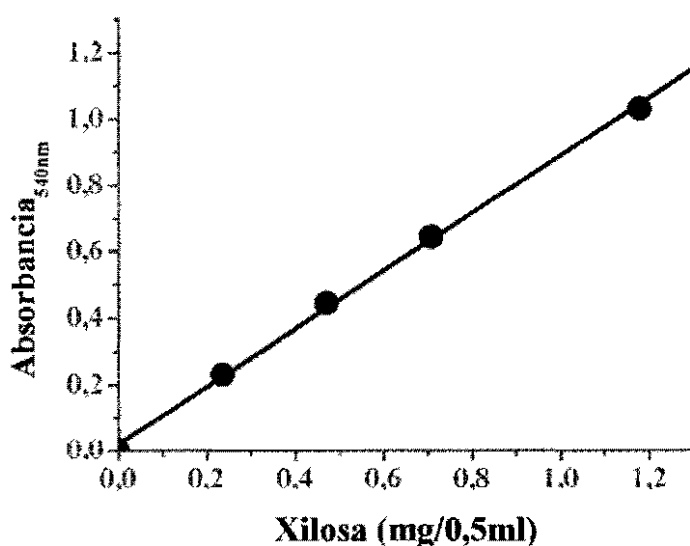


Figura 4.5.: Curva de regresión correspondiente a Xilosa / Buffer fosfato / XILANO.

Actividad de la enzima frente al XILANO:

Las diluciones de las enzimas empleadas para la determinación de actividad se muestran en la Tabla 4.6.

A partir de la ecuación 4.5., se transforman los valores de absorbancia en xilosa producida en la reacción; considerando en cada caso la absorbancia del blanco de enzima como se muestra en la Tabla 4.6..

Tabla 4.6.: Absorbancias medidas a 540 nm para la determinación de la actividad enzimática frente al XILANO.

Concentración Enzima (%)	Log Conc. Enzima	Absorbancia (*)	Δ Absorbancia (#)	Xilosa Producida
0,05	-1.30103	b = 0.002	0.325	0.351
		E = 0.327		
0,1	-1	b = 0.005	0.492	0.543
		E = 0.497		
0,2	-0.69897	b = 0.010	0.691	0.771
		E = 0.701		
0,4	-0.39794	b = 0.021	0.869	0.976
		E = 0.890		

(*) Absorbancias del blanco (b) y de muestra de enzima (E).

(#) Δ Absorbancia = Absorbancia_E - Absorbancia_b

Con el fin de obtener una recta, en la Figura 4.6., se grafica xilosa producida versus el logaritmo de la concentración de la enzima.

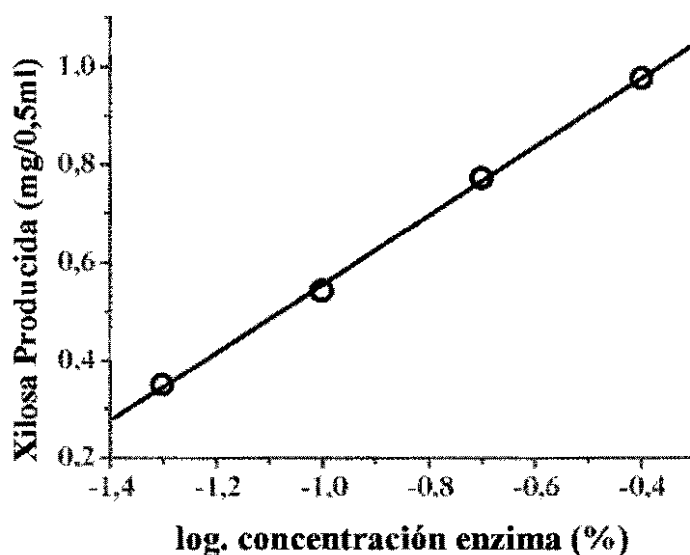


Figura 4.6.: Curva de regresión de la determinación de la actividad enzimática frente al XILANO.

Del análisis de regresión lineal, se obtiene la siguiente ecuación de regresión, con un coeficiente de correlación lineal $R = 0,9995$.

$$\text{Xil. Prod. (mg/0,5 ml)} = 1,2533 + 0,6982 * \log. C_{enz} \quad \text{Ec. 4.6.}$$

A partir de la ecuación 4.6. se estima la concentración de enzima que habría liberado exactamente 0,5 mg de xilosa, denominada Concentración Crítica. Con ésta y con la ecuación 4.4. se calcula la actividad enzimática frente al XILANO, como se muestra a continuación.

Concentración de enzima crítica = 0,083 % para 0,5 mg de xilosa

Actividad XILANO = 0,222 / concentración crítica de enzima UI ml⁻¹

$XIL_{asa} = 0,222 * 100 / 0,083 \text{ UI ml}^{-1}$.

$$\text{XIL}_{asa} = 268 \text{ UI/ml}$$

4.2.5. Determinación de la actividad enzimática frente al papel de filtro (PF) por el método del ácido dinitrosalicílico

Sustrato:

Tiras de papel de filtro Whatman N° 1, aproximadamente 1 x 6 cm (\approx 50 mg).

Procedimiento:

En este caso se adiciona una tira de papel de filtro y se incuba a 45 °C durante 60 minutos. Para medir el color formado contra el espectro cero a 540 nm en el espectrofotómetro, se espera que la pulpa decante aproximadamente 20 minutos.

En las Figuras 4.7. y 4.8. se muestran esquemas de la preparación de los tubos para realizar la curva de glucosa / buffer / PF y determinar la actividad frente al PF. El tubo del espectro cero se usa para llevar el espectrofotómetro a absorbancia cero.

Se determina el valor de la absorbancia del blanco de enzima y se resta al valor del tubo de reacción correspondiente.

Cálculo de unidades:

Se sigue el mismo procedimiento de cálculo que se utilizó para la CMC y a partir de la concentración crítica de enzima, se definen las unidades del papel de filtro.

Derivación de las unidades del PF:

La cantidad crítica de glucosa en el ensayo con el papel de filtro es 2,0 mg:

$$2,0 \text{ mg glucosa} = 2,0 / 0,18 \mu\text{mol}$$

Esta cantidad de glucosa es producida por 0,5 ml de enzima en 60 min. de reacción.

$$2,0 \text{ mg glucosa} = 2,0 / 0,18 \times 0,5 \times 60 \mu\text{mol min}^{-1}\text{ml}^{-1}$$

Así, la cantidad estimada de enzima (conc. crítica de enzima, ml ml^{-1}) que da 2,0 mg de glucosa en la reacción contiene 0,37 UI, y:

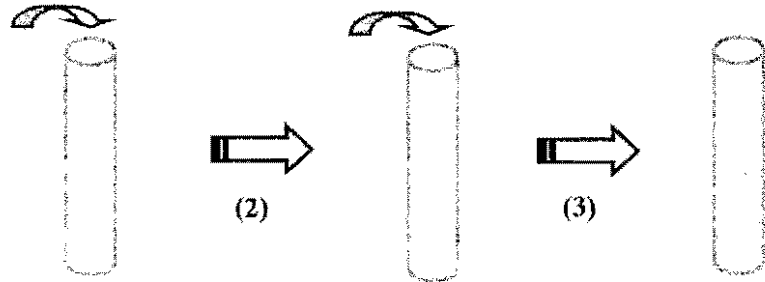
$$\text{PF} = 0,37 / \text{concentración crítica de enzima UI ml}^{-1} \quad \text{Ec. 4.7.}$$

Figura 4.7.: Esquema de la metodología seguida para realizar la Curva Glucosa / Buffer / PF.

Espectro Cero

1,5 ml Buffer + 3 ml DNS

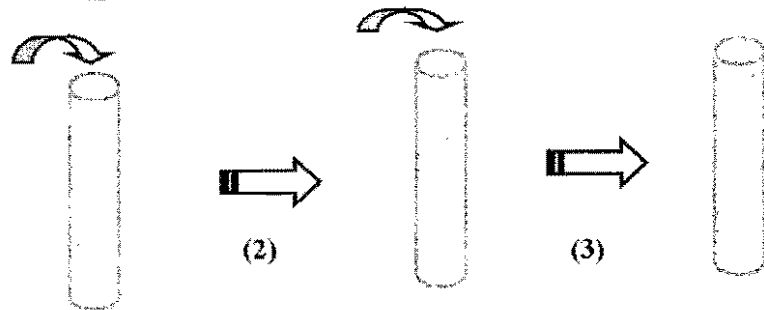
20 ml H₂O



Estándar de Glucosa

1 ml Buffer + 0,5 ml Estándar
Glucosa + 3 ml DNS

20 ml H₂O

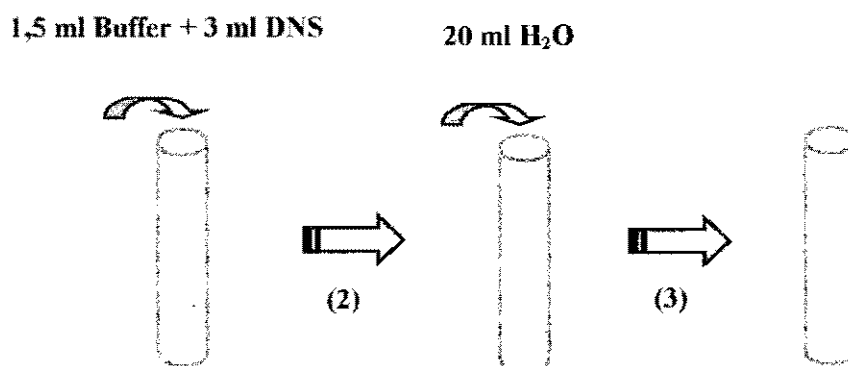


(2)
5 min. ebullición
y enfriar

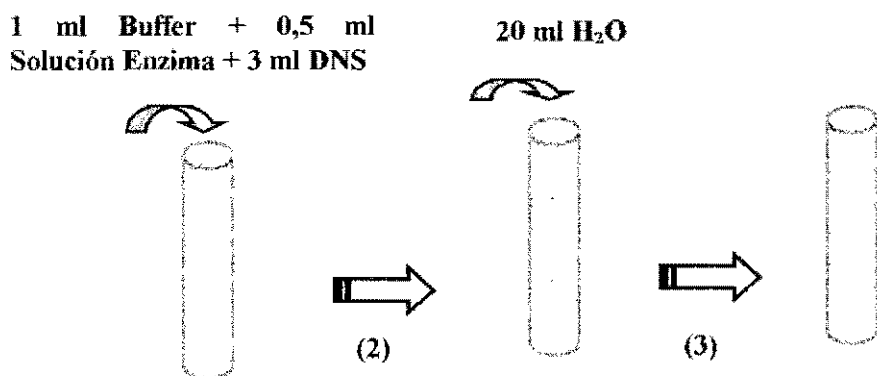
(3)
Acondicionar a 30 °C
y medir a 540 nm.

Figura 4.8.: Esquema de la metodología seguida para determinar la Actividad enzimática frente al PF.

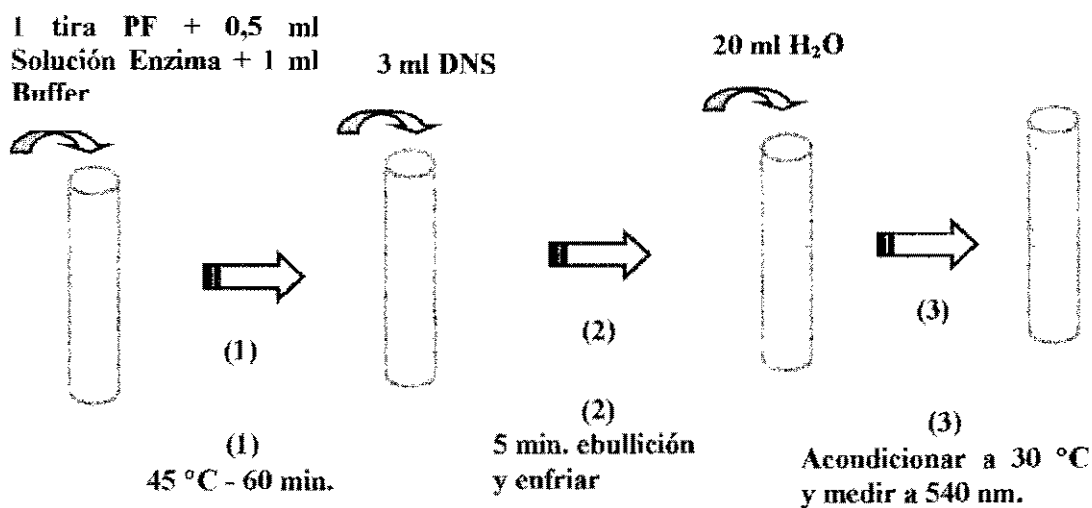
Espectro Cero



Blanco de Enzima



Muestra de Enzima



4.2.6. Resultados obtenidos para el PAPEL DE FILTRO

Curva de Glucosa / Buffer fosfato / PF:

Los datos para obtener la curva de calibrado se muestran en la Tabla 4.7. y se grafican en la Figura 4.9., utilizando cantidades absolutas de glucosa (mg/0,5 ml).

Tabla 4.7.: Absorbancias medidas a 540 nm en función de las cantidades de glucosa en mg/0,5ml.

Glucosa (mg/0,5 ml)	Absorbancia _{540nm}
0	0
0,50	0,299
0,83	0,488
1,24	0,714
1,66	0,964

Del análisis de regresión lineal se obtiene la Ecuación 4.8; con un coeficiente de correlación $R = 0,9998$.

$$\text{Absorb}_{540\text{nm}} = 0,00499 + 0,5780 \text{ Glucosa (mg/0,5 ml)} \quad \text{Ec. 4.8}$$

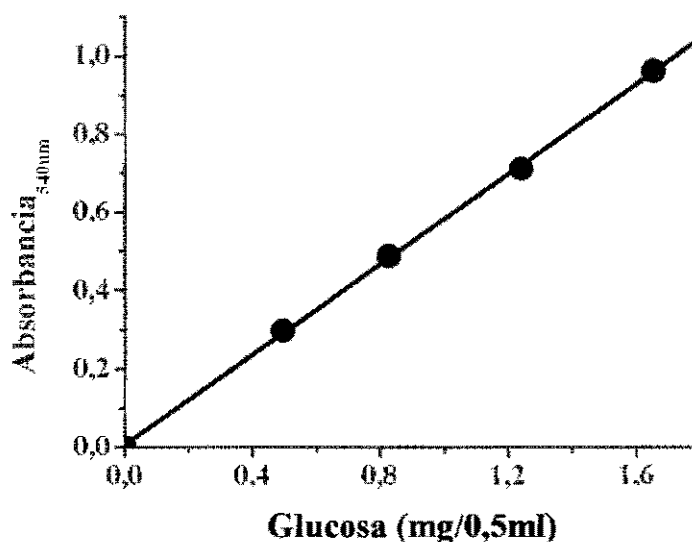


Figura 4.9.: Curva de regresión correspondiente a Glucosa / Buffer fosfato / PF.

Actividad de la enzima frente al PF

Las diluciones de las enzimas empleadas para la determinación de actividad se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8.: Absorbancias medidas a 540 nm para la determinación de la actividad enzimática frente al papel de filtro.

