

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE LA MADERA

**APLICACIÓN DE UNA LACASA PARA BLANQUEO DE
PASTA KRAFT DE *Eucalyptus Glóbulos* (Labill)**

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero de la Madera

CLAUDIO ANDRÉS SBÁRBARO PÉREZ

Profesores Guías: Ing. Forestal, Dr., Sr. Javier González Molina
Ing. Forestal, Dr., Sr. Ricardo Silva Soto

SANTIAGO - CHILE
2004

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE LA MADERA

**APLICACIÓN DE UNA LACASA PARA BLANQUEO DE
PASTA KRAFT DE *Eucalyptus Glóbulos* (Labill)**

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero de la Madera

CLAUDIO ANDRÉS SBÁRBARO PÉREZ

Calificaciones:	Nota	Firma
Prof. Guía Sr. Javier González M.	7,0
Prof. Guía Sr. Ricardo Silva S.	6,5
Prof. Consejero Sr. René Carmona C.	6,8
Prof. Consejero Sr. Luis Pacheco	6,6

SANTIAGO – CHILE
2004

RESUMEN

El proceso de blanqueo de pastas celulósicas persigue eliminar y/o modificar la lignina residual presente en las pulpas una vez finalizada la cocción. Para su desarrollo se emplean distintos reactivos químicos, entre los cuales se cuentan, en muchos casos, el cloro ó derivados de éste, como el dióxido de cloro y el hipoclorito de sodio. El empleo de estos reactivos conlleva la formación de compuestos organoclorados (cloroligninas), los que presentan una alta toxicidad y son bioacumulables.

En el presente trabajo se investigó la posibilidad de emplear una enzima lacasa, de origen industrial, como primera etapa de deslignificación de pasta Kraft de *Eucalyptus globulus* (Labill), a fin de disminuir el empleo de reactivos químicos durante la etapa de blanqueo.

En el estudio se empleó la enzima lacasa NS-51003, producida por la empresa NOVOZYMES. Esta enzima fue aplicada a una pasta Kraft cruda de *Eucalyptus globulus* proporcionada por la empresa Celulosa Arauco y Constitución S.A., planta LICANTEN.

Para desarrollar los tratamientos se diseñó un experimento multifactorial en el que se combinaron tres dosis de enzima (0, 400 y 800 nkat/g), dos temperaturas de tratamiento (50 y 70 °C), dos pH de tratamiento (5 y 7) y dos tiempos de tratamiento (2 y 6 horas), las variables respuesta evaluadas al final del tratamiento enzimático fueron: número Kappa, blancura y largo de ruptura.

Los resultados obtenidos muestran importantes caídas en el número Kappa de la pasta después del tratamiento enzimático. Esta disminución alcanzó su máximo valor al combinar una dosis de 800 nkat/g, 70 °C de temperatura, pH 7 y tiempo de tratamiento 2 horas, tratamiento que permitió obtener una reducción en el número Kappa de 25%. Así también, los resultados muestran que las variables respuesta blancura y largo de ruptura resultan, en general, favorecidas por el tratamiento enzimático.

Los resultados logrados en este estudio, junto con otros reportados en la bibliografía, permiten mirar con optimismo la posibilidad de emplear enzimas fúngicas, particularmente lacasas, como pretratamiento de deslignificación de pastas celulósicas, con los beneficios de calidad y medioambientales que esto conlleva.

Palabras claves: enzima, lacasa, deslignificación, pasta Kraft, blanqueo.

SUMMARY

The objective of the bleaching process is to modify and remove the remaining lignin present in wood pulp at the end of pulping process. With this purpose, several chemicals are employed, among them chlorine or derivatives, like chlorine dioxide. As a result, large aqueous volume of toxic and bioaccumulative lignin degradation products (chlorolignins) are released to the environment.

In the present work the possibility of using a laccase enzyme as first step in delignification of *Eucalyptus* wood pulp was studied, in order to reduce the utilization of chemical in the bleaching process. The laccase enzyme used was NS-51003, supplied for the NOVOZYMES Company, and incorporated on to unbleached Eucalyptus Kraft pulp, supplied for the CELULOSA ARAUCO y CONSTITUCIÓN S.A. Company.

A multifactorial design was employed like experimental procedure, considering three enzyme doses (0, 400 and 800 nkat/g), two temperatures (50 and 70 °C), two pH (5 and 7) and two treatments timer (2 and 6 hours). The variables evaluated at the end of enzymatic treatments was Kappa number, brightness and tensile strength of pulp.

The result showed important reductions in Kappa number after the enzymatic treatments. The best treatment combined an enzyme dose 800 nkat/g, temperature 70°C, pH 7 and 2 hours, they reach a reduction of 25% in Kappa number. Also, the results showed that brightness and tensile strength are favored with enzymatic treatment.

The result obtained in the study and others cited in the references allow us to be optimistic about the possibility of using fungal enzymes, particularly laccase, like a pre-treatment to delignification of wood pulp, with the environmental and quality benefits that this process entails.

Keywords: enzyme, laccase, delignification, Kraft pulp, bleaching.

INDICE

RESUMEN.....	I
SUMMARY.....	II
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1. Importancia del sector forestal en la economía nacional	3
2.2. Importancia de la industria de celulosa y papel en el sector forestal chileno. .	3
2.3. Características químicas de la madera	4
2.3.1. Celulosa	4
2.3.2. Poliosas.....	5
2.3.3. Lignina.....	6
2.4. Obtención de pastas celulósicas y blanqueo	10
2.5. Biotecnología y enzimas.	16
2.5.1. Generalidades sobre biotecnología	16
2.5.2. Enzimología y aplicaciones industriales.....	18
2.5.2.1. ¿Qué son las enzimas?.....	18
2.5.2.2. Cinética enzimática	22
2.5.2.3. Degradación enzimática de la lignina.	23
2.5.2.4. Mecanismo catalítico de las lacasas.....	25
2.6. Aplicación de las enzimas en la industria de celulosa y papel.	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Materiales y equipos.	27
3.2. Método.....	29
3.2.1. Medición de la actividad lacasa de la enzima comercial.	29
3.2.2. Aplicación de la enzima a la pasta.....	31
3.2.2.1. Diseño experimental.....	31
3.2.2.2. Preparación de los tratamientos.	32
3.2.3. Evaluación del efecto del tratamiento enzimático.	33
3.2.3.1. Medición del Número kappa. Norma Tappi T-236.	33
3.2.3.2. Preparación de las hojas	35
3.2.3.3. Medición del largo de ruptura.	36
3.2.3.4. Medición de la blancura.....	37

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1. Número Kappa	38
4.1.1. Efecto de la dosis de enzima	38
4.1.2. Efecto de la temperatura.	41
4.1.3. Efecto del pH.....	42
4.1.4. Efecto del tiempo de tratamiento.	43
4.1.5. Análisis de Pareto para el número Kappa.....	46
4.2. Blancura.	47
4.2.1. Efecto de la dosis.	47
4.2.2. Efecto de la temperatura.	48
4.2.3. Efecto del pH.....	50
4.2.4. Efecto del tiempo de tratamiento.	51
4.2.5. Análisis de Pareto para la blancura ISO.	52
4.3. Largo de ruptura.	53
4.3.1. Efecto de la dosis.	53
4.3.2. Efecto de la temperatura.	55
4.3.3. Efecto del pH.....	56
4.3.4. Efecto del tiempo de tratamiento.	57
4.3.5. Análisis de Pareto para el Largo de Ruptura.	58
4.4. Análisis estadístico general.	60
5. CONCLUSIONES	61
6. BIBLIOGRAFÍA	63
7. APÉNDICE	69
8. ANEXO	79

1. INTRODUCCIÓN

En los procesos de pulpaje para la producción de pastas celulósicas no es posible eliminar toda la lignina presente en la madera sin afectar de una u otra forma las fibras de celulosa que se utilizarán en la producción de papel (Paperloop, 2002). En los pulpajes Kraft, convencional y modificado (método RDH), procesos químicos más efectivos y mayormente difundidos, se estima que entre un 5 y un 10% de la lignina inicial contenida en la madera queda presente en la pasta una vez que se culmina con el proceso de pulpaje.

El pulpaje Kraft es también el de mayor uso en nuestro país y presenta ventajas comparativas sobre los demás tipos de procesos de deslignificación de la madera, debido a que es el proceso más fácil y económico en la recuperación de reactivos y a que genera pastas de mejores características mecánicas (González, 1998)

Para lograr fabricar papeles con altos estándares en sus propiedades ópticas, particularmente blancura, se requiere la eliminación casi total de la lignina residual contenida en la pasta, lo que se consigue realizando un tratamiento de blanqueo. En la actualidad dicho proceso se lleva a cabo empleando, en la mayor parte de los casos, sustancias cloradas, principalmente dióxido de cloro (CORMA, 2002).

El blanqueo de pasta Kraft se realiza por medio de distintas secuencias y en varias etapas. Aunque en éstas el cloro sea remplazado por dióxido de cloro (pastas ECF o Elemental Chlorine Free), la utilización de compuestos químicos clorados genera la formación y posterior emisión de sustancias organocloradas, cuya alta toxicidad y presencia en los riles (residuos industriales líquidos) del proceso conlleva potenciales daños a los ecosistemas depositarios de tales efluentes.

Durante los últimos años el proceso de blanqueo convencional ha presentado importantes avances y mejorías, entre las cuales se encuentran la incorporación de la etapa de predeslignificación con oxígeno y la inclusión de otros agentes de blanqueo, tales como el ozono y el peróxido de hidrógeno, en distintas etapas del proceso, llegandose a obtener secuencias que no utilizan cloro en ninguna de sus formas (pastas TCF o Totally Chlorine Free).

Aun así, el empleo de sustancias cloradas sigue siendo un problema recurrente en la producción de pastas celulósicas blancas, debido a que es un compuesto capaz de reaccionar con todo tipo de estructuras aromáticas de la lignina residual, principalmente vía reacciones de sustitución y oxidativas, lo cual explica porqué es el químico blanqueante más eficiente disponible.

En la última década las investigaciones en este campo se han enfocado hacia la biotecnología, particularmente en relación con la posibilidad de emplear enzimas producidas por diferentes microorganismos, tales como xilanasas, mananasas y ligninasas, cuya utilización permitiría, sino eliminar por completo el uso de compuestos clorados, disminuir su empleo en forma significativa, tema en el cual se inserta el presente estudio.

La industria de celulosa chilena está incorporando mejoras tecnológicas en sus procesos productivos, especialmente en la fase de blanqueo. Si bien estas mejoras son ambientalmente reconocidas, la mayor parte de la celulosa que se produce en el país sigue siendo blanqueada con dióxido de cloro, como reactivo principal (Fundación Terram).

El presente estudio pretende abrir una línea de investigación cuyos resultados puedan ser empleados en procesos productivos industriales, lo que permitirá reducir el uso de cloro en el futuro, siendo reemplazado parcial o totalmente por enzimas producidas por hongos de pudrición blanca, pudiendo ser éste un método alternativo de bioblanqueo.