Concentración Enzima (%)	Log Conc. Enzima	Absorbancia (*)	Δ Absorbancia (#)	Glucosa Producida
0,5	-0.30103	b = 0.001	0.811	1.3944
		E = 0.812		
1,2	0.0791712	b = 0.013	1.146	1.9739
		E = 1.159		
3,0	0.4771	b = 0.104	1.473	2.5396
		E = 1.577		
4,5	0.6532	b = 0.165	1.553	2.6780
		E = 1.718		
6,0	0.7781	b = 0.165	1.603	2.7645
		E = 1.768		

(*) Absorbancias del blanco (b) y de muestra de enzima (E).

(#) Δ Absorbancia = Absorbancia_E - Absorbancia_b

A partir de la ecuación 4.8., se transforman los valores de absorbancia en glucosa producida en la reacción; considerando en cada caso la absorbancia del blanco de enzima como se muestra en la Tabla 4.8.

Con el fin de obtener una recta, en la Figura 4.10. se grafica glucosa producida versus el logaritmo de la concentración de la enzima.

Del análisis de regresión lineal, se obtiene la siguiente ecuación de regresión, con un coeficiente de correlación lineal $R = 0,9934$.

$$\text{Gluc. Prod (mg/0,5 ml)} = 1,8332 + 1,29489 \log. C_{\text{enz}} \quad \text{Ec. 4.9.}$$

A partir de la ecuación 4.9. se estima la concentración de enzima que habría liberado exactamente 2,0 mg de glucosa, denominada Concentración Crítica. Con ésta y con la ecuación 4.7., se calcula la actividad enzimática frente al PAPEL DE FILTRO, como se muestra a continuación.

Concentración de enzima crítica = 1,345 % para 2 mg de glucosa

PF = 0,37 / concentración crítica de enzima UI ml⁻¹ = 0,37 * 100 / 1,345 UI ml⁻¹

$$\text{PF}_{\text{asa}} = 28 \text{ UI/ml}$$

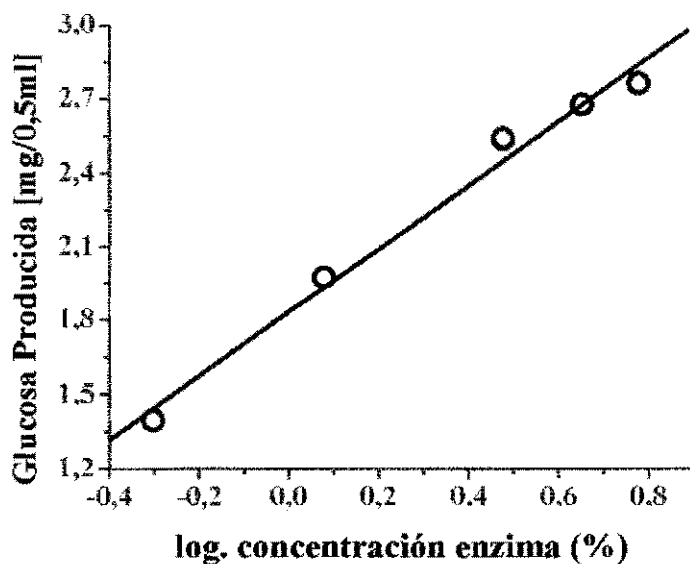


Figura 4.10.: Curva de regresión de la determinación de la actividad enzimática frente al PF.

4.2.7. Resultados de la actividad enzimática para la enzima Pergalase A 40

En la Tabla 4.9., se resumen los valores de las actividades enzimáticas frente a los sustratos mencionados anteriormente correspondientes a la enzima de trabajo.

Tabla 4.9.: Actividades de la enzima Pergalase A 40.

SUSTRATO	ACTIVIDAD (UI/ml)
CMC	2.624
XILANO	268
PAPEL DE FILTRO	28

4.2.8. Curva de calibrado con estándares de glucosa

Esta curva se usa para cuantificar los azúcares reductores producidos durante la hidrólisis enzimática realizada a la pasta reciclada.

Estándares de glucosa:

Soluciones de 0,2 - 0,5 mg de glucosa por ml o por 0,5 ml. Para lo cual se partió de una solución madre de 16,5 mg/ml, luego se prepara una solución hija de 4

mg/ml y por último las diluciones de los tubos teniendo en cuenta la cantidad de glucosa deseada en cada uno en mg/0,5ml.

Procedimiento:

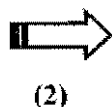
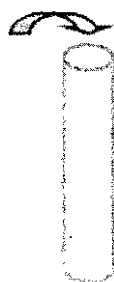
En la Figura 4.11. se muestra el esquema utilizado en la preparación de los tubos para realizar la curva de calibrado con glucosa.

Luego se grafica absorbancia en función de la concentración de azúcar en (mg/0,5ml).

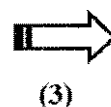
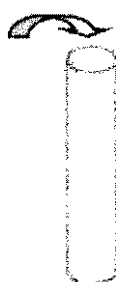
Figura 4.11.: Esquema de la metodología seguida para realizar la curva de calibrado con Glucosa.

Espectro Cero

1 ml Buffer + 3 ml DNS

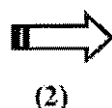
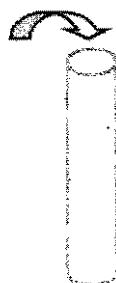


20 ml H₂O

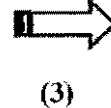
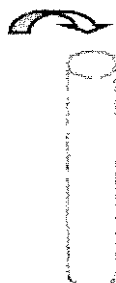


Estándar de Glucosa

0,5 ml Buffer + 0,5 ml Estándar
glucosa + 3 ml DNS



20 ml H₂O



(2)
5 mín. ebullición
y enfriar

(3)
Acondicionar a 30 °C
y medir a 540 nm.

4.2.9. Resultados obtenidos para la curva de calibrado de Glucosa

Los datos para obtener la curva de calibrado se muestran en la Tabla 4.10. y se grafican en la Figura 4.12.

Del análisis de regresión lineal se obtiene la Ecuación 4.10 con un coeficiente de correlación $R = 0,9998$.

$$\text{Absorb}_{540\text{nm}} = -0,00129 + 0,7021 \text{ Glucosa (mg/0,5 ml)} \quad \text{Ec. 4.10}$$

Tabla 4.10.: Absorbancias medidas a 540 nm en función de la cantidad de estándar de glucosa en mg/0,5ml.

Glucosa (mg/0,5 ml)	Absorbancias _{540nm}
0	0
0,2	0,143
0,4	0,268
0,8	0,57
1,0	0,701
1,2	0,838

La ecuación 4.10 es la que se emplea para estimar la cantidad de azúcares reductores liberados durante los distintos tratamientos enzimáticos.

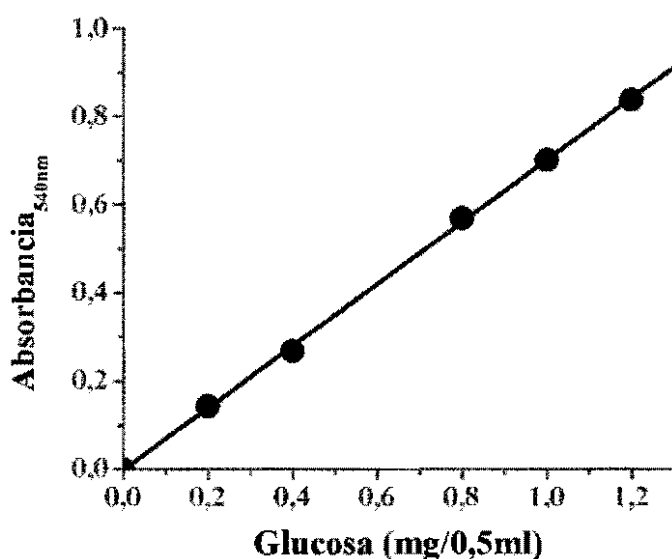


Figura 4.12.: Curva de calibrado con estándar de glucosa.

4.3. Tratamientos enzimáticos según el diseño experimental

El trabajo propuesto se fundamenta en la ejecución de un ajustado diseño experimental y tratamiento estadístico de los resultados. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para establecer el efecto de cada uno de los factores en estudio (carga de enzima y tiempo de tratamiento) sobre las respuestas y si existe interacción entre ellos. Por otro lado, se realizó una evaluación teniendo en cuenta la posible mejora en la calidad desde el punto de vista celulósico-papelero.

Las hidrólisis enzimáticas se llevaron a cabo mediante un diseño central compuesto 2^2 (CCD 2^2) + estrellas + centros; en la Figura 4.13. se puede observar el diseño en sus variables codificadas.

En todos los tratamientos se trabajó a temperatura y pH óptimos de la enzima y consistencia fija de 10 %, de modo que el análisis de los factores se realizó sobre la carga de enzima (s/pulpa seca) y tiempo de tratamiento.

Las condiciones de las hidrólisis se realizaron a: temperatura = 45 ° C; pH = 6 y consistencia = 10 %

El rango de los factores a analizar se fijó en: carga de enzima entre 0,1 y 0,3 %; tiempo de tratamiento entre 30 y 90 minutos.

En la tabla 4.11. se consignan las combinaciones de los tratamientos, el orden en que se hicieron los mismos, las variables codificadas y naturales de las 11 experiencias realizadas según el diseño escogido y los rangos de las variables antes mencionadas.

Los diferentes tratamientos enzimáticos se realizaron en un reactor Batch de Acero Inoxidable de mezcla perfecta de alta consistencia con calefacción indirecta. (Fotografías 4.1. y 4.2.)

Al reactor se le efectuaron algunas modificaciones para adecuarlo a nuestras necesidades, tales como:

- ☉ La incorporación de una doble camisa de acero inoxidable, a fin de poder recircular el agua de calefacción y trabajar a temperatura controlada.

- La regulación de temperatura se realizó mediante un termostato de inmersión, que además de permitir fijar y regular la temperatura, recircula el agua de calefacción.

Procedimiento:

La pasta se diluyó a la consistencia fijada y se ajustó al pH requerido adicionando solución diluida de NaOH. Se llevó al reactor para alcanzar y mantener la temperatura establecida. Luego, teniendo en cuenta la consistencia, se agregó la cantidad de enzima deseada y se mantuvo a 45 ° C por el tiempo establecido según el tratamiento enzimático realizado.

Después del tratamiento enzimático, en un kitasato provisto de un filtro de vidrio poroso se recogió el licor residual para medir el pH y determinar los azúcares reductores; la pasta se colocó en un balde con solución de NaOH a pH 12 con el fin de cortar la reacción de las enzimas y luego se filtró en una bolsa de tela donde se lavó con abundante cantidad de agua hasta alcanzar el pH del agua de lavado.

La pasta se centrifugó y se siguió el proceso como se mencionó en el Capítulo 2: Plan de Actividades en los apartados 6 y 7.

Tabla 4.11.: Condiciones de los diferentes tratamientos enzimáticos.

T _c	Orden	Variables Codificadas		Variables Naturales	
		Carga Enzima	Tiempo	Carga Enzima (%)	Tiempo (min)
EE(1)	7	-1	-1	0,1	30
EE(a)	9	1	-1	0,3	30
EE(b)	3	-1	1	0,1	90
EE(ab)	1	1	1	0,3	90
EE(-αa)	5	-1,41	0	0,05	60
EE(αb)	4	1,41	0	0,35	60
EE(-αb)	2	0	-1,41	0,2	15
EE(αb)	10	0	1,41	0,2	105
EE(0) ₁	6	0	0	0,2	60
EE(0) ₂	8	0	0	0,2	60
EE(0) ₃	11	0	0	0,2	60

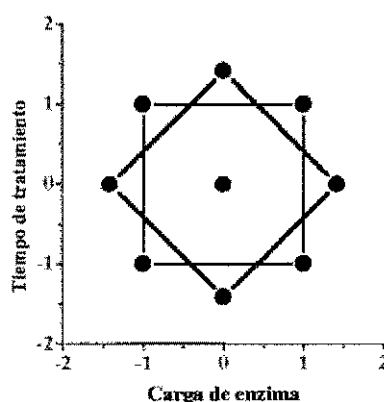


Figura 4.13.: Diseño Central Compuesto 2² + estrellas + centros.



Fotografía 4.1.: Vista general del reactor Batch.



Fotografía 4.2.: Interior del reactor.

4.3.1. Resultados obtenidos según el diseño experimental

En las Tablas 4.12., 4.13. y 4.14. se muestran los resultados correspondientes a las propiedades del licor residual, de las pastas enteras, fracciones fibrosas con y sin tratamientos enzimáticos respectivamente.

Los resultados de las propiedades físicas de la pasta reciclada enteras con y sin tratamientos se encuentran en la Tabla 4.15. y en la Tabla 4.16. se muestran los resultados de las fracciones fibrosas con y sin tratamientos enzimáticos.

En las tablas citadas anteriormente, se incluyen el porcentaje de ganancias ó pérdidas de las distintas propiedades.

Tabla 4.12.: Propiedades del licor residual después de las diferentes combinaciones de los tratamientos enzimáticos según el diseño experimental (EE).

T_c	Carga Enzima (%)	Tiempo (min)	Azúcares Reductores (kg/t)	pH final
EE(1)	0,1	30	1,02	6,2
EE(a)	0,3	30	4,54	6,0
EE(b)	0,1	90	3,60	5,8
EE(ab)	0,3	90	10,8	5,8
EE(-αa)	0,05	60	0,96	5,9
EE(αa)	0,35	60	9,54	5,8
EE(-αb)	0,2	15	1,67	5,9
EE(αb)	0,2	105	5,53	6,0
EE(0)₁	0,2	60	5,22	5,8
EE(0)₂	0,2	60	5,49	5,8
EE(0)₃	0,2	60	5,74	5,9

Tabla 4.13.: Propiedades de la pasta entera reciclada después de las diferentes combinaciones de los tratamientos enzimáticos según el diseño experimental (EE) y de la pasta entera reciclada de referencia (RE).

T _c	Carga Enzima (%)	Tiempo (min)	WRV _i (gH ₂ O/gfib)	% WRV _i	WRV _i (gH ₂ O/gfib)	% WRV _i	DP _{prom.}	% DP _{prom.}	CSF (ml)	% CSF	Finos (%)	% Finos
RE	0	0	1,73		1,38		2144		495		11,6	
EE(1)	0,1	30	1,71	-1,2	1,44	4,3	1713	-20	535	8,1	5,9	-49
EE(a)	0,3	30	1,75	1,2	1,48	7,2	1635	-24	570	15,2	6,9	-40
EE(b)	0,1	90	1,77	2,3	1,48	7,2	1860	-13	525	6,1	4,8	-59
EE(ab)	0,3	90	1,86	7,5	1,60	15,9	1713	-20	600	21,2	6,5	-44
EE(-αa)	0,05	60	1,76	1,7	1,43	3,6	1888	-12	510	3,0	4,8	-59
EE(αa)	0,35	60	1,82	5,2	1,49	8,0	1659	-23	580	17,2	8,5	-27
EE(-αb)	0,2	15	1,77	2,3	1,51	9,4			610	23,2	7,1	-39
EE(αb)	0,2	105	1,89	9,2	1,58	14,5			560	13,1	4,8	-59
EE(0) ₁	0,2	60	1,82	5,2	1,43	3,6			565	14,1	7,3	-37
EE(0) ₂	0,2	60	1,84	6,4	1,50	8,7	1608	-25	580	17,2	6,2	-47
EE(0) ₃	0,2	60	1,87	8,1	1,55	12,3			585	18,2	6,8	-41

Tabla 4.14.: Propiedades de la fracción fibrosa reciclada después de las diferentes combinaciones de los tratamientos enzimáticos (EF) y de la fracción fibrosa reciclada de referencia (RF).

T _c	Carga Enzima (%)	Tiempo (min)	WRV _i (gH ₂ O/gfib)	% WRV _i	WRV _i (gH ₂ O/gfib)	% WRV _i	DP _{prom.}	% DP _{prom.}
RF	0	0	1,40		1,16		2170	
EF(1)	0,1	30	1,51	7,9	1,25	7,8	2050	-5,0
EF(a)	0,3	30	1,45	3,6	1,29	11,2	2038	-6,0
EF(b)	0,1	90	1,54	10,0	1,28	10,3	2116	-3,0
EF(ab)	0,3	90	1,50	7,1	1,24	6,9	1774	-18
EF(-αa)	0,05	60	1,51	7,9	1,31	12,9	2152	-0,8
EF(αa)	0,35	60	1,46	4,3	1,26	8,6	1945	-10
EF(-αb)	0,2	15	1,44	2,9	1,19	2,6		
EF(αb)	0,2	105	1,54	10,0	1,29	11,2		
EF(0) ₁	0,2	60	1,46	4,3	1,27	9,5		
EF(0) ₂	0,2	60	1,48	5,7	1,29	11,2	2106	-3,0
EF(0) ₃	0,2	60	1,48	5,7	1,26	8,6		

Tabla 4.15.: Propiedades físicas de la pasta entera reciclada después de los diferentes tratamientos enzimáticos (EE) y de la pasta entera reciclada de referencia (RE).

T _r	Carga Enzima (%)	Tiempo (min)	Densidad Aparente (g/cm ³)	% Densidad Aparente	Índice de Tracción (Nm/g)	% Índice de Tracción	Índice de Desgarro (mNm ² /g)	% Índice de Desgarro	Coefficiente Scattering (m ² /kg)	% Coeficiente Scattering
RE	0	0	0,561		42,1		18,41		21,61	
EE(1)	0,1	30	0,603	7,5	52,2	24,0	13,92	-24,4	20,95	-3,1
EE(a)	0,3	30	0,603	7,5	51,2	21,6	15,19	-17,5	19,89	-8,0
EE(b)	0,1	90	0,611	8,9	56,6	34,4	12,84	-30,3	19,13	-11,5
EE(ab)	0,3	90	0,595	6,1	48,4	15,0	12,18	-33,8	18,65	-13,7
EE(-αa)	0,05	60	0,619	10,3	51,9	23,3	13,63	-26,0	20,29	-6,1
EE(αa)	0,35	60	0,607	8,2	53,1	26,1	12,3	-33,2	19,52	-9,7
EE(-αb)	0,2	15	0,590	5,2	45,8	8,8	13,81	-25,0	19,74	-8,7
EE(αb)	0,2	105	0,587	4,6	51,2	21,6	12,84	-30,3	19,94	-7,7
EE(0) ₁	0,2	60	0,606	8,0	48	14,0	13	-29,4	20,52	-5,0
EE(0) ₂	0,2	60	0,583	3,9	47,4	12,6	14,16	-23,1	20,13	-6,8
EE(0) ₃	0,2	60	0,592	5,5	49,5	17,6	13,39	-27,3	19,33	-10,6

Tabla 4.16.: Propiedades físicas de la fracción fibrosa reciclada después de los diferentes tratamientos enzimáticos (EF) y de la fracción fibrosa reciclada de referencia (RF).

T_c	Carga Enzima (%)	Tiempo (min)	Densidad Aparente (g/cm^3)	% Densidad Aparente	Índice de Tracción (Nm/g)	% Índice de Tracción	Índice de Desgarro (mNm^2/g)	% Índice de Desgarro	Coefficiente Scattering (m^2/kg)	% Coeficiente Scattering
RF	0	0	0,549		38,1		17,69		20,86	
EF(1)	0,1	30	0,583	6,2	47,1	23,6	16,5	-6,7	19,8	-5,1
EF(a)	0,3	30	0,574	4,6	42,7	12,1	16,44	-7,1	19,34	-7,3
EF(b)	0,1	90	0,588	7,1	50,7	33,1	14,5	-18,0	18,92	-9,3
EF(ab)	0,3	90	0,592	7,8	47	23,4	11,94	-32,5	18,48	-11,4
EF(- α a)	0,05	60	0,570	3,8	47	23,4	15,12	-14,5	19,34	-7,3
EF(α a)	0,35	60	0,588	7,1	46,2	21,3	13,73	-22,4	19,42	-6,9
EF(- α b)	0,2	15	0,588	7,1	44,2	16,0	11,98	-32,3	19,73	-5,4
EF(α b)	0,2	105	0,59	7,5	47,2	23,9	14,16	-20,0	18,98	-9,0
EF(0) ₁	0,2	60	0,582	6,0	43	12,9	15,7	-11,2	19,76	-5,3
EF(0) ₂	0,2	60	0,569	3,6	41,8	9,7	15,91	-10,1	19,28	-7,6
EF(0) ₃	0,2	60	0,585	6,6	43,5	14,2	15,42	-12,8	18,6	-10,8

4.4. Tratamientos combinados de enzima con posterior tratamiento mecánico de refino

De acuerdo a los resultados obtenidos en los tratamientos enzimáticos realizados según el diseño experimental se eligieron las siguientes condiciones: carga de enzima 0,1 % y tiempo de tratamiento 90 minutos. La elección de dichas condiciones es por el elevado IT (Tabla 4.15.) que se alcanzó en dicho tratamiento.

La finalidad del tratamiento combinado fue poder verificar si se pudiera disminuir la intensidad del posterior tratamiento mecánico de refino en una pasta reciclada con tratamiento enzimático, esto como una posible ventaja de reducir el consumo de energía en dicho tratamiento mecánico.

La etapa mecánica de refino se realizó en un refinador de laboratorio PFI en condiciones estándar tanto a la pasta reciclada de referencia como a la pasta reciclada con tratamiento enzimático.

Procedimiento:

Se trazó una curva de refino a la pasta reciclada en el molino PFI a cuatro niveles; cero, 2000, 4000, y 5000 revoluciones y fue el que se tomó como referencia para poder analizar las diferencias logradas con el tratamiento combinado.

Para el tratamiento combinado primero se realizó el tratamiento enzimático en las condiciones antes mencionadas y luego el tratamiento de refino a cuatro niveles de refino; cero, 2000, 4000, y 6000 revoluciones.

A cada una de las muestras se le determinó el consumo de energía, y se siguió como se mencionó en el Capítulo 2: Plan de Actividades en los apartados 6 y 7.

Se realizó una comparación en las propiedades con el propósito de poder observar las modificaciones obtenidas con los diferentes tratamientos.

4.4.1. Resultados obtenidos en los tratamientos combinados

En las Tablas 4.17., 4.18., 4.19. y 4.20. se muestran los resultados obtenidos de las propiedades medidas a las muestras de pastas recicladas enteras y fracciones fibrosas de referencia con refino y con tratamientos combinados de enzima con refino y se incluye el porcentaje de ganancias ó pérdidas de las distintas propiedades.

Tabla 4.17.: Propiedades de la pasta entera reciclada de referencia (RE) y con tratamiento de refino (RE₂₀₀₀, RE₄₀₀₀ y RE₅₀₀₀) y propiedades de la pasta entera reciclada con tratamiento enzimático a 0,1 % y 90 min (EE(b)) y con tratamiento combinado de enzima y refino (EE(b)₂₀₀₀, EE(b)₄₀₀₀ y EE(b)₆₀₀₀).

Tratam.	Revol. Refino	CSF (ml)	% CSF	WRV _i (gH ₂ O/gfib)	% WRV _i	WRV _i (gH ₂ O/gfib)	% WRV _i	Consumo Energía (kWh/t)
RE	0	495		1,73		1,38		
RE ₂₀₀₀	2000	330	-33,3	1,95	12,7	1,6	15,9	440
RE ₄₀₀₀	4000	255	-48,5	2,06	19,1	1,73	25,4	875
RE ₅₀₀₀	5000	210	-57,6	2,10	21,4	1,83	32,6	1065
EE(b)	0	525	6,10	1,77	2,30	1,48	7,2	
EE(b) ₂₀₀₀	2000	360	-27,3	1,96	13,3	1,65	19,6	404
EE(b) ₄₀₀₀	4000	295	-40,4	1,99	15,0	1,68	21,7	712
EE(b) ₆₀₀₀	6000	245	-50,5	1,98	14,5	1,69	22,5	1069

Tabla 4.18.: Propiedades de la fracción fibrosa reciclada de referencia (RF) y con tratamiento de refino (RF₂₀₀₀, RF₄₀₀₀ y RF₅₀₀₀) y propiedades de la fracción fibrosa reciclada con tratamiento enzimático a 0,1 % y 90 min (EF(b)) y con tratamiento combinado de enzima y refino (EE(b)₂₀₀₀, EE(b)₄₀₀₀ y EE(b)₆₀₀₀).

Tratam.	Revol. Refino	CSF (ml)	% CSF	WRV _i (gH ₂ O/gfib)	% WRV _i	WRV _i (gH ₂ O/gfib)	% WRV _i
RF	0	745		1,40		1,16	
RF ₂₀₀₀	2000	745	0,0	1,60	14,3	1,32	13,8
RF ₄₀₀₀	4000	725	-2,7	1,68	20,0	1,41	21,6
RF ₅₀₀₀	5000	730	-2,0	1,64	17,1	1,42	22,4
EF(b)	0	735	-1,3	1,54	10,0	1,28	10,3
EF(b) ₂₀₀₀	2000	745	0,0	1,61	15,0	1,30	12,1
EF(b) ₄₀₀₀	4000	735	-1,3	1,55	10,7	1,32	13,8
EF(b) ₆₀₀₀	6000	725	-2,7	1,55	10,7	1,33	14,7

Tabla 4.19.: Propiedades físicas de la pasta entera reciclada de referencia (RE) y con tratamiento de refinado (RE₂₀₀₀, RE₄₀₀₀ y RE₅₀₀₀) y propiedades físicas de la pasta entera reciclada con tratamiento enzimático a 0,1 % y 90 min (EE(b)) y con tratamiento combinado de enzima y refinado (EE(b)₂₀₀₀, EE(b)₄₀₀₀ y EE(b)₆₀₀₀).

Tratam.	Revol. Refino	Densidad Aparente (g/cm ³)	% Densidad Aparente	Índice de Tracción (Nm/g)	% Índice de Tracción	Índice de Desgarro (mNm ² /g)	% Índice de Desgarro	Coefficiente Scattering (m ² /kg)	% Coeficiente Scattering
RE	0	0,561		42,1		18,41		21,61	
RE ₂₀₀₀	2000	0,643	14,6	67,5	60,3	11,13	-39,5	19,34	-10,5
RE ₄₀₀₀	4000	0,66	17,6	78,3	86,0	10,29	-44,1	17,85	-17,4
RE ₅₀₀₀	5000	0,657	17,1	76	80,5	10,35	-43,8	18,65	-13,7
EE(b)	0	0,611	8,9	56,6	34,4	12,84	-30,3	19,13	-11,5
EE(b) ₂₀₀₀	2000	0,633	12,8	67,4	60,1	10,3	-44,1	18,73	-13,3
EE(b) ₄₀₀₀	4000	0,645	15,0	69,7	65,6	11,15	-39,4	18,55	-14,2
EE(b) ₆₀₀₀	6000	0,639	13,9	70,1	66,5	10,63	-42,3	18,72	-13,4

Tabla 4.20.: Propiedades físicas de la fracción fibrosa reciclada de referencia (RF) y con tratamiento de refino (RF₂₀₀₀, RF₄₀₀₀ y RF₅₀₀₀) y propiedades físicas de la fracción fibrosa reciclada con tratamiento enzimático a 0,1 % y 90 min (EF(b)) y con tratamiento combinado de enzima y refino (EF(b)₂₀₀₀, EF(b)₄₀₀₀ y EF(b)₆₀₀₀).

Tratam.	Revol. Refino	Densidad Aparente (g/cm ³)	% Densidad Aparente	Índice de Tracción (Nm/g)	% Índice de Tracción	Índice de Desgarro (mNm ² /g)	% Índice de Desgarro	Coefficiente Scattering (m ² /kg)	% Coefficiente Scattering
RF	0	0,549		38,1		17,69		20,9	
RF ₂₀₀₀	2000	0,598	8,9	58,7	54,1	14,51	-18,0	19,0	-9,0
RF ₄₀₀₀	4000	0,617	12,4	57,4	50,7	13,8	-22,0	17,8	-14,8
RF ₅₀₀₀	5000	0,627	14,2	58,6	53,8	13,66	-22,8	17,8	-14,8
EF(b)	0	0,588	7,1	50,7	33,1	14,5	-18,0	18,9	-9,3
EF(b) ₂₀₀₀	2000	0,601	9,5	54,5	43,0	13,56	-23,3	18,6	-10,7
EF(b) ₄₀₀₀	4000	0,604	10,0	53,3	39,9	14,07	-20,5	18,4	-11,7
EF(b) ₆₀₀₀	6000	0,599	9,1	55,6	45,9	14,19	-19,8	17,9	-14,1

CAPÍTULO 5

Análisis y Discusión de Resultados. Conclusiones

5.1. Análisis y discusión de resultados

La evaluación para establecer el efecto de cada uno de los factores sobre las respuestas y la posible interacción entre ellos, se realizó ingresando las variables dependientes como porcentajes de ganancias ó pérdidas de cada una, relacionadas al estado de referencia. Dicho porcentaje se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Variación} = \left[- (R_{\text{sin tratam.}} - R_{\text{con tratam. enz.}}) / R_{\text{sin tratam.}} \right] * 100 \quad \text{Ec. 5.1.}$$

Donde:

% Variación: ganancia ó pérdida de la respuesta medida.

$R_{\text{sin tratam.}}$: valor de la respuesta de la pasta de referencia.

$R_{\text{con tratam. enz.}}$: valor de la respuesta de la pasta con tratamiento.

El análisis estadístico de cada respuesta se realizó a un nivel de confianza del 95 % y con las siguientes herramientas estadísticas:

- ⇒ Tablas de análisis de la variancia.
- ⇒ Tabla y ecuación de análisis de regresión con sus variables codificadas.
- ⇒ Gráficos de superficie de respuesta.
- ⇒ Curvas de nivel.
- ⇒ Gráficos de los residuales en función del número de corrida.

Cabe aclarar que las ecuaciones de regresión se presentan con sus factores codificados, por lo que para realizar la decodificación a sus variables naturales y/o calcular valores teóricos se debe tener en cuenta lo siguiente:

Primero, se deben reemplazar los factores por las ecuaciones 5.2. y 5.3.:

$$T = (t - 60) / 30 \quad \text{Ec. 5.2.}$$

$$C = (c - 0,2) / 0,1 \quad \text{Ec. 5.3.}$$

Donde:

T: tiempo de tratamiento codificado.

t: tiempo de tratamiento decodificado (minutos).

C: carga de enzima codificada.

c: carga de enzima decodificada (%).

Luego se calculó el valor teórico de cualquier propiedad a una determinada condición de carga y tiempo y se obtuvo así el porcentaje de variación de dicha propiedad, por último se transformó con la ecuación 5.1., a las unidades correspondientes a cada propiedad para independizarla del valor de referencia. Las transformaciones realizadas a las propiedades estudiadas se encuentran en el Anexo A (Decodificaciones de las propiedades analizadas según el diseño experimental), calculadas a partir de las ecuaciones obtenidas los valores teóricos de dichas propiedades.