En función de los antecedentes entregados, la presente memoria tiene como objetivo general evaluar el efecto de deslignificación producido sobre una pasta Kraft de *Eucalyptus globulus* sometida a la acción de una enzima ligninolítica comercial del tipo Lacasa. Los objetivos específicos asociados son:

- Determinar, a través del número Kappa, el grado de deslignificación producido por la acción enzimática, considerando las variables pH, temperatura, dosis de enzima aplicada y tiempo de tratamiento.
- Analizar el efecto del tratamiento sobre las propiedades del papel, particularmente blancura y largo de ruptura.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1. Importancia del sector forestal en la economía nacional

La celulosa constituye el principal producto de exportación del sector forestal chileno. El volumen exportado de celulosa creció en un 14% promedio anual entre 1990 y 2000, alcanzando 1,8 millones de toneladas en este último año (Fundación Terram). Esto demuestra que en las últimas décadas el sector forestal chileno ha experimentado un constante desarrollo, en especial la celulosa, llegando a exportar durante el año 2001 un total de 2204,6 millones de dólares FOB, valor que representa un 13% de las exportaciones totales del país. Los principales productos exportados son: pulpa blanqueada de pino (25%), pulpa blanqueada de eucalipto (7,7%), madera aserrada de pino (7,4%), pulpa cruda de pino (6,3%), molduras sólidas de pino (6,0%), papel periódico (5%), astillas s/c de eucalipto (4,8%), otros (37,9%). En particular, las pastas químicas participan con un total de 863,2 millones de dólares FOB, es decir, cerca del 40% del valor exportado por este sector (INFOR, 2002).

Según la institución BOSQUES PARA CHILE, el año 2002 el sector forestal es el segundo más grande en exportaciones del país, subiendo un puesto con respecto a años anteriores.

2.2. Importancia de la industria de celulosa y papel en el sector forestal chileno.

Chile es un importante productor de celulosa Kraft a nivel sudamericano y se ubica en segundo lugar después de Brasil. El año 2001, el volumen total de pasta química producida fue de 2173,2 miles de toneladas. Dentro de las pastas químicas, las pulpas crudas representan un 16% del volumen total exportado, mientras que las pastas blanqueadas de pino y eucalipto suman 725,1 millones de US\$ FOB, representando un 84% del volumen total exportado, demostrando la importancia que tienen las pastas blanqueadas. Las empresas más importantes en este rubro son Celulosa Arauco y Constitución S.A. y empresas CMPC.

La principal celulosa producida en Chile corresponde a la celulosa blanca de fibra larga (pino radiata), destinada principalmente al mercado exportador. Anualmente se producen cerca de 1,3 millones de toneladas de esta celulosa, 60 mil toneladas se destinan para el consumo interno y el resto es exportado. Otra celulosa de fibra larga producida en Chile corresponde a aquella no blanqueada, cuya producción alcanzó las 370 mil toneladas el año 1999, siendo destinada básicamente al mercado exportador. Anualmente se producen 500 mil toneladas de celulosa blanca de fibra corta (eucaliptos), de las cuales 125 mil toneladas se destinan al consumo interno y el resto es exportado (INFOR, 2000).

En la actualidad existen en el país 11 plantas productoras de celulosa, 7 dedicadas a la producción de pulpa Kraft y el resto a pulpa mecánica. La producción se encuentra centrada en dos empresas: 47% en manos de CMPC, del Grupo Matte, y 53% en manos de Celulosa Arauco y Constitución, del Grupo Angelini (Fundación Terram)

2.3. Características químicas de la madera

La composición química de la madera es compleja. En la figura 1 se presenta una clasificación general de ésta.

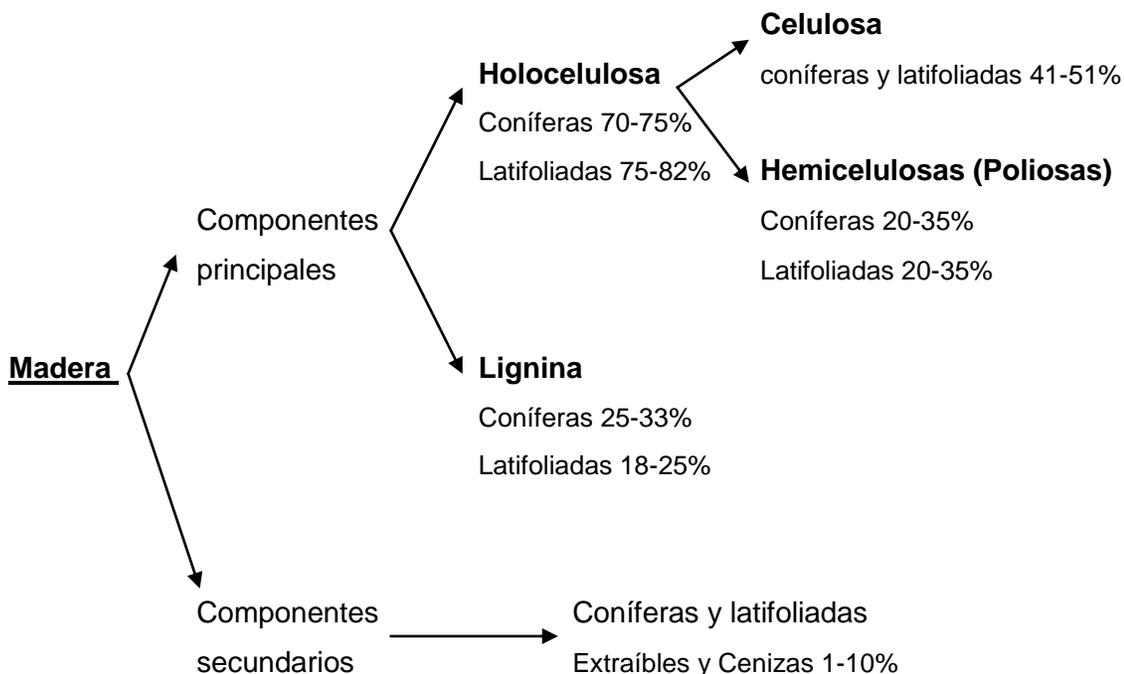


Figura 1: Composición química de la madera. (Melo y Paz, 1992).

2.3.1. Celulosa

La celulosa es el constituyente principal del material leñoso. Este polisacárido representa aproximadamente la mitad del peso de la madera anhidra, tanto en coníferas como latifoliadas. Se define como insoluble en agua, en solventes orgánicos corrientes y en álcalis o ácidos diluidos. El tamaño de la cadena de celulosa se especifica como el grado de polimerización, que varía entre 7000 y 14000 (Kollmann, 1968)

Se puede caracterizar como un biopolímero lineal de alto peso molecular, resultante de la polimerización de glucoanhidropiranosas, enlazadas por uniones β 1-4 glucosídicas.

Las unidades de glucosa están invertidas alternadamente para adoptar la posición geométrica que hace posible el enlace beta glucosídico. La cadena de celulosa es el resultado de la repetición de unidades de celobiosa (figura 2), que posee un largo de 1,03 nm. (Fengel y Wegener, 1984).

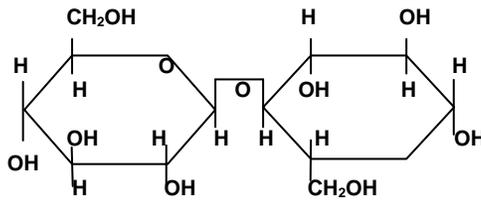


Figura 2. Unidad celobiosa (enlace β 1-4 glucosídico) (Kollmann, 1968).

En la pared celular, la celulosa se presenta en forma de fibrilas o micelas, las que están compuestas por unas 40 cadenas paralelas de celulosa, ubicándose preferentemente en la capa S2. En la celulosa se diferencian zonas amorfas y otras cristalinas, siendo estas últimas el producto de uniones de hidrogeno entre las moléculas de celulosa en estado sólido y con propiedades parecidas a un sistema cristalino, teniendo las celulosas comerciales un 48% de cristalinidad (Kollmann, 1968).

2.3.2. Poliosas

En la madera también encontramos otros polímeros no celulósicos, llamados poliosas o hemicelulosas. Estas son cadenas cortas de heteropolisacáridos y homopolisacáridos, compuestos de pentosas y hexosas, siendo fácilmente hidrolizables. Se diferencian de la celulosa porque están compuestas por más de un azúcar y por poseer ramificaciones o grupos unidos a la cadena principal, además de que las cadenas moleculares son más cortas (Kollmann, 1968).

Las poliosas tienen un bajo grado de polimerización, por lo que presentan mayor solubilidad a temperatura ambiente en agua, en álcalis y en ácidos diluidos.

Dentro de los monómeros que conforman las hemicelulosas o poliosas se encuentran los siguientes: D-xilopiranososa, D-arabinopiranososa, L-arabinofuranosa, D-glucopiranososa, D-manopiranososa D-galactopiranososa, ácido 4-O-metil-D-glucorónico y en cantidades menores ácido glucorónopiranososa, ácido galacturónopiranososa, L-ramnosa y L-fucosa. Estos compuestos se muestran en forma esquemática en la figura 3.

La cadena principal de una poliosa puede estar formada por un solo tipo de monómeros, en cuyo caso es un *homopolímero*, como por ejemplo los xilanos; o por dos ó más tipos de monómeros, denominándose, en este caso, como un *heteropolímeros*.

El grado de polimerización ($^{\circ}P$) de las poliosas varía dependiendo del tipo de monómeros que la componen. Por ejemplo, los glucomananos varían de 60 a 70 $^{\circ}P$, mientras que en el caso de los xilanos es de 100 a 200 $^{\circ}P$, dependiendo de la especie (Kollmann, 1968).

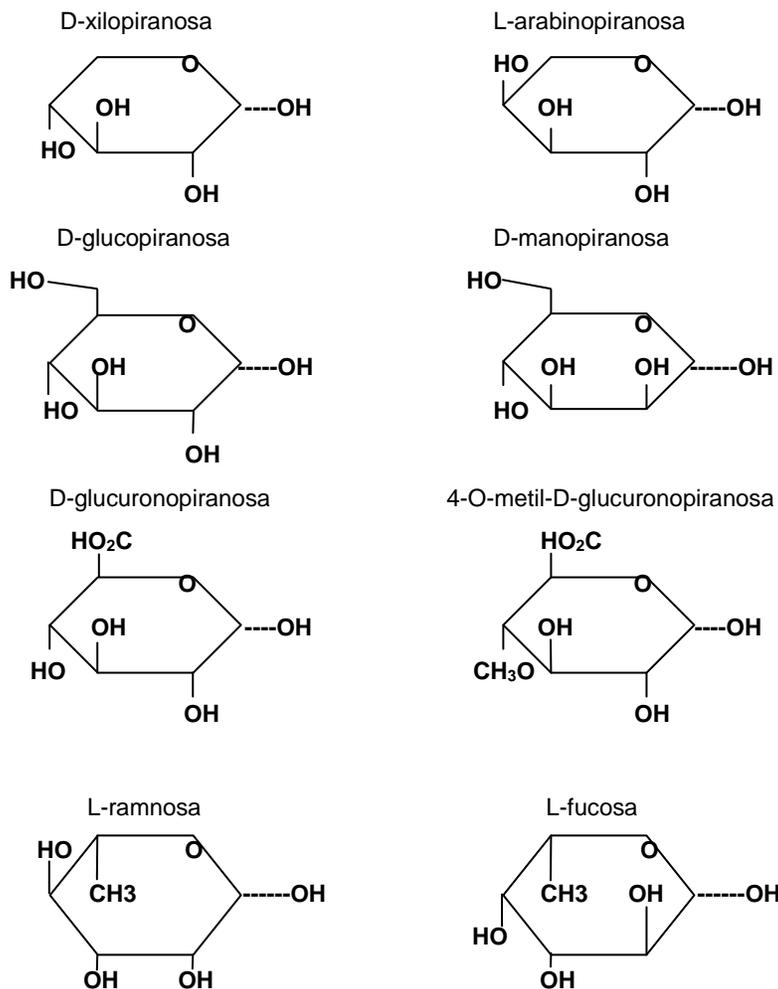


Figura 3. Principales componentes de las hemicelulosas o poliosas (Millar, 2002).

2.3.3. Lignina

Después de la celulosa, la lignina es el segundo compuesto más abundante e importante en las plantas. Esta sustancia orgánica polimérica aumenta las propiedades de resistencia mecánica de los árboles y es el elemento cementante del tejido de las plantas vasculares (Fengel y Wegener, 1984).

El contenido de lignina en las plantas es variable y en el caso de las especies leñosas oscila entre un 20 y un 40 %, dependiendo de la especie y del lugar del árbol que se considere (Kollmann, 1968).

El contenido de lignina en coníferas es mayor que en latifoliadas, en promedio 28% y 21% respectivamente. Por el contrario las latifoliadas son mas ricas en hemicelulosas (González y Garay, 1998).

A continuación se presenta un esquema general de la estructura de la lignina (figura 4).

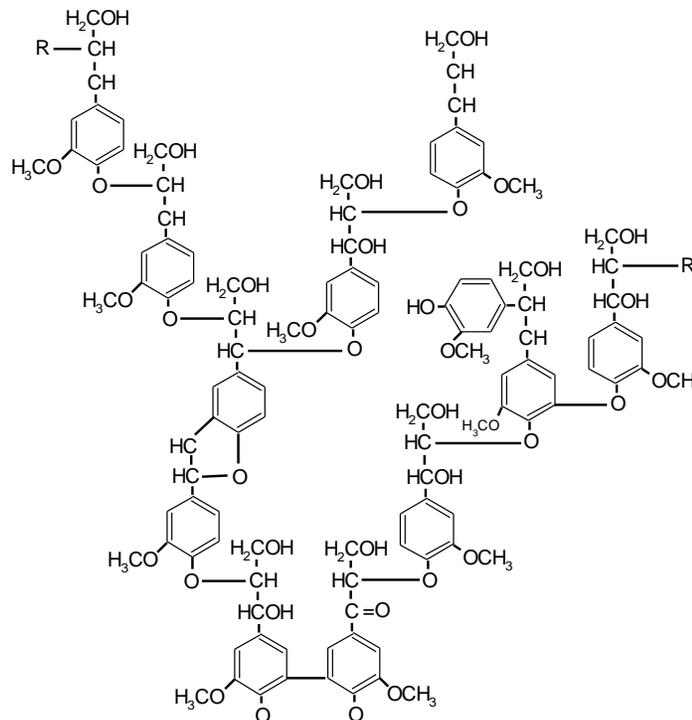


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de la lignina de coníferas propuesta por Gold y colaboradores (1989).

La lignina es una de las sustancias naturales más complejas desde el punto de vista de su estructura y heterogeneidad, debido a que es un polímero ramificado carente de unidades repetitivas ordenadas y regulares.

La macromolécula de lignina no puede ser descrita como una simple combinación de unidades monoméricas o por unos pocos tipos de uniones, como es el caso de la celulosa y poliosas (Fengel y Wegener, 1984). En su formación intervienen complicados sistemas biológicos, bioquímicos y químicos.

Los precursores que se han confirmado de este complejo polímero son: el alcohol p-cumaril, el alcohol coniferil y el alcohol sinapil. Éstos son incorporados al polímero como unidades H (p-hidroxifenil), G (guayacil) y S (siringil), considerados los monómeros fenilpropanoicos de la lignina (figura 5).

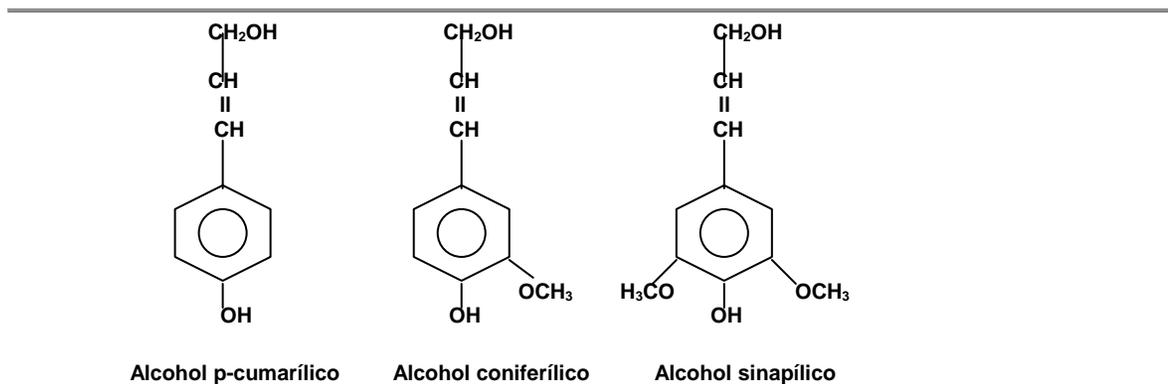


Figura 5. Precursores de la lignina: alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico. (Adler, 1977).

La biosíntesis de la lignina comienza con la glucosa derivada de la fotosíntesis, la cual es convertida en ácidos produciéndose luego la formación de aminoácidos, los cuales serán los precursores para los metabolismos enzimáticos. Los pasos principales para la formación de los alcoholes precursores son hidroxilaciones sucesivas por fenolasas (hidroxilasas) y metilación (por O-metil- transferasas), llevando al ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido 5-hidroxi-ferúlico y ácido sinápico. Finalmente por acción enzimática, los ácidos son transformados en alcoholes hasta obtener los precursores ya mencionados (figura 6).

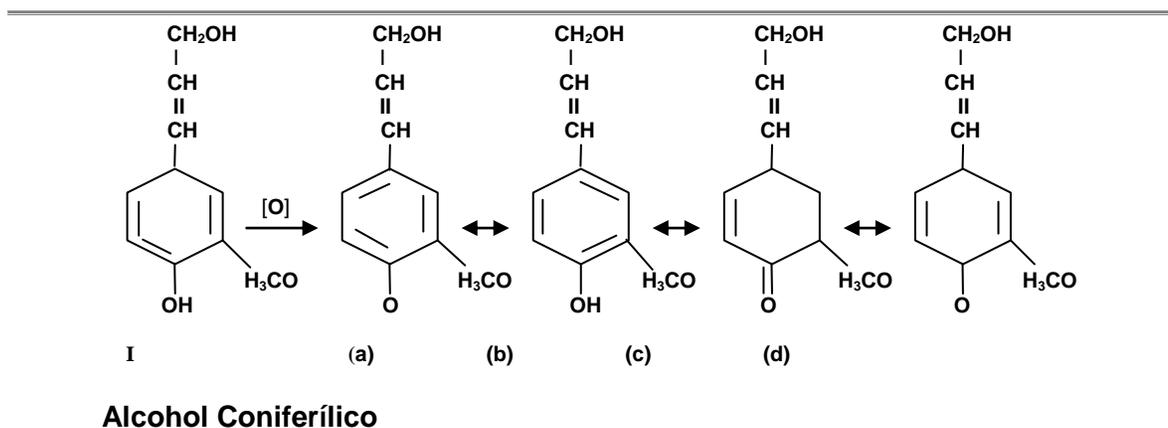


Figura 6. Formas de radical libre del alcohol coniferílico (Higuchi *et al.*, 1977).

Para formar la macromolécula de lignina, la biosíntesis desde las unidades monoméricas de fenil-propano, es descrita por un proceso de polimerización dehidrogenativa. El primer paso dentro de la polimerización es la formación de estructuras dimeras, denominadas dilignoles. La polimerización adicional se llama polimerización “de punta”, involucrando el acoplamiento de monolignoles con los grupos fenólicos terminales de dilignoles u oligolignoles o un acoplamiento de dos grupos terminales de los radicales, dando un polímero ramificado vía tri, tetra, penta y oligolignoles.

Estas macromoléculas no son formadas por un mecanismo regular, sino que por una unión aleatoria de lignoles a un polímero no lineal (Higuchi *et al.*, 1977).

Los enlaces más comunes encontrados en la molécula de lignina son del tipo aril-éter, con una frecuencia aproximada de un 50%. Existen varios modelos estructurales de la lignina debido a que no es una simple combinación de compuestos y a que su formación no tiene un orden predeterminado.

La determinación de grupos funcionales, tales como, grupos alifáticos, hidroxilos aromáticos, benzil alcoholes, éteres, carbonilos y metoxilos son los que permiten la dilucidación estructural de la lignina por medio de métodos físicos y químicos, o la combinación de ambos.

No existen valores uniformes para los pesos moleculares de las ligninas técnicas debido a su heterogeneidad, dependiendo del proceso de obtención y la influencia de los distintos métodos de purificación. Los valores para sulfonatos de lignina varían entre mil y más de cien mil o aún un millón. Para ligninas kraft, generalmente se reportan valores promedio más bajos, de 3.500 y 2.900 para pino y latifoliadas respectivamente.

En la madera la lignina está localizada principalmente en la lamela media y en menor cantidad en los espacios entre las fibrilas de la pared celular. En ambos casos es depositada junto con las hemicelulosas (Higuchi, 1990).

La lignina en su estado nativo es un material hidrofóbico. Un alto contenido de lignina en las pastas afecta las propiedades papeleras en cuatro formas principales:

- Da rigidez a la fibra
- Disminuye las propiedades adhesivas de las superficies interfibrilares
- Inhibe el hinchamiento
- Disminuye el grado de blancura

En las fibras con un alto contenido de lignina la refinación es lenta y las características del papel son baja longitud de ruptura, bajo factor de explosión y pliegue y alta opacidad. El rasgado no está directamente influenciado por el contenido de lignina en la fibra (Melo y Paz, 1992).

2.4. Obtención de pastas celulósicas y blanqueo

El pulpaje persigue la separación de las fibras celulósicas que constituyen la madera desde la matriz lignocelulósica, lo que puede ser realizado por diferentes métodos implicando, según éste, diferentes grados de remoción de la lignina. En la actualidad, prácticamente un 100% de las pastas producidas en el mundo se obtienen por procesos de pulpaje químicos o mecánicos.