Con posterioridad, se analizaron y se discutieron los resultados obtenidos en el diseño experimental desde el punto de vista del mejoramiento de las propiedades papeleras y el posible mecanismo de acción de la enzima sobre las fibras.

Por último se evaluaron los resultados alcanzados en los tratamientos combinados de enzima con refino, particularmente teniendo en cuenta el consumo de energía en la etapa de tratamiento de refino y propiedades logradas.

5.1.1. Según el diseño experimental desde el punto de vista estadístico

En la Tabla 5.1. se muestra un resumen del análisis estadístico de los efectos producidos por los factores estudiados, tiempo de tratamiento (T) y carga de enzima (C), sobre las propiedades analizadas a la pasta tratada.

Análisis del licor residual:

⇒ Azúcares reductores

Luego de cada tratamiento enzimático, se siguió la hidrólisis enzimática a través de la estimación de los azúcares reductores y la medición del pH final en el licor residual.

En base al análisis estadístico y después de haber eliminado los efectos no significativos se encontró para los *azúcares reductores* la siguiente ecuación de regresión, donde el modelo explica el 98 % de la variabilidad en la producción de azúcares.

$$\text{Az. Red.} = 5,5 + 2,8 * C + 1,8 * T - 0,8 T^2 + 0,9 * C * T$$

Tabla 5.1: Efectos producidos por los factores carga de enzima y tiempo de tratamiento.

		EFECTOS				
PROPIEDADES		C	T	C ²	T ²	C*T
LICOR RESIDUAL	Azúcares reductores	S	S	ns	S	S
PASTA ENTERA	CSF	S	ns	S	ns	ns
	WRV_t	ns	S	ns	ns	ns
	WRV_i	ns	ns	ns	ns	ns
	% Finos	S	ns	ns	ns	ns
	Densidad	ns	ns	S	ns	ns
	Índice de Tracción	ns	S	S	ns	S
	Índice de Rasgado	ns	S	ns	ns	ns
	Coefficiente de Dispersión de Luz	ns	ns	ns	ns	ns
FRACCIÓN + 100	CSF	ns	ns	S	ns	ns
	WRV_t	S	S	ns	ns	ns
	WRV_i	ns	ns	ns	ns	ns
	Densidad	ns	ns	ns	ns	ns
	Índice de Tracción	S	S	S	ns	ns
	Índice de Rasgado	S	S	ns	S	S
		Coefficiente de Dispersión de Luz	ns	S	ns	ns

Donde:

C: carga de enzima

T: tiempo de tratamiento

C²: carga de enzima al cuadrado

T²: tiempo de tratamiento al cuadrado

C * T: interacción de la carga de enzima por el tiempo de tratamiento

S: efecto significativo

ns: efecto no significativo

Para el contenido de azúcares reductores, no se consideró la variación porcentual porque corresponde al licor residual proveniente de los tratamientos enzimáticos y no se valoró en la pasta de referencia.

Además se puede ver en las curvas de nivel de la Figura 5.1. que hacia valores elevados en ambos factores se liberaron altas cantidades de azúcares durante el tratamiento enzimático.

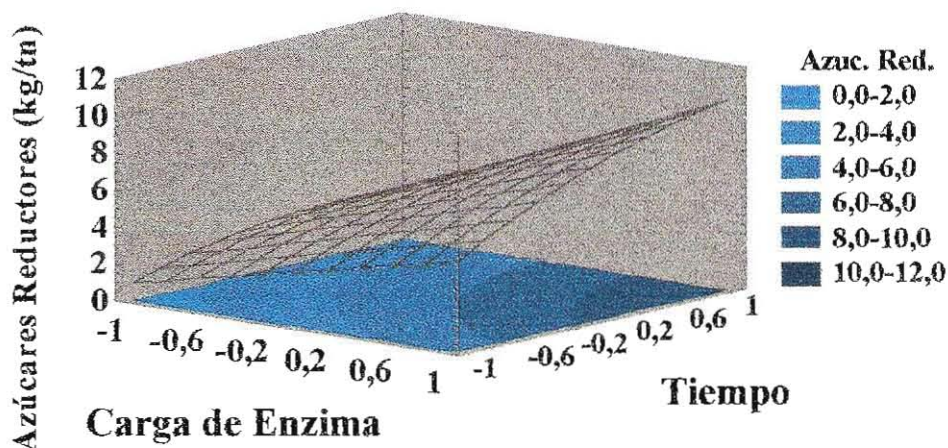


Figura 5.1.: Superficie de respuesta y curvas de nivel correspondientes a la determinación en el licor residual de los azúcares reductores producidos durante la hidrólisis enzimática.

⇒ pH final

Los resultados del *pH final* en el licor residual confirmaron su constancia a lo largo de cada tratamiento enzimático, obteniéndose un promedio de 5,9, lo cual mostró el control que se obtuvo frente a la acción enzimática en las condiciones realizadas.

Evaluación de la Pasta Entera:

⇒ Drenabilidad

Como se muestra en la Tabla 5.1. y en la superficie de respuesta de la figura 5.2. para la drenabilidad (ml *CSF*), que fue significativo la carga de enzima, variando en forma lineal directa y cuadrática. El modelo explicó el 78 % en la variabilidad del *CSF* siendo la ecuación de regresión:

$$\% \text{ Variación } CSF = 17 + 5,3 * C - 3,7 * C^2$$

De las curvas de nivel, se concluyó que se obtuvieron las mayores ganancias en drenabilidad hacia altas cargas de enzima.

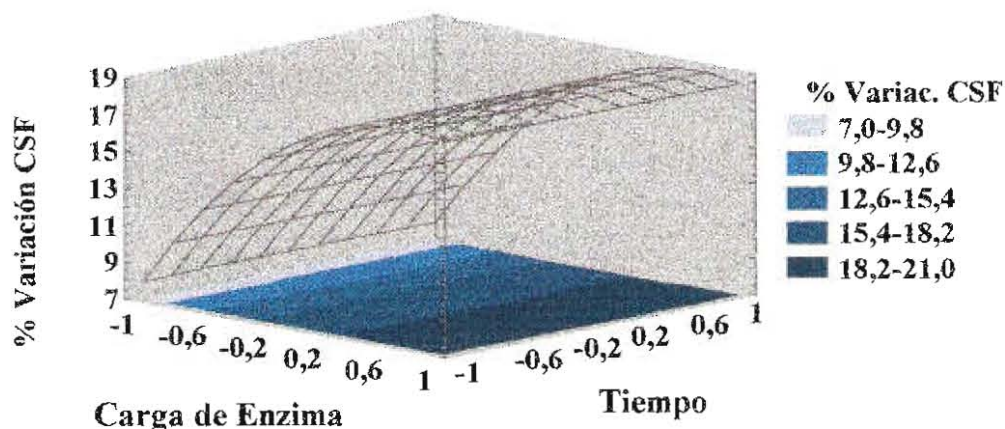


Figura 5.2.: Superficie de respuesta y curvas de nivel del CSF de la pasta entera en función de los factores carga de enzima y tiempo de tratamiento.

➤ Valor de Retención de agua

Al evaluar el *grado de hidratabilidad* de la pasta entera, en la superficie de respuesta de la Figura 5.3. se muestra que el efecto del tiempo de tratamiento fue significativo en el WRV_t , variando de manera lineal directa. Se extrajo, de la tabla de análisis de la variancia, que el modelo explicó el 44 % de la variabilidad del valor de retención de agua total y del análisis de regresión la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Variación } WRV_t = 4,4 + 2,4 * T$$

De las curvas de nivel se dedujo que las mayores ganancias en el WRV_t se lograron hacia tiempos de tratamientos más prolongados.

Para el WRV_t , se observó que no hubo efectos significativos de los factores ni en su interacción.

➤ Cuantificación de Finos

En la Figura 5.4. se muestra la superficie de respuesta y las curvas de nivel para la cuantificación de los *finos*. Se observa que la carga de enzima tuvo efecto significativo sobre el porcentaje de finos variando de manera lineal y directa y que se

alcanzaron las máximas pérdidas en el contenido de finos hacia menores cargas de enzima.

El modelo explicó el 56 % de la variabilidad en dicha propiedad y la ecuación de regresión que la representa fue la siguiente:

$$\% \text{ Variación contenido de Finos} = -45,4 + 8,5 * C$$

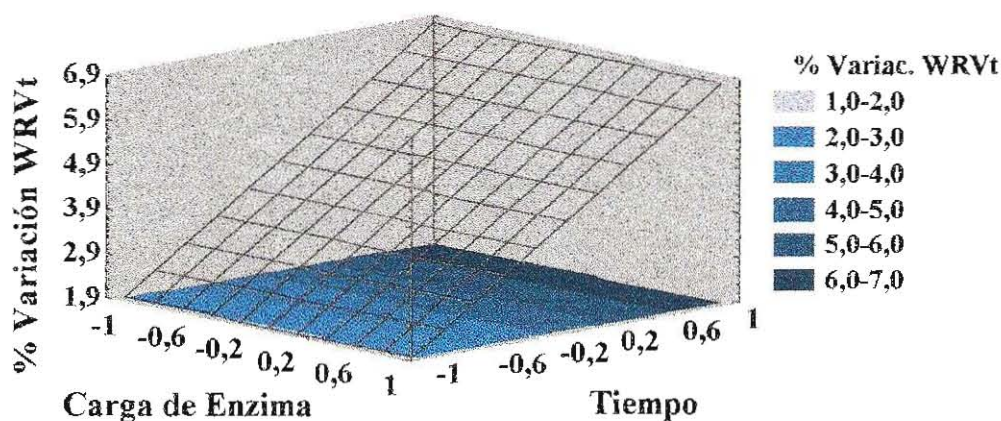


Figura 5.3: Superficie de respuesta y curvas de nivel del WRV_t de la pasta entera en función de los factores.

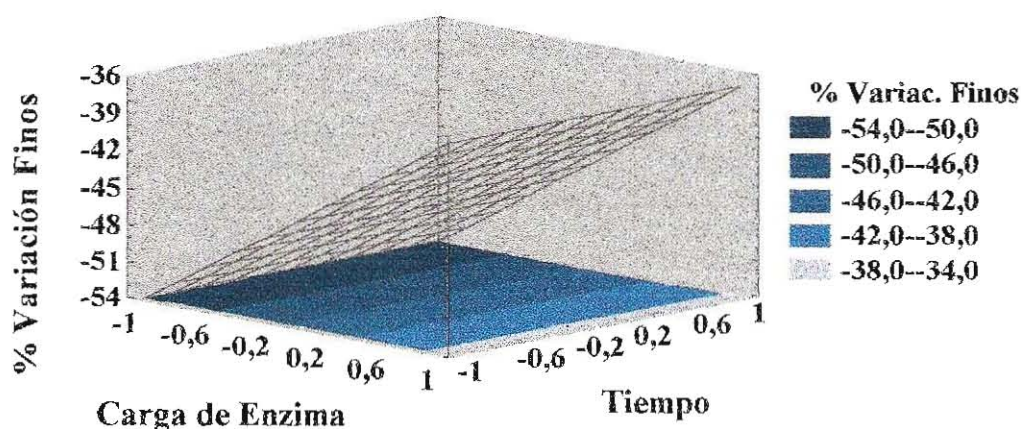


Figura 5.4: Superficie de respuesta y curvas de nivel para la cuantificación de los finos en la pasta entera.

Propiedades físicas de la Pasta Entera:

➤ Densidad Aparente

En el análisis de los datos de las pastas enteras se observa, en la superficie de respuesta de la Figura 5.5., que para la *densidad aparente* el cuadrado de la carga de enzima fue un factor significativo y que las mayores ganancias se lograron hacia ambos extremos de la carga de enzima. El modelo explicó el 59 % de la variabilidad de ella y la ecuación de regresión fue la siguiente:

$$\% \text{ Variación Densidad Aparente} = 5,5 + 1,9 * C^2$$

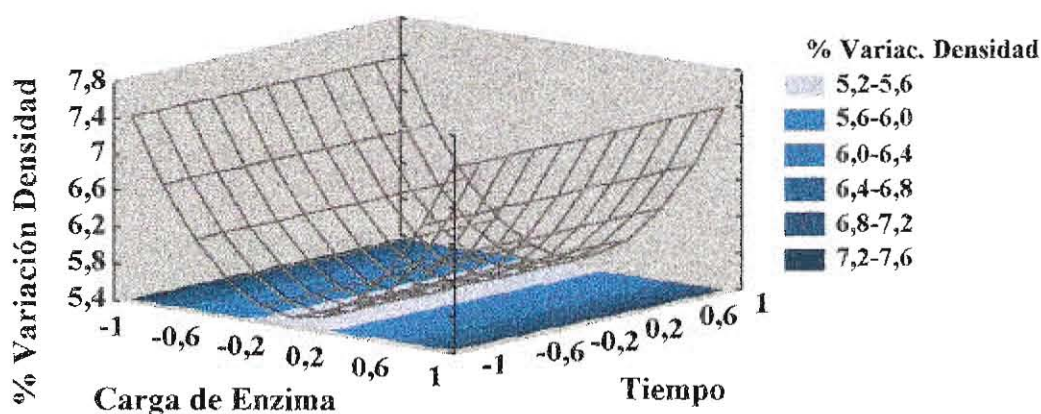


Figura 5.5.: Superficie de respuesta y curvas de nivel correspondientes a la densidad aparente de la pasta entera en función de los factores en estudio.

➤ Índice de Tracción

En la tabla de análisis de la variancia correspondiente al *índice de tracción* no se observaron efectos significativos de los factores en estudio ni en su interacción. Al examinar los residuos en función del número de tratamientos con el propósito de poder encontrar posibles outliers, se puede ver en la Figura 5.6. que el tratamiento 1 fue el que se alejó de la franja considerada en los residuales.

Al realizar nuevamente el análisis de la variancia sin el tratamiento 1, se encontró que presentaron efectos significativos sobre el índice de tracción, el tiempo de tratamiento de manera lineal, el cuadrado de la carga de enzima y la interacción de los

factores carga y tiempo. El modelo explicó el 95 % de la variabilidad en el índice de tracción y la ecuación de regresión fue la siguiente:

$$\% \text{ Variación Índice de Tracción} = 14,8 + 5 * T + 4,8 * C^2 - 8,8 * C * T$$

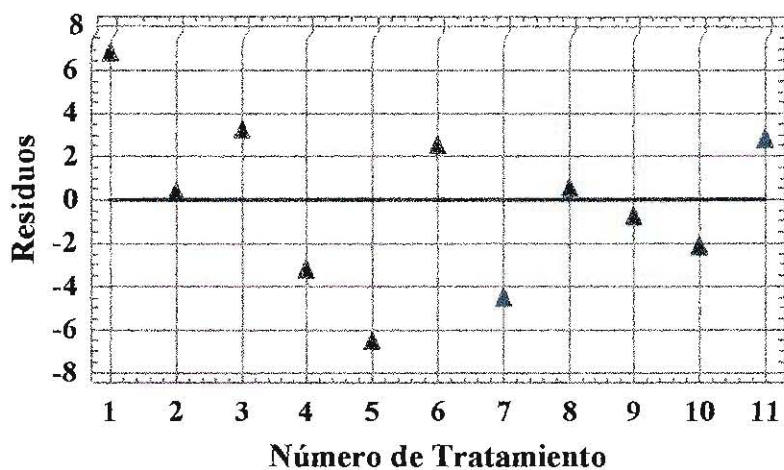


Figura 5.6.: Residuales para el Índice de tracción en función del número de tratamiento según el diseño experimental.

En la Figura 5.7. se puede apreciar que las mayores ganancias en índice de tracción se lograron con baja carga de enzima y mayor tiempo de tratamiento.

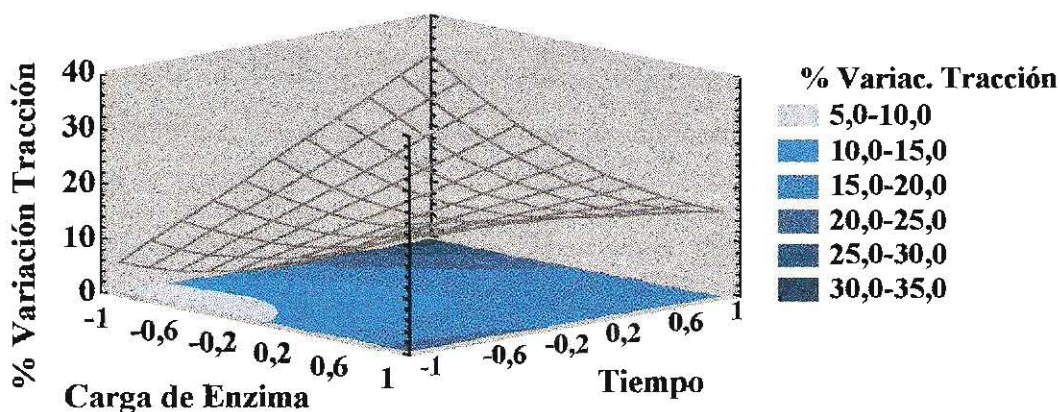


Figura 5.7.: Superficie de respuesta y curvas de nivel correspondientes al índice de tracción de la pasta entera.

➤ Índice de Rasgado

En la figura 5.8. se puede observar que para el *índice de rasgado* el tiempo de tratamiento fue significativo, variando de manera lineal inversa y se vio que las mayores pérdidas en rasgado se obtuvieron hacia altos tiempos de tratamiento.

El modelo explicó el 48 % de la variabilidad del índice rasgado y la ecuación de regresión fue la siguiente:

$$\% \text{ Variación Índice de Rasgado} = -27,3 - 3,7 * T$$

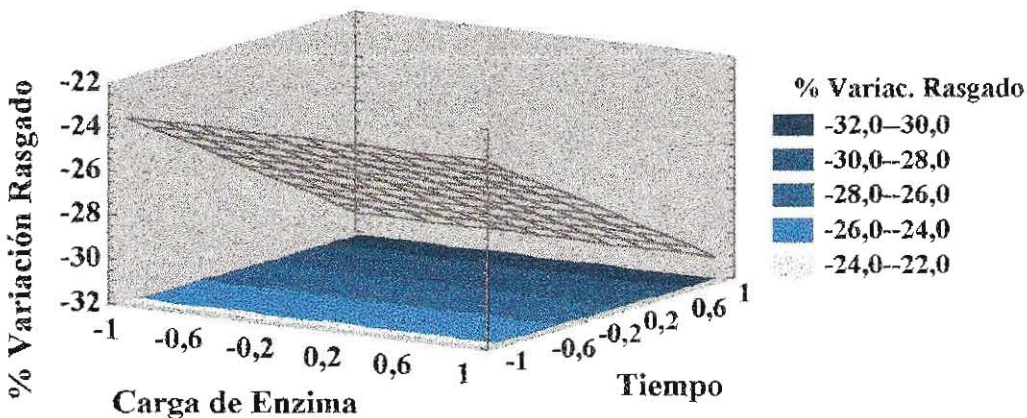


Figura 5.8.: Superficie de respuesta y curvas de nivel del índice de rasgado de la pasta entera.

➤ Coeficiente de dispersión de luz

Los factores en estudio y la interacción de ambos no presentaron ningún efecto significativo sobre la medición del *coeficiente de dispersión de luz o scattering* de la pasta entera.

Análisis de la fracción fibrosa:

➤ Drenabilidad

Se observa en la Figura 5.9. que la drenabilidad medida como *CSF*, presentó el cuadrado de la carga de enzima como efecto significativo, explicando el modelo el 65 % de la variabilidad en dicha propiedad. Además, se observó que hay muy poca variación

en ganancia ó pérdida en el CSF, presentando las mayores ganancias hacia valores medios de la carga de enzima en el rango de los factores estudiados.

La ecuación de regresión que la representa fue la siguiente:

$$\% \text{ Variación CSF} = 1,1 - 2,5 * C^2$$

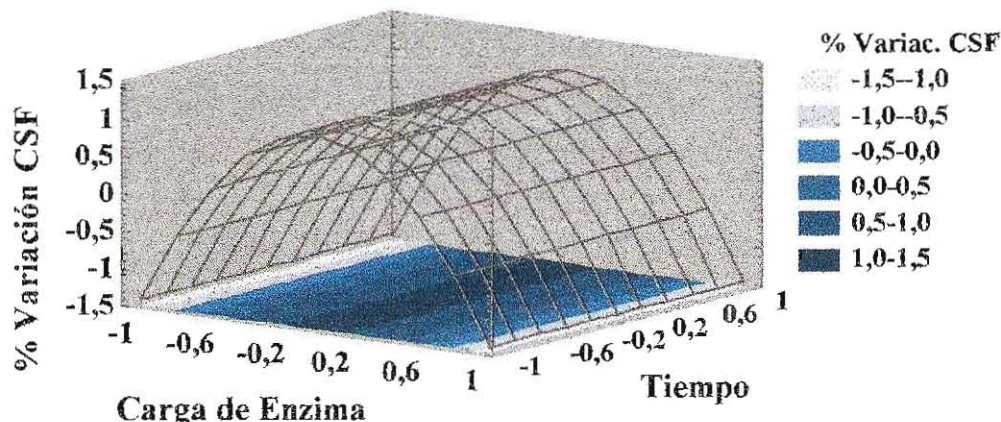


Figura 5.9.: Superficie de respuesta y curvas de nivel del CSF correspondiente a la fracción fibrosa.

➤ Valor de Retención de agua

En cuanto al *valor de retención de agua total* se observa en la figura 5.10. que varió linealmente con la inversa de la carga de enzima y directa con el tiempo de tratamiento, explicando 82 % de la variabilidad en la hidratabilidad total en la fracción fibrosa; logrando las mayores ganancias en WRV_t hacia tiempos de tratamiento altos y bajas cargas de enzima. La ecuación de regresión del WRV_t fue la siguiente:

$$\% \text{ Variación } WRV_t = 6,3 - 1,5 * C + 2,0 * T$$

En el caso del *valor de retención de agua intrafibra* (WRV_i) no hubo efectos significativos de los factores carga de enzima y tiempo de tratamiento ni de su interacción.

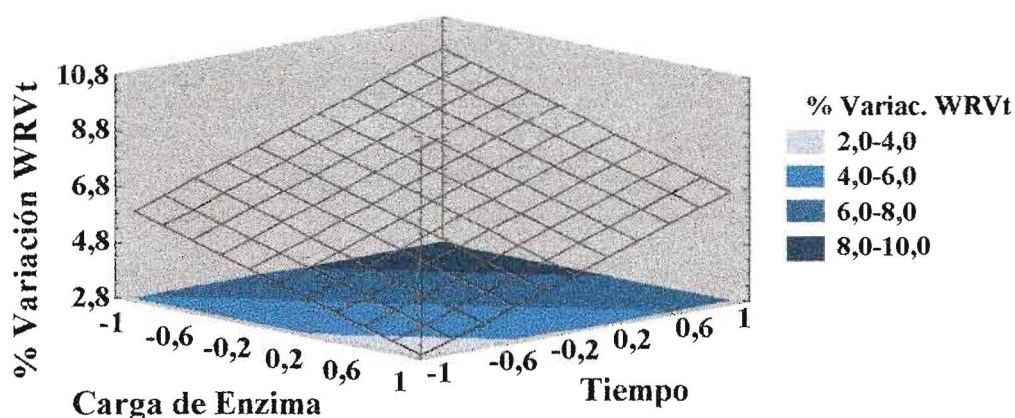


Figura 5.10.: Superficie de respuesta y curvas de nivel del valor de retención de agua total de la fracción fibrosa en función de los factores en estudio de EF.

Propiedades físicas de la fracción fibrosa:

➤ Densidad Aparente

Analizando las propiedades físicas de la fracción fibrosa se observó para la *densidad aparente* que los factores carga de enzima y tiempo de tratamiento, así como su interacción no tuvieron efectos significativos.

➤ Índice de Tracción

Cuando se analizaron los efectos sobre el *índice de tracción* de la fracción fibrosa se observó que ocurre igual que para la pasta entera, pero en este caso se debió eliminar como outliers el tratamiento 5.

Al hacer el análisis de la variancia sin los outliers y sin los efectos no significativos, se puede ver en la Figura 5.11., que la carga de enzima de manera lineal inversa y cuadrática y el tiempo de tratamiento lineal directo, presentaron efectos significativos en la determinación de la resistencia a la tracción.

La variabilidad de dicha propiedad fue de 80 % y se observó que se obtuvo el mayor de índice de tracción a altos tiempos de tratamiento y bajas cargas.

La ecuación de regresión de la variación en el índice de tracción fue la siguiente:

$$\% \text{ Variación Índice de Tracción} = 15,5 - 5,6 * C + 4,0 * T + 7,2 * C^2$$

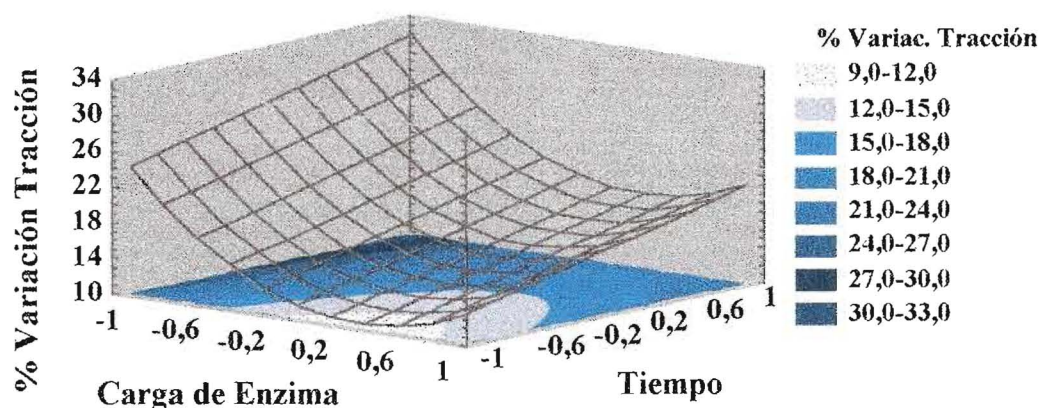


Figura 5.11.: Superficie de respuesta y curvas de nivel correspondientes al índice de tracción de la fracción fibrosa.

➔ Índice de Rasgado

Sobre el *índice de rasgado*, en la Figura 5.12 se puede ver que la carga de enzima lineal inversa; el tiempo de tratamiento lineal inversa y cuadrático; y la interacción de ambos factores presentaron efectos significativos. Las mayores pérdidas en rasgado se alcanzaron a altos tiempos y cargas; y las menores hacia valores medios de tiempo y bajas cargas.

El modelo explicó el 43 % de su variabilidad y la ecuación de regresión para el índice de rasgado fue la siguiente:

$$\% \text{ Variac. I. Rasgado} = -13,2 - 3,3 * C - 2,4 * T - 3,5 * C * T - 5,2 * T^2$$

➔ Coeficiente de dispersión de luz

En la superficie de respuesta de la Figura 5.13. sobre la medición del *scattering*, el tiempo de tratamiento de manera lineal e inversa tuvo efecto significativo, lográndose esto después de haber eliminado la corrida 11 como outliers. Las mayores pérdidas se obtuvieron a altos tiempos y las menores a bajos tiempos de tratamiento.

El coeficiente de dispersión de luz explicó el 62 % de su variabilidad y la ecuación de regresión correspondiente fue la siguiente:

$$\% \text{ Variación Coeficiente de Dispersión de Luz} = -7,6 - 1,7 * T$$

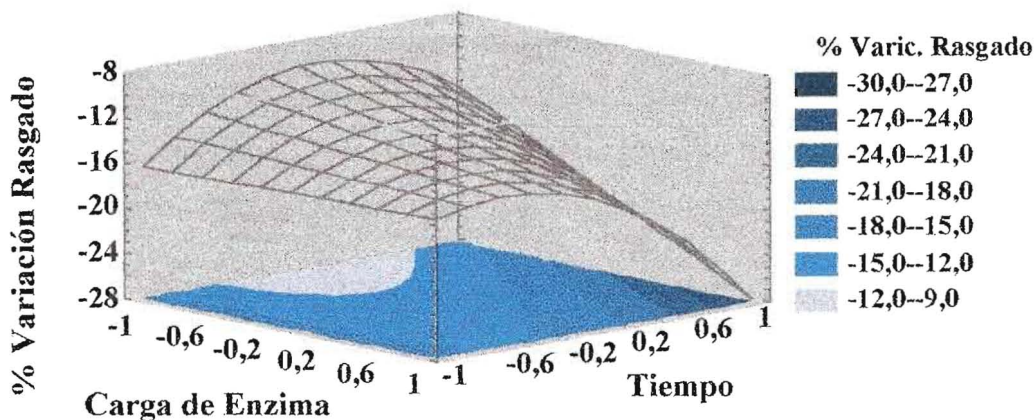


Figura 5.12.: Superficie de respuesta y curvas de nivel correspondientes al índice de rasgado de EF.

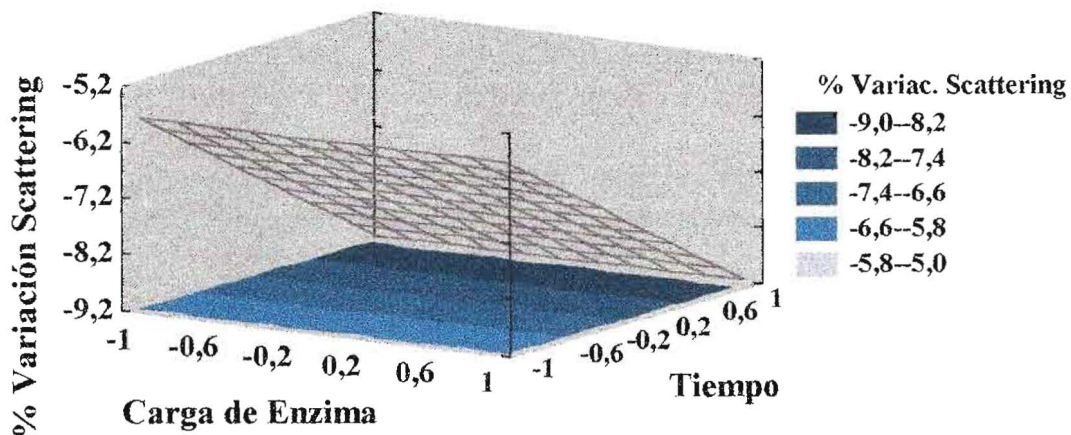


Figura 5.13.: Superficie de respuesta y curvas de nivel correspondientes al scattering de EF.