En la obtención de pulpa mecánica se utiliza prácticamente toda la fibra de madera existente en el tronco, en la que se incluyen tanto los carbohidratos (celulosa y hemicelulosas) como la lignina. En este tipo de procesos, el grado de extracción de la lignina es mínimo, obteniéndose rendimientos muy altos, por sobre el 90%.

En cuanto a los procesos químicos, el más ampliamente difundido es el proceso al sulfato o kraft, mediante el cual se genera casi el 70% del total de pastas de madera producidas en el mundo. Este permite eliminar cerca del 95% de la lignina presente en la madera, empleando para ello sulfuro de sodio e hidróxido de sodio como reactivos de cocción.

La pulpa producida, tanto por procesos mecánicos como químicos, requiere ser blanqueada para poder obtener pastas con altos grados de blancura. Para esto es necesario eliminar la lignina remanente en ella, lo que se consigue a través de reacciones con determinadas sustancias químicas.

En el proceso de blanqueo de las pastas mecánicas y siempre que sea necesario- ya que en la mayoría de los casos se utiliza con su color original- se emplea peróxido de hidrógeno, que cambia la estructura química de la lignina alterando su color. En cambio, en el proceso con pastas químicas, la lignina es modificada y eliminada principalmente por reacción con compuestos clorados (dióxido de cloro o hipoclorito), o compuestos oxigenados. Así también, el empleo de otros reactivos, como el oxígeno molecular y el ozono, es cada vez más frecuente.

El cloro y el dióxido de cloro, si bien son efectivos para remover la lignina y para fortalecer la pulpa, reaccionan con compuestos orgánicos presentes en ella, dando lugar a cientos de contaminantes organoclorados, incluyendo las dioxinas, que son uno de los más potentes venenos conocidos.

En las tecnologías convencionales de blanqueo de la pasta química, la lignina se degrada y remueve con la ayuda de compuestos oxidantes, como el gas de cloro elemental (Cl_2), en secuencias del tipo estándar.

En los nuevos procesos de blanqueo se aplican varias etapas, que emplean dióxido de cloro (ClO_2) e hipoclorito de sodio (NaOCl), utilizándose además el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno (O_2), u otros agentes.

El empleo de los diferentes compuestos depende del tipo de pasta y del proceso de blanqueo que se utilice. Si en la secuencia Cl_2 es reemplazado por ClO_2 , la secuencia se denomina EFC (Elemental Chlorine Free). Si la secuencia no considera la utilización de cloro en ninguna de sus formas, se denomina TCF (Total Chlorine Free) (Millar, 2002).

En la figura 8 se muestra un esquema del proceso kraft para la obtención de pastas químicas, y la ubicación de la etapa de blanqueo dentro de éste.

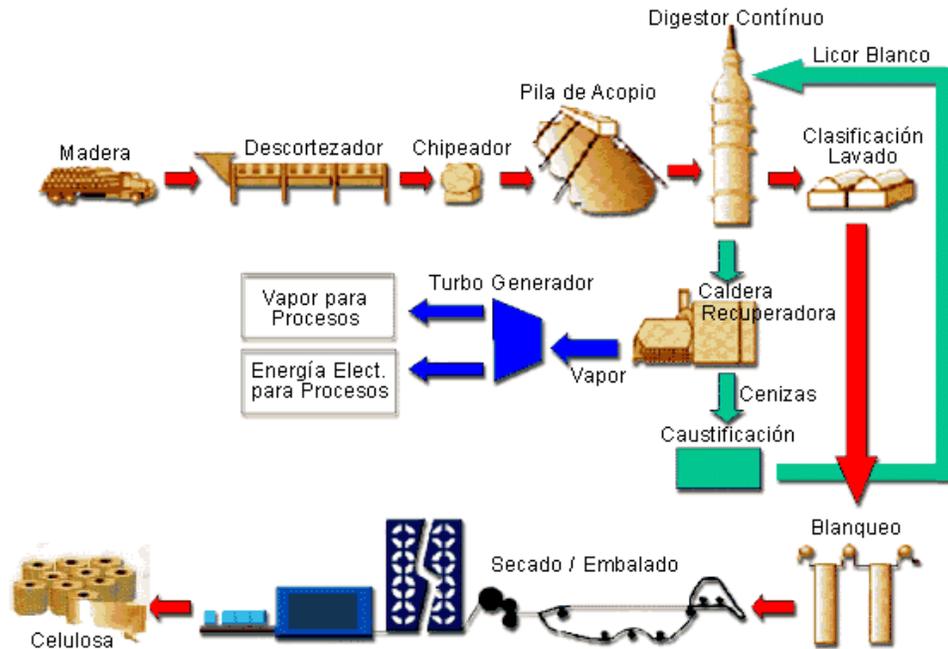


Figura 8. Esquema del proceso productivo de celulosa Kraft (Fuente: papelnet.cl).

La industria de la celulosa y el papel emplea anualmente alrededor de 3 millones de toneladas de cloro para blanquear la pasta. Como este gas es extremadamente reactivo, se combina con la materia orgánica de la pasta y produce una importante cantidad de nuevos compuestos, conocidos como organoclorados.

Muchos organoclorados resisten la degradación natural y se acumulan a través del tiempo en el ambiente. Se han encontrado compuestos organoclorados provenientes de las plantas de pasta y papel en los sedimentos, en las aguas, en los organismos vivos, en el aire y en los mismos productos de papel. (Millar, 2002)

Los compuestos organoclorados afectan la vida acuática y se almacenan en los tejidos grasos de los organismos, bioacumulándose a lo largo de la cadena alimentaria. En los seres humanos provocan trastornos de los sistemas inmunológico, nervioso y reproductor. Entre los organoclorados identificados hasta ahora en los efluentes de las plantas de blanqueo existen también numerosos compuestos cancerígenos y mutagénicos. En la actualidad el Cl_2 propiamente tal casi no se usa y está siendo reemplazado por otros compuestos, nombrados en párrafos anteriores.

Antes de verter los efluentes, estos deben ser tratados biológicamente. Estos son efectivos para tratar materia orgánica –los restos de la madera- que se pueden degradar fácilmente. De hecho, todas las fábricas deben aplicar este tipo de tratamientos, pero ellos no son eficaces en la destrucción de los residuos organoclorados, permaneciendo el 70 % de estos (www.oni.escuelas.edu.ar).

El proceso de blanqueo significa necesariamente una pérdida de rendimiento, por cuanto se elimina una parte importante de la lignina que aún permanece en la pasta café y, además, una parte de las fibras de celulosa se degradan producto de la acción de los agentes químicos de blanqueo. Normalmente, en todo el proceso de blanqueo se pierde entre un 5 y 9% de la pasta café, para alcanzar blancuras de 87-90% ISO.

Las plantas de celulosas más modernas han incorporado, posterior al proceso de pulpaje, una etapa adicional de deslignificación con oxígeno, la cual consiste en aplicar altas dosis de este reactivo a la pasta café para producir la oxidación de la lignina previo a las etapas de blanqueo, lo que permite una reducción sustancial en el consumo de químicos de blanqueo.

Las principales etapas en las secuencias de blanqueo son:

C: Cl_2 , al combinarse con la lignina, forma los compuestos clorados, que son posteriormente solubles en agua.

E: Extracción con soda cáustica (NaOH). Convierte los compuestos clorados en sustancias solubles. Esta etapa se acompaña a veces con químicos como el oxígeno y/o peróxido de hidrógeno. En ese caso esta etapa se representa como Eo/Eop.

D: Dióxido de cloro (ClO_2). Su acción es similar al Cl_2 , pero su efecto sobre las fibras es menos dañino, y desde el punto de vista ambiental genera menos residuos. Se estima que 1 kg. de ClO_2 equivale en poder oxidante a 2,63 kg. de Cl_2 .

H: Hipoclorito de sodio y de calcio (NaOCl y Ca(OCl)_2). Actualmente su uso está siendo erradicado de los procesos de blanqueo debido a su bajo poder oxidante y a la generación de cloroformo.

O: Oxígeno gaseoso (O_2). Es usado en la etapa de deslignificación para reforzar la etapa E de extracción. Su poder oxidante es 4,4 veces el del Cl_2 .

P: Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se usa como una etapa adicional de blanqueo o para reforzar la etapa E de extracción.

Las etapas descritas previamente se combinan en cierta secuencia según el procedimiento implementado en cada planta, lo que depende del tipo de pasta que se produce (materia prima y método de cocción).

Actualmente existe una clasificación de las secuencias de blanqueo disponibles según los reactivos que se empleen. Estos son:

Blanqueo convencional: Utiliza Cl_2 , o ClO_2 y NaOH en diferentes secuencias y proporciones. Se generan riles (residuos industriales líquidos) con compuestos organoclorados, incluyendo dioxinas. Estas últimas no se generan cuando se utiliza ClO_2 en vez de Cl_2 .

Blanqueo ECF (libre de Cl_2): No utiliza Cl_2 , el que es reemplazado por ClO_2 (figura 9). También se puede incluir H_2O_2 , O_2 , O_3 y algunas enzimas. Si se incluye una etapa de predesignificación, el consumo de ClO_2 puede disminuir en un 40%. Los efluentes contienen AOX (Halógenos Orgánicos Adsorbibles) , pero no dioxinas.

Blanqueo TCF (totalmente libre de Cloro): No utiliza cloro en ninguna forma. Las secuencias de blanqueo TCF incluyen combinaciones de algunos de los siguientes agentes de blanqueo: H_2O_2 , O_2 , O_3 y enzimas. Los efluentes no contienen organoclorados, pero si otros compuestos fenólicos, y podrían ser recirculados al ciclo de recuperación de reactivos, descargando solamente aquellas líneas residuales de baja concentración orgánica (www.conama.cl).

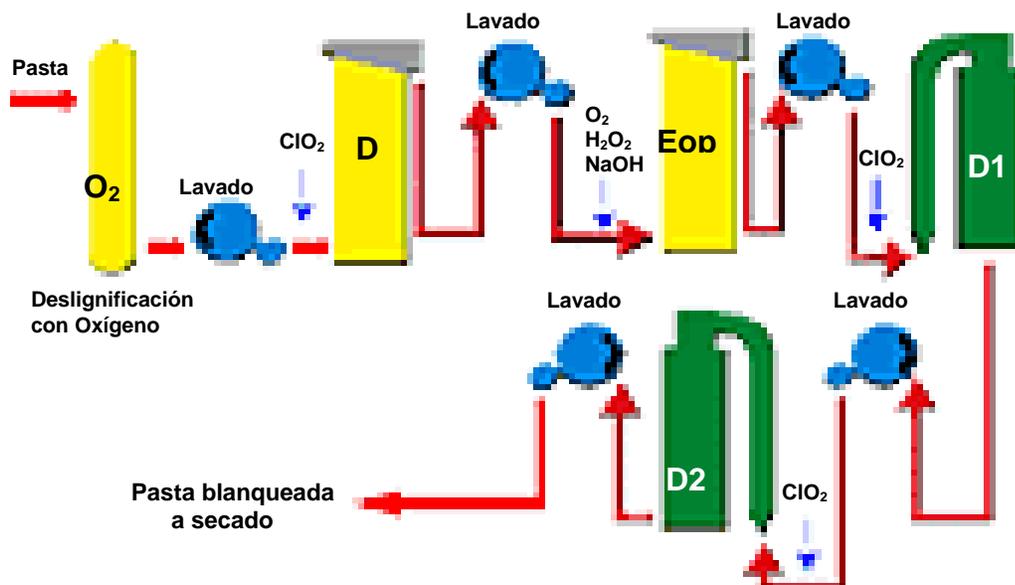


Figura 9. Secuencia de blanqueo ECF típica (libre de cloro elemental) de cuatro etapas (Fuente: papelnet.cl).