5.1.2. Análisis desde el punto de vista del mejoramiento de las propiedades papeleras

Haciendo el análisis desde del punto de vista del mejoramiento de las propiedades de la pulpa tratada, se realizaron las siguientes observaciones:

⇒ Azúcares Reductores

En la Figura 5.14. se muestra la evolución de la producción de azúcares reductores (kg/t) en función de la carga de enzima (%) para los diferentes tiempos de tratamiento. Se observó que se incrementó la liberación de los azúcares reductores a medida que aumentaron la carga de enzima y el tiempo de tratamiento.

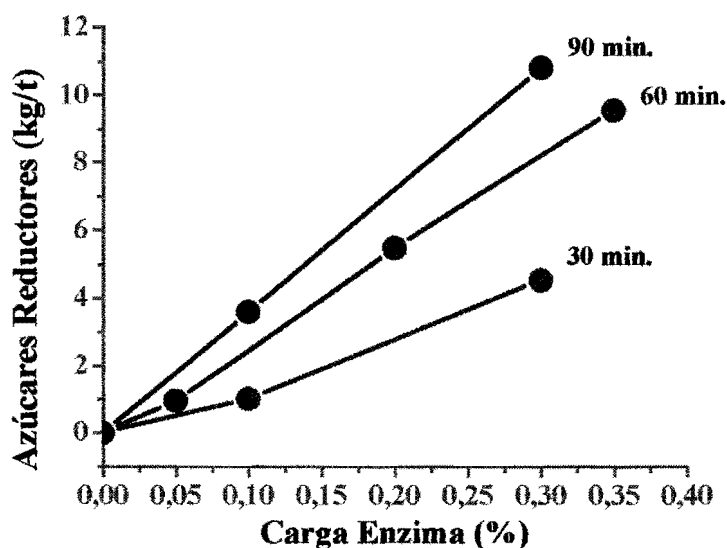


Figura 5.14.: Evolución de los azúcares reductores en función de la carga de enzima a diferentes tiempos de tratamiento enzimático.

⇒ Porcentaje de Finos

En la Figura 5.15. se muestra la variación del porcentaje de finos (%) en función de la carga de enzima (%) para los diferentes tiempos de tratamiento. Se aprecia que para bajas cargas de enzimas (0,05 - 0,1 %) y los tres tiempos de tratamientos estudiados, se cuantificó una menor cantidad de finos que pasaron a través de la malla 200 de la jarra de Britt.

Este comportamiento de la fracción de finos corrobora, lo que se menciona en la bibliografía (10), el posible efecto de floculación para bajas cargas de enzimas.

Si se analizara la disminución del contenido de finos, conjuntamente con la producción de azúcares reductores para bajas cargas de enzimas, se verificaría poca hidrólisis enzimática, ya que el contenido de azúcares reductores es bajo en esos casos ($< 4 \text{ kg/t}$), pudiéndose inferir que los finos floclaron sobre las fibras.

En cambio para mayores cargas de enzimas ($> 0,2 \%$), el contenido de finos disminuyó en aproximadamente 30-40 %, para tiempos de tratamiento de 60 y 90 min. respectivamente, pero correspondiéndose con altos valores de azúcares.

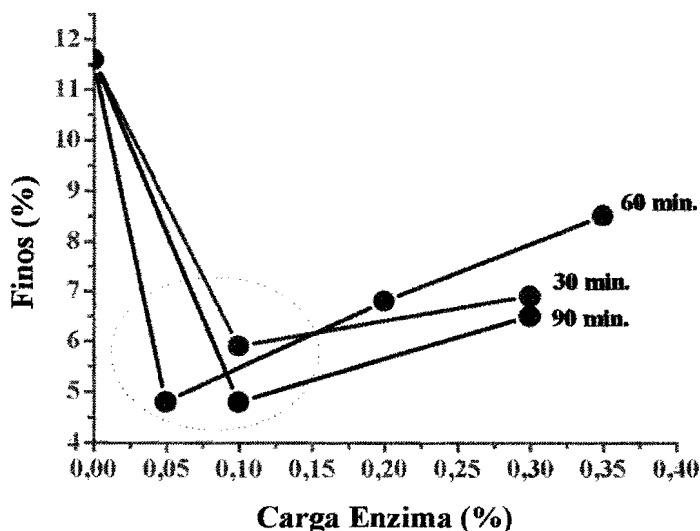


Figura 5.15.: Evolución de los finos en función de la carga de enzima a diferentes tiempos de tratamiento enzimático.

➤ Propiedades Físicas

En la Tabla 5.2. se presentan, para los tres tratamientos enzimáticos indicados en la Figura 5.15. los valores de densidad aparente, índice de tracción y rasgado correspondientes a las pastas enteras.

Si bien para todos los casos y en particular los que se mencionan en la Tabla 5.2. la resistencia al rasgado disminuyó, la resistencia a la tracción y la densidad aumentaron. Como se muestra en la tabla se alcanzaron incrementos del orden de 23-24 % para 0,05 % y 0,1 % de enzima y 60 y 30 minutos respectivamente. El mayor incremento en el Índice de Tracción (34%) se alcanzó con el tratamiento de 0,1 % de carga de enzima y 90 minutos.

Tabla 5.2.: Densidad aparente, índice de tracción e índice de rasgado de tratamientos enzimáticos producidos a bajas cargas de enzima.

Carga enzima (%)	Tiempo (min)	Densidad Aparente (g/cm ³)	Índice de Tracción (Nm/g)	Índice de Rasgado (mNm ² /g)
--	--	0,561	42,1	18,41
0,05	60	0,619	51,9	13,63
0,1	30	0,603	52,2	13,92
0,1	90	0,611	56,6	12,84

⇒ Drenabilidad

Se puede observar en la Figura 5.16. como varió el CSF versus la carga de enzima, para los diferentes tiempos de tratamiento. En todos los casos se alcanzó un aumento de drenabilidad, obteniéndose hacia altas cargas de enzima ganancias del 20 % para el rango de tiempo de tratamiento analizado.

Además se ve que a 60 min. y al pasar de 0,2 a 0,35 % de carga de enzima se llegó a un valor constante en el CSF (580 ml), es decir que para ese tiempo de tratamiento no tiene sentido duplicar casi la carga de enzima en cuanto a la ganancia en la drenabilidad.

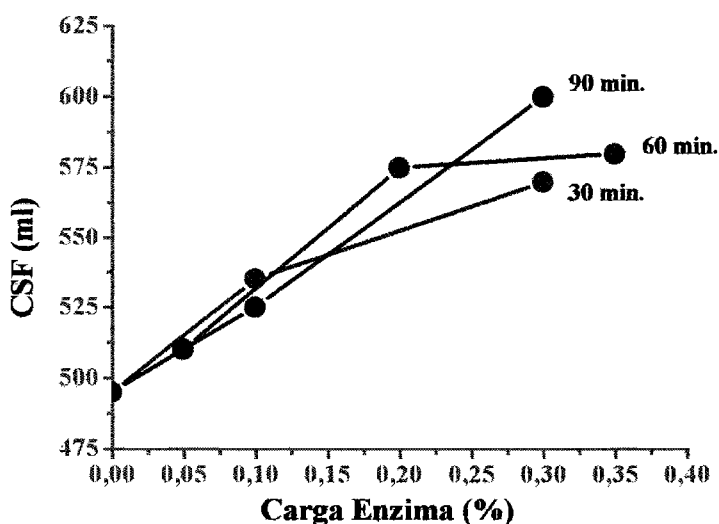


Figura 5.16.: Variación del CSF en función de la carga de enzima a diferentes tiempos de tratamiento.

⇒ Grado de Polimerización promedio viscosimétrico

En la Figura 5.17. se observa la evolución del grado de polimerización (DP) promedio viscosimétrico de la fracción de polisacáridos correspondiente a la pasta

entera y a la fracción fibrosa. Con respecto a la pasta entera se puede observar que el DP cayó marcadamente al comienzo, para cargas de enzima $< 0,2$ % descendió 12 % a 60 y 90 min.; y 20 % a 30 min. Al aumentar la carga de enzima las disminuciones en el grado de polimerización fueron del 25 % para 30 y 60 minutos y de casi de 40 % para 90 minutos de tratamiento.

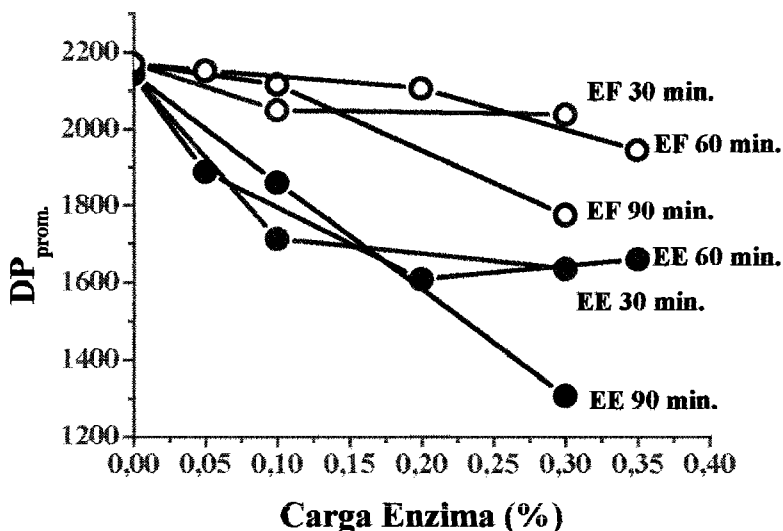


Figura 5.17.: Evolución del grado de polimerización en función de la carga de enzima a diferentes tiempos de tratamiento correspondiente a la pasta entera y a la fracción fibrosa

En cuanto a la fracción fibrosa, el DP fue prácticamente igual al del estado de referencia; solamente presentó una apreciable disminución (20%) en el caso de alta carga de enzima y 90 minutos de tratamiento.

Con los datos disponibles no se puede explicar la evolución del grado de polimerización para los distintos tratamientos, ya que se debe tener presente que cuando se determina el grado de polimerización promedio viscosimétrico están involucrados factores como el promedio de toda la fracción de carbohidratos (celulosa y hemicelulosas); la proporción de fibras y finos que según se muestra en (7) presentarían diferentes grado de polimerización y la distribución del grado de polimerización dentro de la fracción celulósica resultante del tratamiento enzimático.

➤ Observación microscópica: Coloración de Simons

Se realizaron observaciones en el microscopio óptico empleando el colorante diferencial de Simons. Este colorante es una mezcla de un colorante azul (bajo peso

molecular) y uno naranja (alto peso molecular). De este modo, cuando las fibras presentan microporos grandes (delaminación interna, fibrilación o daño) se tiñen de naranja; cuando las fibras presentan microporos pequeños se tiñen de azul (pastas no refinadas o secadas) y cuando las fibras aparecen teñidas de color verde es porque exhiben cantidades significativas de poros grandes y pequeños (29).

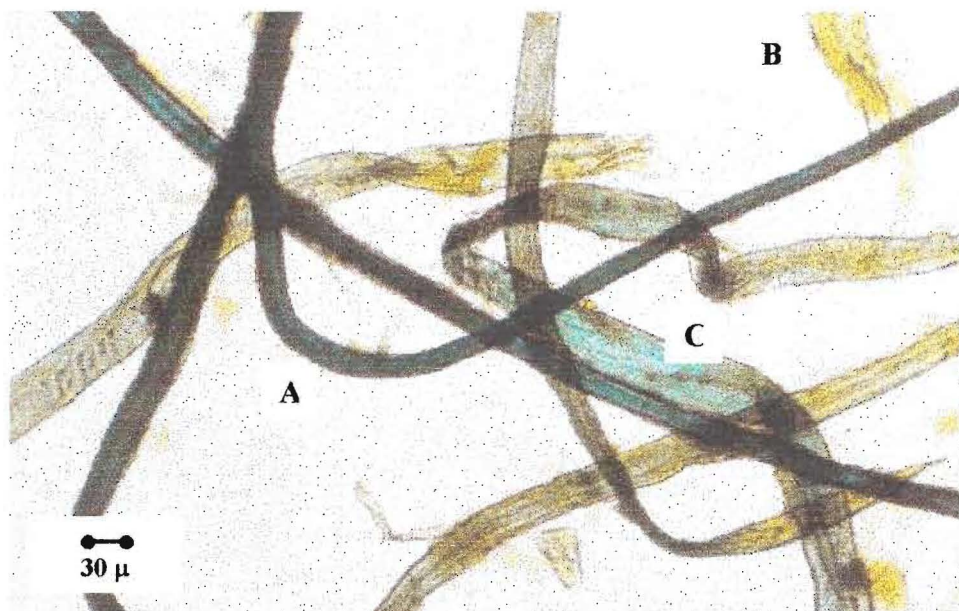
En las Fotografías 5.1 y 5.2. se muestran fibras coloreadas de la pasta de referencia (RE) y con tratamiento enzimático (EE(b) 0,1 % - 90 min.) respectivamente.

En la Fotografía 5.1.a., se distinguen fibras teñidas de azul intenso (-A- fibras de madera de verano), de naranja (-B- traqueidas de primavera , refinadas) y de naranja y verde (-C- traqueidas de primavera).

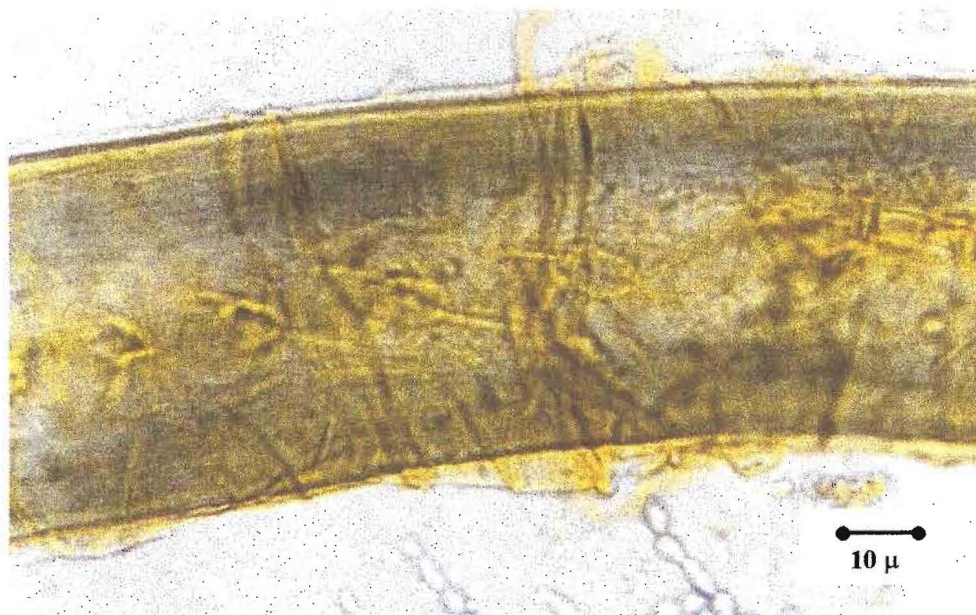
En la Fotografía 5.1.b. se muestra una fibra con mayor aumento que presenta dos zonas, una de color naranja (fibrilación y pliegues) y otra de color verde (refino y secado).

Para la pasta tratada con enzima (Fotografía 5.2.a.) se distinguen fibras teñidas de azul claro -A-, de naranja intenso -B- y de naranja y verde -C-.

En la fotografía 5.2.b. la fibra se tiñó de color naranja bien intenso lo que estaría mostrando el carácter superficial de la acción enzimática.

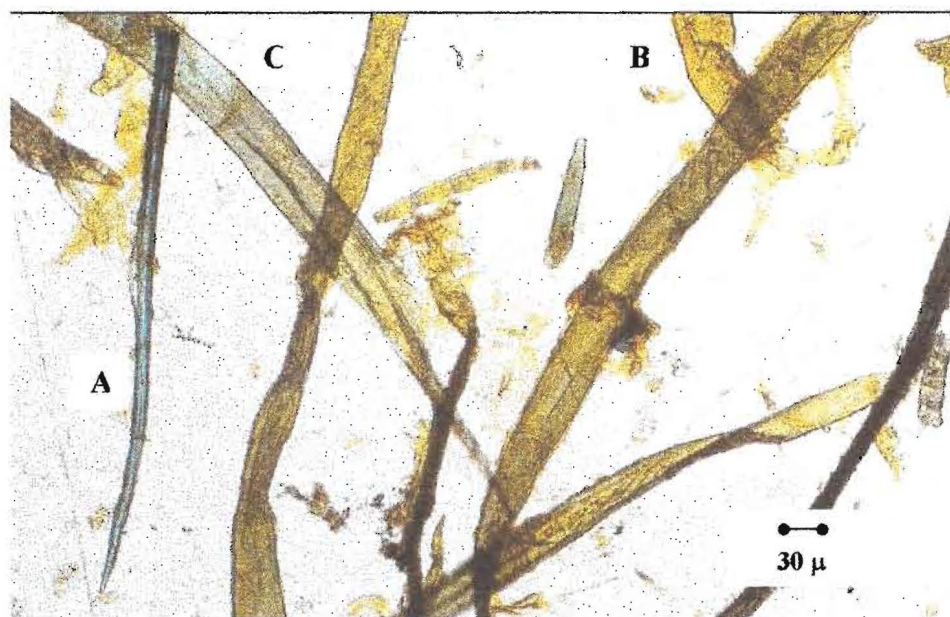


Fotografía 5.1.a.



Fotografía 5.1.b.

Fotografías 5.1.a. y 5.1.b.: Coloración diferencial de Simons correspondiente a la pasta reciclada de referencia (RE).



Fotografía 5.2.a.



Fotografía 5.2.b.

Fotografías 5.2.a. y 5.2.b.: Coloración diferencial de Simons correspondiente a la pasta reciclada con tratamiento enzimático EE_(b) (0,1 % - 90 min.).

5.1.3. Tratamientos combinados de enzima con refino

Se realizaron curvas de refino en molino de laboratorio PFI, de la pasta de referencia y la tratada enzimáticamente, según las condiciones seleccionadas en función del diseño experimental realizado (0,1% carga de enzima - 90 min.).

En la Figura 5.18. se puede observar la evolución del CSF en función de las revoluciones aplicadas en el molino PFI, de la pasta reciclada de referencia y con tratamiento enzimático. En todo el rango se verificó un grado de drenabilidad mayor para la pasta tratada con enzimas.

En la Figura 5.19. se muestra el consumo específico de energía en función del tratamiento mecánico. Como se ve en la figura a partir de 2000 revoluciones de PFI, el consumo de energía de refino fue notoriamente menor para la pasta tratada con enzimas, (19% menos para 4000 rev. y 16% menos para 5000 rev. aproximadamente).

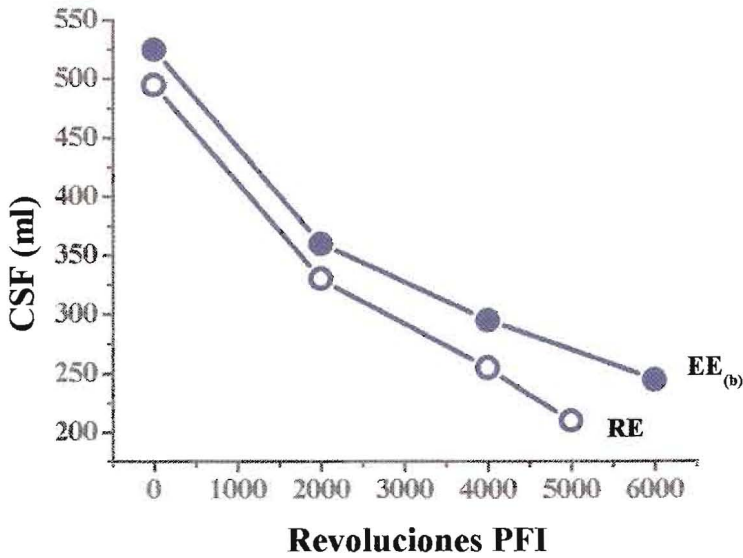


Figura 5.18.: Curvas de refino: CSF vs. revoluciones en el PFI correspondientes a las pastas enteras reciclada (RE) y con tratamiento enzimático (EE_(b)).

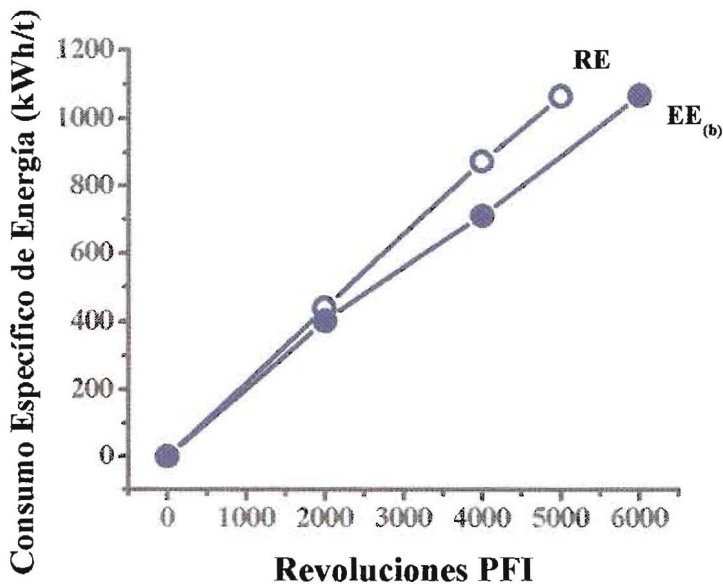


Figura 5.19.: Curvas de refino: Consumo específico de energía en función de las revoluciones correspondientes a las pastas enteras refinadas reciclada (RE) y con tratamiento enzimático (EE_(b)).

Como se observa en la Figura 5.20., la pasta tratada con enzimas parte de un índice de tracción (IT) marcadamente mayor que la de referencia, alcanzando los mismos valores de IT con un tratamiento mecánico de 2000 revoluciones y un consumo de energía menor (8 % menos). Al avanzar el tratamiento mecánico, la pasta tratada con

enzimas, desarrolló poca resistencia a la tracción incrementándose la diferencia en la pasta sin tratamiento.

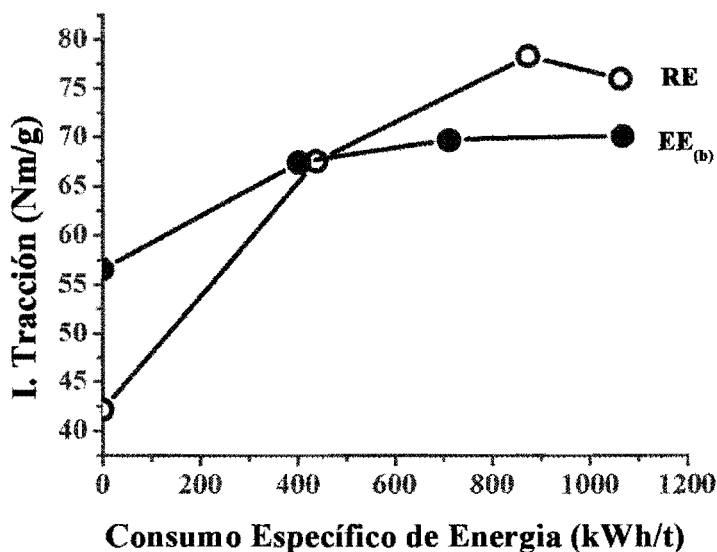


Figura 5.20.: Índice de Tracción en función del consumo específico de energía correspondientes a las pastas enteras con refino, reciclada (RE) y con tratamiento enzimático (EE_(b)).

La sorción de agua intrafibra (WRV_i) de la fracción F+100, tanto para la pasta tratada con enzimas, como la de referencia, muestra en la Figura 5.21. una relación proporcional a la densidad de dicha fracción, es decir la flexibilización en húmedo (38). Con el tratamiento mecánico para la pasta tratada con enzimas, se parte de un WRV_i mayor que la de referencia, pero no hubo prácticamente cambios del mismo ni de la densidad aparente.

En esta figura se muestra además la evolución de la retención de agua total (WRV_t) la cual coincide para ambas pastas con el comportamiento descrito anteriormente. Considerando que la diferencia en ordenadas representaría la sorción interfibras y asociado estos a la fibrilación externa, es constante dicha sorción en todo el rango analizado.

En la Figura 5.22. se observa que para la relación drenabilidad versus IT de las pastas enteras; se presentan curvas decrecientes, cuya pendiente es mayor para la tratada con enzimas presentando para un mismo IT de 67 Nm/g, 10 % más de CSF que la pasta de referencia.

Al aumentar el tratamiento mecánico, la drenabilidad cayó más rápido para la pasta tratada sin aumento notorio de resistencia, alcanzando la pasta de referencia, sólo con tratamiento mecánico, 11 % más de resistencia a la tracción a un CSF \approx 250 ml.

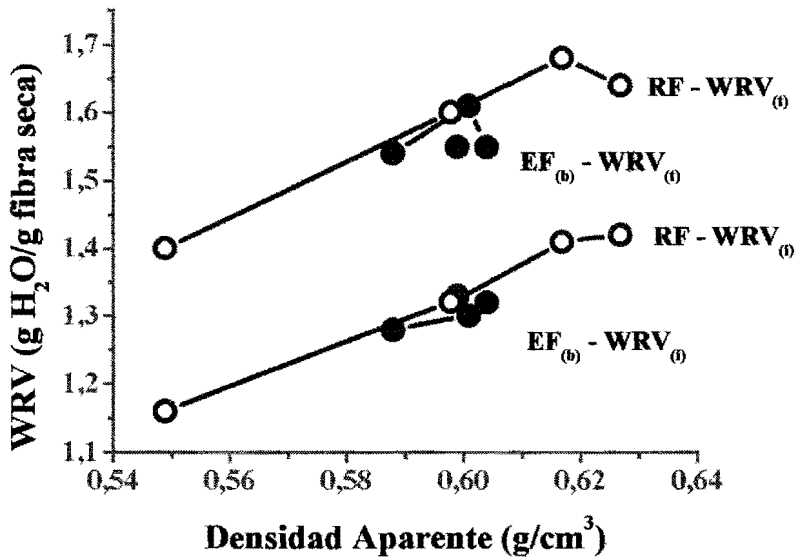


Figura 5.21. Valor de retención de agua total e intrafibril de la fracción F+100 de las pastas refinadas de referencia y tratada con enzimas.

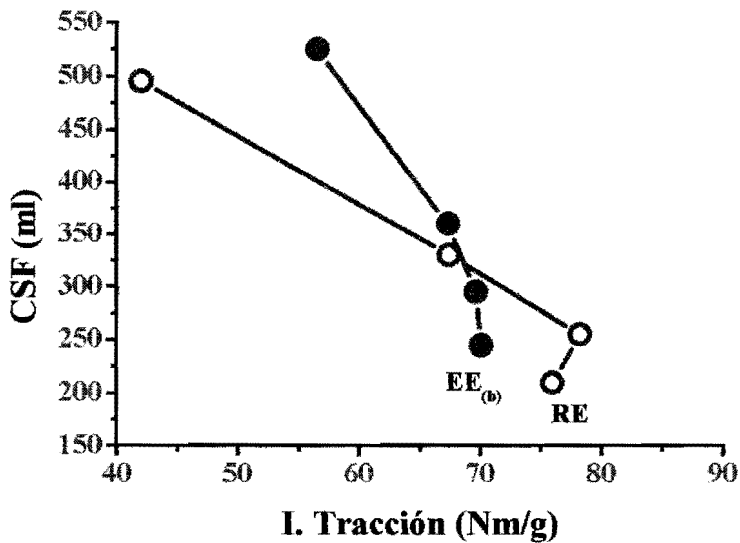


Figura 5.22.: Relación drenabilidad vs. índice de tracción de las pastas enteras refinadas de referencia y con tratamiento enzimático.

5.3. Conclusiones

Sobre la base del trabajo experimental desarrollado con la enzima PERGALASE A40, se pueden resumir el siguiente comportamiento general:

- El diseño experimental escogido permitió, a través de un número limitado de experiencias, el análisis de dos factores importantes (carga de enzima y tiempo) del tratamiento enzimático con Pergalase A40, sobre las propiedades papeleras de fibras celulósicas recicladas.
- La presencia de actividad de endoglucanasa (CMC_{asa}) es un pre-requisito para mejorar el drenaje, como fue comprobado en este trabajo y mencionado en (19).
- Bajas cargas de enzima proporcionan una reducción en el contenido de finos, lo que conduciría a una mejora en la drenabilidad para los tiempos de tratamientos analizados. Este comportamiento de la fracción de finos corrobora, lo que se menciona en la bibliografía (10), el posible efecto de floculación para bajas cargas de enzimas.
- Se alcanzaron para todos los casos mejoras importantes de drenabilidad determinadas como CSF, respecto al estado de referencia y las mayores ganancias se obtuvieron hacia los tratamientos con altas cargas de enzimas.
- En cuanto a las propiedades de resistencia se puede decir que si bien la enzima produjo un importante descenso en el índice de rasgado, en todos los casos las pastas tratadas presentaron mayor resistencia a la tracción respecto al estado inicial. El tratamiento (carga 0,1% y 90 min.) produjo las mayores ganancias del Índice de Tracción (34%). En los diferentes tratamientos enzimáticos, las enzimas provocaron aumentos en la densidad aparente y resistencia a la tracción; y disminuciones en la resistencia al rasgado y coeficiente de dispersión de luz.
- Las enzimas atacarían ciertas zonas accesibles de la celulosa, provocando hidrólisis de la misma, debilitando las fibras que colapsarían luego en la formación y secado de las hojas de laboratorio. Esto indicaría incrementos de la conformabilidad, lo cual es evidente con el aumento de la densidad,

resistencia a la tracción y disminución del coeficiente de dispersión de luz de la fracción fibrosa.