Dependiendo del tipo de madera y del producto que se desee obtener hay distintas secuencias para las etapas de blanqueo. Una secuencia estándar típica para madera de coníferas puede considerar la utilización de cloro, dióxido de cloro, hidróxido de sodio, oxígeno y peróxido (Cuadro 1)

En particular, en las pastas ECF la etapa con aplicación de Cl_2 es reemplazada por ClO_2 , lo que permite la disminución de sustancias organocloradas en los efluentes. Una secuencia de blanqueo típica en este tipo de pastas es: D Eop D1 D2. En el cuadro 1 se indica el significado de cada una de estas etapas.

También existe el proceso super ECF o ECF – ZD, en el cual se reemplaza parte del Cl_2 (etapa C) por ozono (etapa Z) sólo en una de las fases. En este caso la secuencia de blanqueo queda: ZD Eop D1 D2 (Millar, 2002).

Etapa	Nombre	Reactivos Utilizados
C ₂₀ /D ₈₀ ó D	Cloración y/o Dióxido	Cloro gas y/o dióxido de cloro
Eop	Extracción alcalina oxidativa	Hidróxido de sodio, oxígeno y peróxido de hidrógeno
D1	Dióxido 1	Dióxido de cloro
D2	Dióxido 2	Dióxido de cloro

Cuadro 1. Significado de las etapas de blanqueo en diferentes secuencias (Millar, 2002).

Para poder establecer una correcta combinación de etapas en un proceso de blanqueo, es necesario conocer las reacciones químicas de cada uno de los agentes blanqueantes con los componentes de la pasta. Numerosas investigaciones han permitido establecer cómo estos agentes afectan a la lignina (la cual es necesario remover), a los carbohidratos (a los cuales debe prevenirse su degradación) y otros materiales orgánicos o iones metálicos que pueden interferir positiva o negativamente durante el proceso de blanqueo. Así por ejemplo, se ha establecido que, en el uso del cloro, éste es capaz de reaccionar con todo tipo de estructuras aromáticas de la lignina residual, principalmente vía reacciones de sustitución, además de oxidativas, lo cual explica por qué es el químico blanqueante más eficiente que existe. Presenta un bajo efecto sobre las hemicelulosas y, bajo condiciones controladas, no ataca la fracción de celulosa (Carlton y Douglas, 1996).

En la figura 10 se muestra un ejemplo de lo que ocurre con el cloro cuando es usado como agente blanqueante.

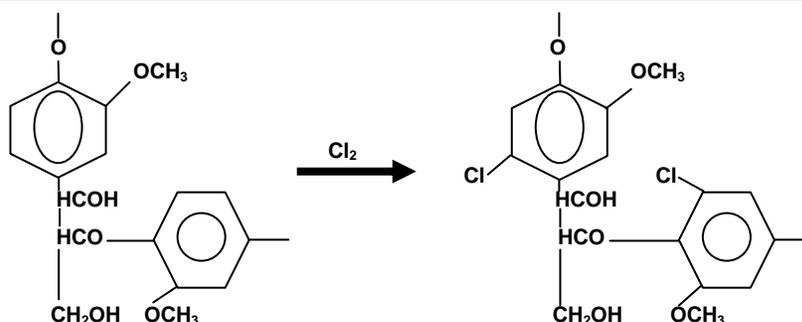


Figura 10. Reacción de sustitución, cuando se utiliza como agente blanqueante cloro elemental, formación de un compuesto organoclorado (Carlton y Douglas, 1996).

El residuo líquido procedente de la planta de blanqueo es conducido a la planta de tratamiento primario para su neutralización y filtrado, antes de incorporarlo a los riles.

La pasta resultante, prácticamente libre de lignina, puede ser secada para obtener celulosa blanca (caso en el que la fábrica de papel no está integrada a la planta de celulosa), o bien, la suspensión de celulosa en medio líquido es transportada a la planta de papel (caso de fábricas integradas).

La predesignificación con oxígeno es una técnica cada vez más presente en los procesos de obtención de pastas celulósicas. Esta consiste en el tratamiento de la pasta con oxígeno gaseoso en ambiente alcalino antes del blanqueo, o bien, como una etapa adicional luego de un proceso de pasteo convencional o extendido, lo que permite la eliminación de hasta un 50% de la lignina residual (Silva H., 2002).

Las ventajas de la deslignificación con oxígeno son, ante todo, los ahorros en sustancias químicas en la planta de blanqueo y una menor contaminación en el agua residual. También es posible lograr reducciones importantes en la carga contaminante del efluente, por ejemplo en la demanda biológica de oxígeno (DBO), en los compuestos clorados, en los haluros orgánicos adsorbibles (AOX) y en el color. El consumo de cloro puede reducirse en un 50% (Carlton y Douglas 1996).

El ozono se utiliza como agente de blanqueo primario en lugar del cloro. Además de eliminar la formación de compuestos clorados nocivos, el blanqueo con ozono permite su recuperación y la de los filtrados de la fase de extracción dentro del sistema de recuperación química. Este método reduce de manera significativa las cargas de haluros orgánicos adsorbibles, la demanda biológica de oxígeno y el color que se descargan en las aguas residuales desde la planta de blanqueo (Ingenieroambiental.com)

En la actualidad existe consenso respecto a la necesidad de buscar alternativas tecnológicas más limpias. Se debe recordar que el papel es un recurso reciclable, por lo que puede convertirse en el sustituto de otros materiales con mayor impacto medioambiental, como el plástico. En este sentido, la industria papelera está haciendo esfuerzos para poner en marcha procesos de producción más limpios y eficientes, que reduzcan el consumo de materias primas (fibras vírgenes, agua y energía) y la contaminación ligada al proceso (mejorar los métodos para eliminar la lignina, reutilización de productos químicos, etc.). Todo ello con el objetivo de reducir costos y conseguir un ciclo cerrado en el que se genere menos contaminación del aire, del agua y del suelo, y se disminuya la presión sobre los bosques, buscando una gestión forestal sostenible y un uso cada vez más eficiente de las plantaciones forestales.

2.5. Biotecnología y enzimas.

2.5.1. Generalidades sobre biotecnología

La **biotecnología**, en un sentido amplio, se puede definir como la aplicación de organismos, componentes o sistemas biológicos para la obtención de bienes y servicios. Según otros autores la **biotecnología** son nuevas técnicas que utilizan procesos de fabricación con organismos vivos o que manipulan procesos biológicos para producir cosas que no se producirían necesariamente de manera natural. En cualquier caso y en términos estrictos, el término **biotecnología** significa aprovechamiento técnico de procesos biológicos (Erikson, 1985).

El fin último de emplear este tipo de métodos es que son intrínsecamente amistosos con el medio ambiente. Las investigaciones para desarrollar aplicaciones biotecnológicas en el campo de la industria de la celulosa se basan en que el proceso de deslignificación se produce en forma natural por la acción de algunos organismos que degradan la madera o algunos de sus componentes. Este proceso de deslignificación es un proceso bioquímico básico en el denominado ciclo del carbono (Messner *et al.*, 1998).

La **biotecnología** se viene empleando desde hace mucho tiempo atrás, ejemplos de esto son la producción de quesos, el cultivo de champiñones y la fermentación de bebidas y alimentos (yogur, cerveza, salsa de soja, etc.) entre otros. Por esto las mayores aplicaciones se han desarrollado en la industria alimenticia; además hay avances significativos en la industria de detergentes y el tratamiento de aguas (riles o desechos líquidos del diario vivir). Así, los campos de utilización son cada vez más diversos, entre los que se cuentan aplicaciones terapéuticas (antibióticos, vacunas, etc.), diagnósticos (salud humana, calidad de alimentos, calidad ambiental, etc.), medio ambiente (biorreparación, residuos urbanos, etc.) y alimentos.

La **biotecnología** es intrínsecamente interdisciplinaria ya que está caracterizada por la reunión de conceptos y metodologías procedentes de muchas ciencias. Algunas de las ramas implicadas son: microbiología, bioquímica, genética y química. El avance de la Biotecnología dependerá cada vez más de esta colaboración entre disciplinas y del uso de lenguajes y paradigmas comunes, así como el que cada tipo de especialista comprenda los logros y limitaciones de las otras ramas biotecnológicas (www.usal.es)

Según John Smith (1996), muchos procesos biotecnológicos, especialmente los que se realizan en entornos cerrados industriales, tienen un triple núcleo:

- Obtener el mejor catalizador biológico para una función o proceso específico.
- Obtener el mejor ambiente para la función de ese catalizador biológico, mediante una serie de diseños técnicos en los que es fundamental la ingeniería química.
- Procesamiento del material, consistente en separar y eventualmente purificar el material biológico producido.

En las últimas décadas y por presiones medioambientales, se ha puesto especial atención respecto a la utilización de procesos biológicos para ayudar a los procesos convencionales, lo cual puede traducirse en una baja de costos por el menor uso de reactivos tradicionales.

Como ciencia, la **biotecnología** está en sus comienzos, con un tremendo potencial que puede ser explotado en los próximos cincuenta años.

Es importante que la opinión pública esté consciente de lo que es la **biotecnología** y de cómo puede ser usada para resolver algunos de los mayores problemas en el mundo: permitir a la agricultura y a la industria alimentaria el mantenerse a ritmo con el crecimiento de la población; controlar la contaminación del medio ambiente y el suministro de agua y asegurar la salud.

La investigación en **biotecnología** requiere una gran inversión de capital y un compromiso a largo plazo. Sin embargo, para satisfacer las demandas del consumidor y no perder ritmo en un mercado global cada vez más competitivo, las industrias necesitarán asimilar todos los recursos posibles, incluida la **biotecnología** (www.usal.es).

En Chile, la **biotecnología** es una disciplina creciente y, dada la situación de recursos naturales y el nivel de desarrollo de las ciencias biológicas, ésta posee un tremendo potencial, habiendo sido declarada un área prioritaria para el estado.

Así por ejemplo, a fines del año 1999 existían 32 Proyectos FONDEF en curso en diferentes áreas de la Biotecnología. Entre 1991 y 1997 FONDEF apoyó un total de 153 proyectos, 49 de los cuales estaban insertos en el área biotecnológica, correspondiendo a una inversión aproximada de 30 millones de dólares (Gil e Irarrázabal, 1999).

En el Departamento de Ingeniería de la Madera de la Universidad de Chile, se han desarrollado 2 de estos proyectos FONDEF bajo la dirección del Dr. Sr. Javier González Molina, estos son "Biopulpaje Kraft aplicado a P. radiata" desarrollado entre los años 97 y 2001 y "WDF para biopulpaje Kraft", realizado entre 2001 y 2003. Además a partir del 2003, se encuentra en ejecución un tercer proyecto biotecnológico, denominado "Biopulpaje Kraft aplicado a especies del genero Eucalyptus", desarrollado por el mismo grupo.

En 1998 se llevó a cabo el IV Congreso Nacional de **biotecnología** en la ciudad de Talca. Este evento contó con la participación de cerca de 400 personas y abarcó todas las áreas de la Biotecnología que han comenzado a desarrollarse en Chile y que son importantes para el país (Libro de Resúmenes, U. de Talca, 1998). En 1999 se publicó el libro

“Biotecnología en Chile, Oportunidades de Innovación Tecnológica”, que fue editado por Lionel Gil y Carlos Irrarázabal.

En Agosto de 1999 se hizo una presentación al Committee of Biotechnology de la **IUPAC** en Berlín para organizar el 12th International Biotechnology Symposium para el año 2004 en Santiago de Chile. Esta propuesta fue aprobada y se apoyó que Chile hiciera una proposición formal al Comité directivo de la IUPAC, la que finalmente fue aprobada en Febrero de 2000. Es primera vez que este evento, que se realiza cada 4 años, se lleva a cabo en un país latinoamericano, realizándose en Concepción a principios del 2004.

2.5.2. Enzimología y aplicaciones industriales.

Puede considerarse que la tecnología enzimática actual comenzó a desarrollarse en 1874 cuando un químico danés, Chritian Hansen, obtuvo el primer extracto enzimático. Los extractos enzimáticos procedían de vegetales o microorganismos que se utilizaban con diferentes propósitos: procesos de fermentación, panificación y elaboración de alimentos y de bebidas alcohólicas. (www.forest.ula.ve)

La aplicación de enzimas en el ámbito industrial se ha orientado principalmente a las industrias de detergentes, alimentos, de almidón y textil, mientras que su aplicación al campo de las industrias de celulosa y papel se encuentra actualmente en estudio.

2.5.2.1. ¿Qué son las enzimas?

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas; es decir, son sustancias que sin consumirse en una reacción son capaces de aumentar en forma notable la velocidad de ésta. No son capaces de producir reacciones por sí mismas, sino que sólo aceleran las que espontáneamente podrían producirse en la naturaleza, pudiendo catalizar procesos a baja temperatura compatibles con la propia vida. No llevan a cabo reacciones que sean energéticamente desfavorables ni modifican el sentido de los equilibrios químicos, sino que aceleran su consecución, actúan en pequeña cantidad y se recuperan casi indefinidamente. En síntesis, la vida es una cadena de procesos enzimáticos, teniendo como sustrato a las sustancias más simples, como el agua y el anhídrido carbónico.

La tecnología genética ha permitido la producción de enzimas en grandes cantidades casi sin importar cuál es su procedencia. La ingeniería de proteínas permite ajustar las propiedades de la enzima previo a su producción. Esto significa que la tecnología enzimática está en un momento “estelar” de su desarrollo.

Químicamente, las enzimas están formadas por carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N) y azufre (S) combinados siempre con pesos moleculares bastante elevados. Antiguamente recibían nombres particulares, asignados por su descubridor. Al ir aumentando el número de enzimas descubiertas fue necesario establecer una nomenclatura sistemática que informara sobre la acción específica de cada enzima y los sustratos sobre los cuales actuaba. Es así como el nombre de una enzima consta de tres partes: el sustrato preferente, el tipo de reacción catalizada y la terminación “asa” (Mathews, 1998).

Entre las principales características de las enzimas están las siguientes:

- Son moléculas estrictamente proteicas, es decir son proteínas globulares que regulan la mayor parte de las reacciones metabólicas de los seres vivos. Prueba de ello es que las enzimas sufren desnaturalización, no dializan y sufren saturación.
- Las sintetizan tanto los seres autótrofos como heterótrofos.
- Pueden actuar a nivel intracelular o extracelular.
- Son solubles en agua y tienen gran difusibilidad en los líquidos orgánicos.
- Son activas a concentraciones pequeñas.
- Son catalizadores orgánicos verdaderos, pues no son afectadas por la reacción que catalizan.
- No se alteran durante las reacciones en que participan.
- Generalmente muestran especificidad, es decir, la acción de la enzima es extremadamente selectiva sobre un sustrato específico.

En las enzimas humanas una de las características más sobresalientes es su elevada especificidad. Ésta es doble y explica que no se formen subproductos:

1. **Especificidad de sustrato.** El sustrato (S) es la molécula sobre la que la enzima ejerce su acción catalítica.
2. **Especificidad de acción.** Cada reacción está catalizada por una enzima específica.

La acción enzimática se caracteriza por la formación de un complejo que representa el estado de transición. Esto es, primero están independientes la enzima y el sustrato, después el estado de transición que es la enzima unida al sustrato y finalmente se tiene la enzima y el producto en forma independiente.



Algunas enzimas actúan con la ayuda de estructuras no proteicas. En función de su naturaleza éstas se denominan:

1. **Cofactor.** Se trata de iones o moléculas inorgánicas.
2. **Coenzima.** Es una molécula orgánica. Se debe señalar que muchas vitaminas funcionan como coenzimas, y realmente las deficiencias producidas por la falta de vitaminas responden más bien a que no se puede sintetizar una determinada enzima en la que la coenzima es la vitamina. (Mathews, 1998).

La clasificación general de las enzimas se realiza en función de su acción catalítica específica, formándose los 6 grandes grupos que se indican en el Cuadro 2.

Tipo de enzima	Característica	Ejemplo
Oxidorreductasas	Catalizan reacciones de oxidorreducción, transferencia de hidrógeno (H) o electrones (e-) de un sustrato a otro	*Succinato *Deshidrogenasa *Lacasas *Peroxidasas
Transferasas	Catalizan la transferencia de grupos químicos funcionales (distinto de hidrógeno) de un sustrato a otro	*Glucoquinasa, (glucosa, fructosa, etc)
Hidrolasas	Catalizan las reacciones de hidrólisis	*Lactasa, *proteasa, *celulasa, etc
Liasas	Catalizan reacciones de ruptura o unión de sustratos (adición a los dobles enlaces)	*Acetacetato descarboxilasa
Isomerasas	Catalizan la ínter conversión de isómeros (isomerización)	*Fosoftriosa *Isomerasa
Ligasas	Catalizan la unión de dos sustratos con hidrólisis simultánea de un nucleótido trifosfato (ATP, GTP, etc.)	*Piruvato carboxilasa

Cuadro 2. Clasificación de las enzimas según su función catalítica.

Entre los factores que influyen de manera más directa sobre la actividad de una enzima están: el pH, la temperatura, las concentraciones del sustrato y productos finales, y la presencia de cofactores e inhibidores.

Debido a su naturaleza proteica y a la existencia de factores que influyen en su actividad, las enzimas se pueden desnaturalizar, lo que conlleva la pérdida de su estructura terciaria debido a la ruptura de los puentes que forman dicha estructura, lo que puede ocurrir principalmente por cambios de temperatura y variaciones de pH. Existirán entonces valores óptimos para estos parámetros, en los cuales la actividad enzimática es máxima (figura 11). En algunos casos, si las condiciones se restablecen, una proteína desnaturalizada puede volver a su anterior plegamiento o conformación, proceso que se denomina renaturalización.

Efecto del pH. Al comprobar experimentalmente la influencia del pH en la velocidad de las reacciones enzimáticas se obtienen curvas que indican que las enzimas presentan un pH óptimo de actividad. El pH puede afectar de varias maneras:

- El centro activo puede contener aminoácidos con grupos ionizados que pueden variar con el pH.
- La ionización de aminoácidos que no están en el centro activo puede provocar modificaciones en la conformación de la enzima.
- El sustrato puede verse afectado por las variaciones de pH.

Algunas enzimas presentan variaciones peculiares. La **pepsina** del estómago, presenta un óptimo a pH=2, y la **fosfatasa alcalina** del intestino a pH= 12

Efecto de la temperatura. A temperaturas bajas, las enzimas se hallan "muy rígidas" y cuando se supera un valor considerable, en general sobre 50°C, la actividad cae bruscamente porque, como proteína, la enzima se desnaturaliza (Figura 11).

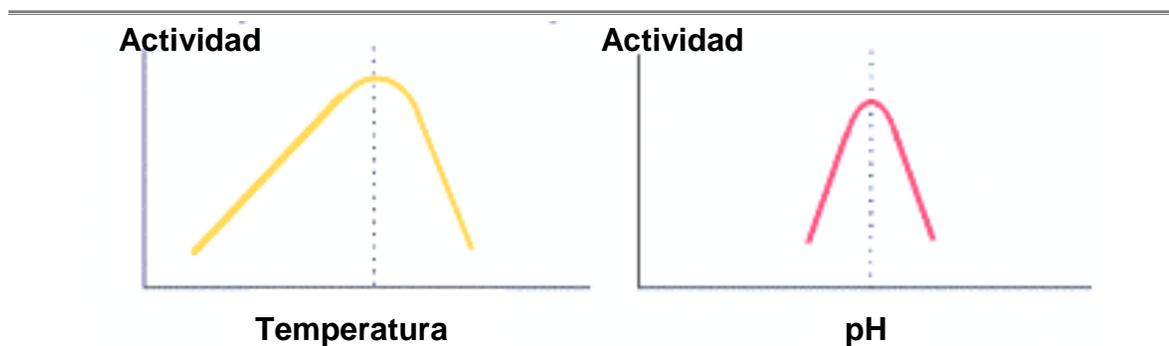


Figura 11. Variación de la actividad enzimática frente a la temperatura y al pH (Lafacu.com).

El modo de acción utilizado por las enzimas tiene como objetivo disminuir la energía de activación (E_a). En las reacciones espontáneas, los productos finales tienen menos energía libre de Gibbs (ΔG) que los reactantes; por lo tanto, en las reacciones espontáneas se libera energía de Gibbs ($\Delta G < 0$). Sin embargo, el comienzo de la reacción se requiere un aporte inicial de energía, que es la energía de activación. La acción de los catalizadores consiste, precisamente, en disminuir la E_a . Las enzimas cumplen este rol, siendo especialmente eficaces ya que disminuyen la E_a aún más que los catalizadores inorgánicos (Figura 12).



Figura 12. Efecto catalítico de una enzima en una reacción (Lafacu.com).

Existen dos modelos sobre la forma en que el sustrato se une al centro activo de la enzima. Éstos son:

El modelo llave–cerradura, en el cual se supone que la estructura del sustrato y la del centro activo son complementarias, como encaja una llave en una cerradura. Este modelo es válido en muchos casos, pero no siempre es correcto.