- De acuerdo al tratamiento estadístico no se verificaron efectos significativos de los factores estudiados sobre las propiedades relacionadas a la estructura interna de la fibra, como el WRV_i tanto de la pasta entera como de la correspondiente fracción fibrosa. Esto, en cierta manera, estaría confirmando lo mencionado en (37) que la acción enzimática aún en pastas químicas, estaría limitada a las superficies accesibles, es decir finos y a superficies más externas y poros accesibles de fibras largas. Estos autores mencionan que los tratamientos de pastas y maderas pueden ser considerados como una modificación específica superficial de las fibras.
- Las observaciones en el microscopio óptico permitió ver claramente la acción superficial de la enzima.
- Para la pasta tratada con enzimas se verificó, durante el refino mecánico, un mayor grado de drenabilidad y un consumo de energía menor, comparándola con la pasta de referencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bhardwaj, N. K., Bajpai, P. and Bajpai, P. K. "Use of enzymes to improve drainability of secondary fibres". *Appita*, 48 (5), 378 (1995).
2. Eriksson, L. A., Heitmann J. A. and Venditti, R. A. "Freeness Improvement of recycled fibers using enzymes with refining" *ACS Symp Ser.* 687:41 (1998).
3. Szwarcsztajn, E. and Przybysz, K. "The role of pulp fractions and processing variables in recycling". *Trans. Symp. On Fibre - Water interactions in Papermaking*, Oxford, B.P.B.I.F., London , p 857-876 (1977).
4. Howard, R. C. and Bichard, W. "The Basic Effects of Recycling on Pulp Properties". *J.P.P.S.*18 (4): J151 (1992).
5. Eastwood, F. G. and Clarke, B. "Handsheet and pilot machine recycling degradation mechanisms", *Trans. Symp. On Fibre-Water interactions in Papermaking*, Oxford, B.P.B.I.F., London , p 835-855 (1977).
6. Nazhad, M. M. and Paszner, L. "Fundamentals of strength loss in recycled paper". *TAPPI J* 77 (9):171 (1994).
7. de Ruvo, A. and Htun, M. "Fundamental and practical aspects of papermaking with recycled fibres" *Trans. Symp. "The rol of fundamental research in papermaking"*, Cambridge, UK, vol.1, 195-225 (1981).
8. Bhat, Ganapati R., Heitmann, John A. and Joyce, Thomas W. "Novel techniques for enhancing the strength of secondary fiber". *TAPPI J.* 74 (9): 151 (1991).
9. Pommier, Jean-Claude, Fuentes, J. L. and Goma, G. "Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry" Part 1: the basic laboratory work. *TAPPI J.* 71(6):187 (1989).
10. Scott Jackson, L., Heitmann, J. A. and Joyce, T. W. "Enzymatic modifications of secondary fiber". *TAPPI J.* 76 (3):147 (1993).
11. Bolaksi, W. and Gallatin, J.C.; U.S.pat.3.041.246 (1962).
12. Bajpai, Pratima. "Enzymes in Pulp and Paper Processing" Chapter 2 y 3. Miller Freeman, Ed. (1997).
13. Noe, P., Chevalier, J., Mora, F. and Comtat, J. J. *Wood Chem. Tech.* 6(2):167-184 (1986).
14. Fuentes, J. L. and Robert, M. European Patent 262040, (1988).
15. Pommier, Jean-Claude, Goma, G., Fuentes, J. L. and Roust, C. " Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry" Part 2: Industrial applications. *TAPPI J.* 73(12):197 (1990).
16. Karsila, S., Kruss, I. and Puupoo, O. European Patent 351655 A 9001249004, (1990)
17. Sarkar, J. .M., Cospe, D. R. and Hartig, E. J. "Applying enzymes and polymers to enhance the freeness of recycled fiber". *TAPPI J.* 78 (2): 89 (1995).
18. Bhardwaj, N. K., Bajpai, P. and Bajpai, P. K. "Enhancement of strength and drainage of secondary fibres" *Appita*, 50 (3), 230-232 (1997).
19. Stork, G., Pereira, H., Wood, T. M., Düsterhöf, E. M., Toft, A. and Puls, J. "Upgrading recycled pulps using enzymatic treatment". *TAPPI J.* 78 (2):79 (1995).

20. Pere, J., Siika-aho, M., Buchert, J. and Viikari, L. "Effects of purified *Trichoderma reesei* cellulases on the fiber properties of kraft pulp". TAPPI J 78 (6) :71 (1995).
21. Yamaguchi, H. and Yaguchi, T. "Fiber beating with enzyme pretreatment" Proc. 50th Appita Anu. Ge. Conf. AUKLAND New Zeland 1:91 (1996).
22. Mansfield, S. D., Wong, K. K. Y., De Jong, E. and Saddler, J. N. "Modification of Douglas-fir mechanical and kraft pulps by enzyme treatment" TAPPI J. 79 (8) 125-132 (1996).
23. Kanterlinen A.; Jokinen O. and Pere J.. "The mechanism of cellulase/hemicellulase treatment for improved drainage". Biological Sciences Symposium – Tappi Proceedings (1997).
24. Clark, T. A., Allison, R. W. and Kibblewhite, R. P. "Effects of the enzymatic modification on radiata pine kraft fibre wall chemistry and physical properties". Appita J. 50 (4):329 (1997).
25. Mansfield, S. D. and Saddler J. N. "The use of enzymes to enhance Douglas-Fir pulp characteristics" Tappi Proceedings (1997).
26. Kibblewhite, R. P. and Wong, K. K. Y. "Modification of a commercial radiata pine kraft pulp using carbohydrate degrading enzymes". Appita J. 52 (4): 300 (1999).
27. Seo, Y. B., Shin, Y. C. and Jeon, Y. "Enzymatic and mechanical treatment on chemical pulp". Tappi Journal peer reviewed paper (2000).
28. Suurnäkki, A., Siika-aho, M., Tenkanen, M. Buchert, J. and Viikari, L. "Effects of *Trichoderma* cellulases and their structural domains on pulp". Biological Sciences Symposium – Tappi Proceedings (1997).
29. Mansfield, S. D., Dickson, A. R. and Saddler, J. N. "Improving paper properties enzymatic treatment of coarse fibres". Proc. 7th Int. Conf. Biotechnol. Pulp and Paper Ind., Vancouver, Canada A:A 189 (1998).
30. Commission on Biotechnology, International Union of Pure and Applied Chemistry; "Measurement of Cellulase Activities" New Delhi, 1984.
31. Silvy, J., Romatier, G. and Et Chiodi, R. "Methodes pratiques de controle du raffinage", ATIP Vol. 22, num. 1, pp. 31-53 (1968).
32. Yu, X., Minor, J. L. and Atalla, R. H. "Mechanism of action of Simons' stain" Tappi J. 78 (6): 175 (1995).
33. Marx-Figini, M. J., J. App. Poly. Sci., 33, 2097 (1987).
34. Fengel D. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Editado por Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York (1984).
35. Abelson, J., Simon, M. I. "Methods in Enzymology". Vol 160 BIOMASS. Part A: Cellulose and Hemicellulose. p.87.. Ed. - Academic Press, Inc. (1988).
36. Hoja Técnica de la Enzima Pergalase A 40 - Genencor International, Inc..
37. Siika-aho, M., Pere, J., Suurnäkki, A., Tenkanen, M., Buchert, J. and Viikari, L. "Applications of enzymes in pulp and paper industry" 7th Brazilian Symp. On the Chemistry of Lignins and other Wood Components. Belo Horizonte, MG, (2001).
38. Steadman, R. and Luner P. "The effect of wet fibre flexibility on sheet apparent density", Trans. BPBIF Symp., London, UK, pp. 311-337 (1985).

ANEXO A

DECODIFICACIONES DE LAS PROPIEDADES ANALIZADAS SEGÚN EL DISEÑO EXPERIMENTAL

- El valor experimental del punto central (0,2 % - 60 min.) es el promedio de las tres experiencias realizadas.
- Con las ecuaciones de regresión correspondiente a cada propiedad analizada se reemplazan las variables codificadas por las Ecuaciones 5.2. y 5.3..
- Luego despejando el valor de EE (pasta entera) ó EF (fracción fibrosa), se transforma con la Ecuación 5.1. a la unidad correspondiente, obteniéndose los resultados teóricos con cada par de factores analizados.

Decodificación para los Azúcares Reductores en el licor residual:

Carga de Enzima (%)	Tiempo (min)	EXPERIMENTAL	TEÓRICO
		Azúcares Reductores (kg/t)	Azúcares Reductores (kg/t)
0	0		
0,1	30	1,0	1,0
0,3	30	4,5	4,8
0,1	90	3,6	2,7
0,3	90	10,8	10,3
0,05	60	1,0	1,2
0,35	60	9,5	9,8
0,2	15	1,7	1,0
0,2	105	5,5	6,4
0,2	60	5,5	5,5

Decodificación para el CSF de la pasta entera:

Carga de Enzima (%)	Tiempo (min)	EXPERIMENTAL	TEÓRICO (*)	TEÓRICO (=)
		CSF (ml)	% Variación CSF	CSF (ml)
0	0	495		
0,1	30	535	7,9	535
0,3	30	570	18,5	590
0,1	90	525	7,9	535
0,3	90	600	18,5	590
0,05	60	510	0,7	500
0,35	60	580	16,5	580
0,2	15	610	16,9	580
0,2	105	560	16,9	580
0,2	60	580	16,9	580

Decodificación para el WRV_i de la pasta entera:

Carga de Enzima (%)	Tiempo (min)	EXPERIMENTAL	TEÓRICO (*)	TEÓRICO (#)
		WRV _i (gH ₂ O/g fibra)	% Variación WRV _i	WRV _i (gH ₂ O/g fibra)
0	0	1,73		
0,1	30	1,71	1,91	1,76
0,3	30	1,75	1,91	1,76
0,1	90	1,77	6,80	1,85
0,3	90	1,86	6,80	1,85
0,05	60	1,76	4,35	1,81
0,35	60	1,82	4,35	1,81
0,2	15	1,77	0,69	1,74
0,2	105	1,89	8,02	1,87
0,2	60	1,84	4,35	1,81

Decodificación para el % Finos:

Carga de Enzima (%)	Tiempo (min)	EXPERIMENTAL	TEÓRICO (*)	TEORICO (#)
		Finos (%)	% Variación Finos	Finos (%)
0	0	11,6		
0,1	30	5,9	-54,0	5,3
0,3	30	6,9	-36,9	7,3
0,1	90	4,8	-54,0	5,3
0,3	90	6,5	-36,9	7,3
0,05	60	4,8	-58,3	4,8
0,35	60	8,5	-32,6	7,8
0,2	15	7,1	-45,5	6,3
0,2	105	4,8	-45,5	6,3
0,2	60	6,8	-45,5	6,3

Decodificación para la Densidad Aparente de la pasta entera (EE):

Carga de Enzima (%)	Tiempo (min)	EXPERIMENTAL	TEÓRICO (*)	TEÓRICO (=)
		Densidad Aparente (g/cm ³)	% Variación Densidad Aparente	Densidad Aparente (g/cm ³)
0	0	0,561		
0,1	30	0,603	7,4	0,603
0,3	30	0,603	7,4	0,603
0,1	90	0,611	7,4	0,603
0,3	90	0,595	7,4	0,603
0,05	60	0,619	9,8	0,616
0,35	60	0,607	9,8	0,616
0,2	15	0,590	5,5	0,592
0,2	105	0,587	5,5	0,592
0,2	60	0,594	5,5	0,592

Decodificación para el Índice de Tracción de la pasta entera (EE):

Carga de Enzima (%)	Tiempo (min)	EXPERIMENTAL	TEÓRICO (*)	TEÓRICO (≠)
		Índice Tracción (Nm/g)	% Variación Índice Tracción	Índice Tracción (Nm/g)
0	0	42,1		
0,1	30	52,2	5,7	44,5
0,3	30	51,2	23,3	51,9
0,1	90	56,6	33,4	56,2
0,3	90	48,4	15,7	48,7
0,05	60	51,9	25,5	52,8
0,35	60	53,1	25,5	52,8
0,2	15	45,8	7,2	45,1
0,2	105	51,2	22,3	51,5
0,2	60	48,3	14,8	48,3

Decodificación para el Índice de Rasgado de la pasta entera (EE):

Carga de Enzima (%)	Tiempo (min)	EXPERIMENTAL	TEÓRICO (*)	TEÓRICO (=)
		Índice Rasgado (mNm ² /g)	% Variación Índice Rasgado	Índice Rasgado (mNm ² /g)
0	0	18,4		
0,1	30	13,9	-23,6	14,1
0,3	30	15,2	-23,6	14,1
0,1	90	12,8	-31,0	12,7
0,3	90	12,2	-31,0	12,7
0,05	60	13,6	-27,3	13,4
0,35	60	12,3	27,3	13,4
0,2	15	13,8	21,7	14,4
0,2	105	12,8	32,9	12,4
0,2	60	13,5	27,3	13,4

Decodificación para el CSF de la fracción fibrosa (EF):

Carga de Enzima (%)	Tiempo (min)	EXPERIMENTAL	TEÓRICO (*)	TEÓRICO (#)
		CSF (ml)	% Variación CSF	CSF (ml)
0	0	495		
0,1	30	535	7,9	535
0,3	30	570	18,5	590
0,1	90	525	7,9	535
0,3	90	600	18,5	590
0,05	60	510	0,7	500
0,35	60	580	16,5	580
0,2	15	610	16,9	580
0,2	105	560	16,9	580
0,2	60	580	16,9	580

Decodificación para el WRV_t de la Fracción Fibrosa (EF):

Carga de Enzima (%)	Tiempo (min)	EXPERIMENTAL	TEÓRICO (*)	TEÓRICO (#)
		WRV _t (gH ₂ O/g fibra)	% Variación WRV _t	WRV _t (gH ₂ O/g fibra)
0	0	1,73		
0,1	30	1,71	1,91	1,76
0,3	30	1,75	1,91	1,76
0,1	90	1,77	6,80	1,85
0,3	90	1,86	6,80	1,85
0,05	60	1,76	4,35	1,81
0,35	60	1,82	4,35	1,81
0,2	15	1,77	0,69	1,74
0,2	105	1,89	8,02	1,87
0,2	60	1,84	4,35	1,81

Decodificación para el Índice de Tracción de la fracción fibrosa (EF):

Carga de Enzima (%)	Tiempo (min)	EXPERIMENTAL	TEÓRICO (*)	TEÓRICO (#)
		Índice Tracción (Nm/g)	% Variación Índice Tracción	Índice Tracción (Nm/g)
0	0	38,1		
0,1	30	47,1	24,2	47,3
0,3	30	42,7	13,1	43,1
0,1	90	50,7	32,2	50,4
0,3	90	47,0	21,1	46,1
0,05	60	47,0	40,0	53,3
0,35	60	46,2	23,4	47,0
0,2	15	44,2	9,5	41,7
0,2	105	47,2	21,5	46,3
0,2	60	42,8	15,5	44,0

Decodificación para el Índice de Rasgado de la fracción fibrosa:

Carga de Enzima (%)	Tiempo (min)	EXPERIMENTAL TEÓRICO (*)		TEÓRICO (#)
		Índice Rasgado (mNm ² /g)	% Variación Índice Rasgado	Índice Rasgado (mNm ² /g)
0	0	17,7		
0,1	30	16,5	-16,3	14,8
0,3	30	16,4	-15,8	16,4
0,1	90	14,5	-14,1	14,5
0,3	90	11,9	-27,7	11,9
0,05	60	15,1	-8,3	15,1
0,35	60	13,7	-18,1	13,7
0,2	15	12,0	-21,4	12,0
0,2	105	14,2	-28,7	14,2
0,2	60	15,7	-13,2	15,7

Decodificación para el Coeficiente de dispersión de luz de la fracción fibrosa:

Carga de Enzima (%)	Tiempo (min)	EXPERIMENTAL TEÓRICO (*)		TEÓRICO (#)
		Coef. Disp. Luz (m ² /kg)	% Variación Coef. Disp. Luz	Coef. Disp. Luz (m ² /kg)
0	0	20,9		
0,1	30	19,8	-5,8	14,8
0,3	30	19,3	-5,8	16,4
0,1	90	18,9	-9,1	14,5
0,3	90	18,5	9,1	11,9
0,05	60	19,3	-7,5	15,1
0,35	60	19,4	-7,5	13,7
0,2	15	19,7	-4,9	12,0
0,2	105	19,0	-10,0	14,2
0,2	60	19,2	-7,5	15,7