El modelo del ajuste inducido, en este caso el centro activo adopta la conformación idónea sólo en presencia del sustrato. La unión del sustrato al centro activo de la enzima desencadena un cambio conformacional que da lugar a la formación del producto (Mathews, 1998).

2.5.2.2. Cinética enzimática

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca de la reacción catalítica específica de la enzima. La velocidad de una reacción catalizada por una enzima puede medirse con relativa facilidad. Debido a que en muchos casos no es necesario purificar o aislar la enzima, ésta se puede determinar midiendo la aparición de productos o la desaparición de reactivos. La cinética de la reacción se obtiene al seguir la velocidad de aparición de un producto en función del tiempo.

A medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo el sustrato de la reacción.

Para estudiar la cinética se mide el efecto de la concentración inicial del sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción, manteniendo la cantidad de enzima constante. Para realizar estas mediciones se necesitan equipos especiales como un espectrofotómetro, el que mide la aparición de un producto con respecto al tiempo por una diferencia de absorbancia.

Medición de la actividad enzimática

La actividad enzimática se mide en unidades. Una unidad de actividad (UA) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto. La actividad específica es el número de unidades de actividad por miligramo de proteína (U/mg) o por mililitro de solución enzimática (U/ml).

El sistema internacional de unidades (SI) ha definido la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que transforma 1 mol de sustrato por segundo. Esta unidad se llama katal (kat). Dado que 1 mol equivale a 1×10^6 μmoles y 1 minuto corresponde a 60 segundos, resulta que 1 katal equivale a 60×10^6 U. Esta unidad es muy grande, de forma que se utilizan frecuentemente submúltiplos como el microkatal (μkatal) o el nanokatal (nkat), equivalentes a 1×10^{-6} kat y 1×10^{-9} kat respectivamente.

2.5.2.3. Degradación enzimática de la lignina.

Las principales **enzimas ligninolíticas**, es decir que degradan la lignina, son producidas por hongos de pudrición blanca, como pasa en la naturaleza con el caso del Palo Podrido. Dentro de las más importantes están: lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasas (L) (Silva S., 2002). También existen otras enzimas que participan en la degradación de la lignina, como las celobiosa quinona oxidoreductasas (CBQ), celobiosas dehidrogenasas (CDH), glioxal oxidasas (GLOX), glucosa oxidasas (GO), veratril alcohol oxidasas (VAO) y algunas esterases (Call y Mücke, 1997).

El mecanismo catalítico básico de las **enzimas ligninolíticas** es su acción directa sobre la estructura de la lignina a través de la oxidación de grupos fenólicos y no fenólicos. En el caso de las lacasas esta reacción involucra la pérdida de un electrón mediada por la reducción de Cu(II) a Cu(I), que a su vez reduce O_2 a H_2O , permitiendo que la enzima actúe en forma cíclica. Se ha planteado que las lacasas pueden degradar estructuras aromáticas y no fenólicas, a través de mediadores como el ABTS (2,2'-azino-bis (ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) y el HBT (1-hidroxibenzotriazol). En este caso, la enzima participaría en la transferencia de electrones (reacciones de óxido - reducción) con la ayuda de tales mediadores, los que poseen un potencial de reducción más elevado que el propio potencial de la lacasa (Call y Mücke, 1997).

Cada hongo de pudrición blanca produce enzimas oxidativas e hidrolíticas, que actúan en ciertos sitios de la pared celular, en este caso sobre lignina y holocelulosa, en diferentes secuencias enzimáticas. De acuerdo a Zabel y Morrell (Op.Cit.), los componentes carbohidratos son depolimerizados inicialmente por una serie de enzimas hidrolíticas, mientras que la lignina es degradada inicialmente por enzimas oxidativas. Al respecto, la descomposición de la lignina procede por reacciones oxidativas las cuales separan los enlaces carbono-carbono o cadenas éter, actuando también en el rompimiento de enlaces a varios grupos funcionales.

La lignina se considera resistente a la degradación microbiológica en comparación con polisacáridos y otros biopolímeros (Higuchi, 1990). En la naturaleza, la lignina es fragmentada por radicales libres producidos por distintos tipos de fenoloxidasas y peroxidasa secretadas por hongos. Los intermediarios de degradación de bajo peso molecular son posteriormente mineralizados por los propios hongos y por bacterias.

Algunos de estos hongos de pudrición blanca son los basidiomicetos *Ceriporiopsis subvermispora*, *Trametes versicolor*, *Phlebia tremellosa* (de alta especificidad y eficiencia ligninolítica), *Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Phlebia radiata*, como típicos organismos degradadores de lignina (Akhtar *et al.*, 1997).

Algunos hongos de pudrición blanca degradan selectivamente la lignina, donde la hifa ubicada en el lumen de la célula degrada progresivamente lignina del borde del lumen de la pared secundaria y también sectores de la lamela media, provocando una separación de las células. (Akhtar *et al.*, 1997). La lignina degradada por estos organismos contiene menos carbono, hidrógeno y grupos metóxilos, pero más oxígeno y grupos carbonilos y carboxílicos (Eaton y Hale, 1993).

A continuación se describen las principales enzimas que participan en el proceso de degradación de la lignina:

- **Lignina peroxidasa (LiP):** Corresponden a un grupo de isoenzimas acidificadas y codificadas por genes de estructura múltiple cuya expresión es regulada por los nutrientes. Las LiP requieren la presencia de H_2O_2 en sus reacciones catalíticas con lignina. Investigaciones sobre el modo de acción de estas enzimas indican modificaciones de los enlaces químicos C-C en unidades de fenil propano. Las LiP se reportan además en oxidaciones de unidades fenólicas de lignina a radicales catiónicos de tipo aryl. Esta enzima muestra un peso molecular de 38 a 43 kDa, y contiene protoporfirina IX como grupo prostético, catalizando oxidaciones de un electrón de compuestos fenólicos y no fenólicos, generando radicales fenoxi y cationes (Silva S., 2002).
- **Manganeso peroxidasa (MnP):** Al igual que las LiP, incluyen múltiples enzimas acidificadas y codificadas por genes de estructura múltiple cuya expresión es regulada por los nutrientes. En el caso de MnP, la regulación por Mn^{+2} también ocurre. Las MnP son ligeramente más grandes que las LiP, pero exhiben el mismo ciclo catalítico básico de las peroxidases. Las MnP requieren de H_2O_2 en sus reacciones catalíticas con la lignina. El rol de las MnP es la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} , actuando sobre las estructuras fenólicas de la lignina. Usualmente es producida por hongos de pudrición blanca y tiene un peso molecular similar al de la lignina peroxidasa. Contiene protoporfirina IX como grupo prostético y cataliza oxidaciones de un electrón en compuestos fenólicos y no fenólicos (Silva S., 2002).
- Las enzimas fenol oxidativas como las **lacasas** (*p*-difenol oxígeno reductasa, E.C. 1.10.3.2), comprenden un grupo de isoenzimas acidificadas y codificadas por genes de estructura múltiple, pero su peso molecular es mayor al de las LiP. Las lacasas proveen los fenoxiradicales y quinonas desde la degradación de la lignina, los cuales juegan un rol clave en la descomposición de la celobiosa. Esta oxidasa presenta un peso molecular de entre 60-80 kDa y cataliza cuatro oxidaciones de un electrón de la mayoría de los compuestos fenólicos, formándose radicales fenoxi libres intermedios (Silva S., 2002).

Desde el descubrimiento de las enzimas depolimerizadoras de lignina, se han logrado importantes avances en la caracterización de sus propiedades y comprensión de sus mecanismos catalíticos.

2.5.2.4. Mecanismo catalítico de las lacasas.

Las lacasas catalizan la reducción del oxígeno molecular a dos moléculas de agua. Esta acción se inicia básicamente a partir de un sustrato fenólico, el cual es oxidado por la acción de la enzima (Reinhammar, 1984). La oxidación de compuestos modelo de lignina produce reordenaciones en su estructura, derivadas de la ruptura de los enlaces alquil-aril, oxidación de alcoholes bencílicos y ruptura de anillos aromáticos, entre otros, generándose una gran variedad de compuestos fenólicos y no fenólicos oxidados (Bourbonnais y Paice, 1992).

La mayor parte de las lacasas, salvo algunas excepciones, presenta en su estructura cuatro átomos de cobre, clasificándose en tres tipos. El cobre tipo I (Cu^{2+}), responsable del intenso color azul de la proteína, funciona como aceptor de un electrón y se encuentra encerrado en la proteína, siendo inaccesible al agua (Falk y Reinhammar, 1972).

El cobre tipo II (Cu^{2+}) presenta una alta afinidad por aniones, que actúan como inhibidores de la actividad enzimática, como es el caso de F^- , N^{3-} y CN^- . El cobre tipo II es el responsable de la sensibilidad de la enzima a pH altos, debido a que los grupos OH^- que se unen a este centro de cobre inhiben la actividad de la proteína. El centro donde se ubica funciona como aceptor de un electrón (Reinhammar, 1984).

En cuanto al cobre tipo III, este es un complejo binario, formado por un par de iones Cu^{2+} - Cu^{2+} que actúan en forma cooperativa durante la transferencia de electrones. Este centro funciona como aceptor de dos electrones.

La lacasa usa como mecanismo la reducción de O_2 a dos moléculas de H_2O (Call y Mücke, 1997). Para llevar a cabo esta reducción se requiere de cuatro electrones, los que son tomados de la oxidación de cuatro moléculas de sustrato, por sustracción de un electrón de cada molécula. Los aceptores de estos electrones son los átomos de cobre tipo I, II y III de la enzima.

La enzima debe ser reducida por un sustrato orgánico antes de reaccionar con el O_2 . El aceptor primario de electrones es el cobre tipo I. Una vez que este ha sido reducido, el cobre tipo II reacciona con el sustrato, reduciéndose a su vez. Luego se produce la reducción del sitio binuclear de cobre tipo III, por transferencia intramolecular de los dos electrones de los sitios I y II previamente reducidos. A continuación el oxígeno molecular reacciona con el sitio III reducido y se forma el intermediario O^{2-}_2 . La reducción de este intermediario hasta H_2O prosigue en dos pasos de transferencia de un electrón, mediados por el sitio de cobre tipo I: un primer paso que conduce probablemente a la formación de O^- intermediario, que permanece unido al sitio de cobre tipo III, seguido de un segundo paso de transferencia de un electrón para reducir el O^- a H_2O (Malmström, 1982).

2.6. Aplicación de las enzimas en la industria de celulosa y papel.

En la actualidad, la utilización de enzimas en la industria de celulosa y papel es más bien marginal. El principal consumidor de enzimas a nivel mundial lo constituye la industria de detergentes, y en segundo lugar se encuentra la industria de alimentos. Le siguen la industria de almidón y textil. La industria de celulosa y papel consume muy bajas cantidades de enzima, casi exclusivamente hemicelulasas (Xilanasas y mananasas).

A mediados de la década de los ochenta comenzaron los estudios tendientes a la aplicación de xilanasas a pastas celulosicas (Viikari *et al.*, 1986). Por otra parte, en la década de los noventa se iniciaron los estudios orientados al empleo de las lacasas en el blanqueo de pastas Kraft, observándose que su efecto se ve favorecido al aplicarlas después de que la pasta ha sido tratada con xilanasas (Call y Mücke, 1997).

Los ensayos hechos a nivel de laboratorio bajo este patrón de operación permitieron reducciones en la utilización de compuestos clorados de hasta un 25% para alcanzar un grado de deslignificación dado. Con el paso de los años el uso de las xilanasas en la industria de la celulosa y papel ha tenido un aumento constante y muchas empresas se están acercando a un uso comercial de éstas. En la actualidad el uso más eficaz de estas enzimas es en pre-tratamientos de blanqueo, con el objeto de reducir el uso de elementos químicos corrosivos en las etapas de blanqueo de pasta Kraft.

Considerando que las normativas internacionales que regulan aspectos medio ambientales son cada vez más estrictas, en un futuro cercano será imprescindible el uso de métodos que no afecten el medio ambiente y los ecosistemas que se encuentran alrededor de las diferentes plantas de celulosa. En este sentido, el presente proyecto de memoria pretende ser una contribución al estudio de la potencial aplicación de tratamientos enzimáticos para la reducción del contenido de lignina residual en pastas Kraft de eucalipto, lo que permitiría disminuir el consumo de compuestos clorados en los procesos de blanqueo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales y equipos.

Los equipos y materiales que se utilizaron, considerando todas las actividades, se indican a continuación:

Equipos



Agitador magnético



Balanza



Baño termoregulado



Bomba de vacío



Espectrofotómetro



pH- metro



Extensómetro



Formadora de hojas



Medidor de blancura

- Estufa

Materiales



ABTS.



Pasta Kraft



Enzima Lacasa

- **ABTS** (Ácido 2,2`-azinobis-3-etilbenzotiazolina sulfónico).
- **Pasta Kraft** de *Eucalyptus globulus* (Labill) (Provista por Celulosa Arauco y Constitución S.A., Planta Licanten).
- **Enzima** comercial tipo **lacasa** NOVOZYMES NS-51003 (Provista por convenio de Investigación, J. González M. – NOVOZYMES).
- Acetato de sodio 0,2 M
- Ácido acético 0,2 M
- Ácido cítrico 0,01 M
- Ácido clorhídrico 1 M
- Ácido sulfúrico 4N
- Almidón 1% p/v
- Fosfato disódico 0,02 M
- Hidróxido de sodio 1%
- Permanganato de potasio 0,1N
- Tampón citrato-fosfato pH= 5 y pH= 7
- Tiosulfato de sodio 0,2 N
- Yoduro de potasio 1M
- Papel filtro
- Material de laboratorio (material de vidrio, reactivos químicos, etc.)
- Bolsas de polietileno autosellantes

3.2. Método.

El trabajo experimental desarrollado durante la ejecución de la memoria ha sido dividido en tres actividades fundamentales, existiendo una metodología específica para cada una de ellas. Este estudio se enmarca en las bases de investigación del proyecto FONDEF D021 –1086 (2003-2006). “Biopulpaje kraft aplicado a Especies del genero Eucalyptus”.

Actividades:

1. Medición de la actividad lacasa presente en el preparado enzimático comercial empleado.
2. Aplicación de la enzima a la pasta.
3. Evaluación del efecto del tratamiento enzimático.
 - I. Número kappa
 - II. Blancura
 - III. Longitud de ruptura

3.2.1. Medición de la actividad lacasa de la enzima comercial.

En esta etapa se realizó la medición de la actividad lacasa presente en el preparado enzimático comercial empleado en este estudio, con el fin de determinar el volumen necesario de éste para cada dosis de enzima a aplicar, de acuerdo a los tratamientos especificados en la actividad 2. Para llevar a cabo esta tarea se utilizó un espectrofotómetro UV, procediendo según el protocolo definido por Wolfenden y Willson (Wolfenden y Willson, 1982). Como se indica en éste, la actividad lacasa se midió haciendo reaccionar la dilución enzimática con una solución de ABTS (ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina sulfónico) 20 mM, en tampón acetato 100 mM, pH 5,2.

Los pasos seguidos en esta actividad se resumen a continuación:

Preparación del sustrato ABTS.

Para obtener la solución deseada fue necesario poner en un vaso precipitado ácido acético 0,2 M, luego adicionar acetato de sodio 0,2 M y posteriormente agregar agua destilada mezclando lo solución con un homogeneizador electromagnético y, a continuación, medir pH (5,2).

Si el pH es mayor al deseado, es necesario adicionar unas gotas de ácido clorhídrico. Una vez estabilizado el pH requerido, se agregó el ABTS. Finalmente la solución se guardó en frasco oscuro, envuelto en papel aluminio para proteger de la luz, a una temperatura de 4°C.



Figura 13. ABTS en polvo y su preparación para el uso.

Preparación de la dilución enzimática.

Dado que el preparado enzimático comercial es altamente concentrado fue necesario diluirlo antes de medir la actividad enzimática. La dilución empleada fue de 1 en 10.000, para lo cual se tomó 1 ml del preparado comercial y se diluyó en 999 ml de agua destilada, y luego se cogieron 4 ml del preparado diluido y se diluyó en 36 ml de agua destilada. Esta solución final fue la utilizada para medir la actividad enzimática.

Medición de la actividad enzimática.

La evaluación se hizo sobre la dilución enzimática obtenida de acuerdo a lo indicado en el punto anterior. En el ensayo se mezclaron 500 μ l de ABTS 20 mM en tampón acetato (ácido acético - acetato de sodio) 100 mM a pH 5,2, con 500 μ l de la dilución enzimática. En el espectrofotómetro UV se midió el incremento de absorbancia debido a la oxidación del ABTS (que cambia de un color verde claro a verde oscuro) a una longitud de onda de 436 nm durante un minuto. Bajo estas condiciones, el coeficiente de extinción molar del producto (ABTS oxidado) es $29.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.



Figura 14. Sustrato ABTS antes y después de la reacción con la enzima.

Para obtener la actividad enzimática en nkat/ml a partir de los valores entregados por el espectrofotómetro en unidades de actividad (UA) se empleó el factor de conversión derivado (apartado 2.5.2.2. de la Revisión Bibliográfica) y que corresponde al siguiente:

$$1 \text{ nkat/ml} = 0,06 \text{ UA/ml}$$

3.2.2. Aplicación de la enzima a la pasta.

Esta etapa corresponde a la aplicación de la enzima lacasa comercial a una pasta kraft de *Eucalyptus globulus* (Labill) de número kappa inicial 17. Para ello se definió un conjunto de tratamientos que combinan:

- Tres dosis de enzima: 0 nkat /g de pasta (trat. control), 400 nkat /g y 800 nkat /g.
- Dos temperaturas de tratamiento: 50 y 70 °C.
- Dos tiempos de tratamiento: 2 y 6 horas.
- Dos pH: 5 y 7.

Las variables respuesta evaluadas fueron 3:

- Número kappa final de la pasta (después del tratamiento enzimático).
- Blancura.
- Largo de ruptura.

3.2.2.1. Diseño experimental.

El experimento de aplicación de la enzima a la pasta se estructuró de acuerdo a un diseño factorial multinivel completamente al azar y cuatro factores o variables de entrada: dosis de enzima (3 niveles), temperatura (2 niveles), pH (2 niveles) y tiempo de tratamiento (2 niveles), de tal manera de analizar las diferencias que pudieran observarse en la interacción de éstos.

Con la combinación de los niveles de los diferentes factores se obtuvo un total de 24 tratamientos distintos, con tres repeticiones de cada uno, lo que da un total de 72 unidades experimentales.

Modelo General

Sean A, B, C, D los cuatro factores previamente identificados con los niveles mencionados, y \mathcal{X} : variable respuesta.

$$\mathcal{X}_{ijklm} = \mu + A_i + B_j + C_k + D_l + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (AD)_{il} + (BC)_{jk} + (BD)_{jl} + (CD)_{kl} + (ABC)_{ijk} + (ABD)_{ijl} + (ACD)_{ikl} + (BCD)_{jkl} + (ABCD)_{ijkl} + \varepsilon_{ijklm}$$

con $i = 1, 2, 3$ (0, 400 y 800 nkat/g)
 $j = 1, 2$ (50 y 70 °C)
 $k = 1, 2$ (pH 5 y 7)
 $l = 1, 2$ (2 y 6 horas)
 $m = 1, 2, 3$ (repeticiones)

En la actividad se ocupó una consistencia fija de un 5% para la pasta y se aplicó la enzima lacasa NS-51003 (De la empresa NOVOZYMES) previamente diluida.

3.2.2.2. Preparación de los tratamientos.

En la preparación de los distintos tratamientos se procedió como sigue:

Se tomaron 20 g secos de pasta y se llevaron a una consistencia de 5% empleando para ello una dilución tampón citrato-fosfato, ajustado a pH 5 o pH 7 dependiendo del tratamiento. La solución pasta-tampón se disgregó durante 1 minuto para abrir la pasta y a continuación se puso dentro de una bolsa de polietileno autosellante. Luego se llevó la bolsa al baño termostático ajustado a la temperatura correspondiente al tratamiento (50 ó 70 °C) para atemperar el sistema pasta-tampón. Finalmente, se adicionó la dosis de enzima diluida (0, 400 u 800 nkat/g de pasta, según el tratamiento) y se mantuvo la bolsa en el baño termostático por un tiempo de 2 o 6 horas, de acuerdo al tratamiento en desarrollo. A fin de mantener oxigenado el sistema, la bolsa se abrió y cerró cada 15 minutos aproximadamente. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Transcurrido el tiempo de tratamiento se sacó la bolsa del baño y se extrajo la pasta para su filtrado y lavado. Esto se realizó en un sistema de extracción por vacío, conformado por un quitasato, un buchner y papel filtro. Se puso la pasta tratada sobre el papel filtro y se lavó con hidróxido de sodio al 1% (\pm 500 ml) para extraer los restos de enzima y derivados de la lignina presentes. Finalmente se lavó la pasta con agua destilada (\pm 500 ml) con el objeto de eliminar los restos de soda presentes en ella.

El resumen de los tratamientos aplicados se indica en el cuadro 3.

Tratamiento	Dosis enzima (nkat/g)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	pH
1	0	2	50	5
2	0	2	50	7
3	0	2	70	5
4	0	2	70	7
5	0	6	50	5
6	0	6	50	7
7	0	6	70	5
8	0	6	70	7
9	400	2	50	5
10	400	2	50	7
11	400	2	70	5
12	400	2	70	7
13	400	6	50	5
14	400	6	50	7
15	400	6	70	5
16	800	6	70	7
17	800	2	50	5
18	800	2	50	7
19	800	2	70	5
20	800	2	70	7
21	800	6	50	5
22	800	6	50	7
23	800	6	70	5
24	800	6	70	7

Cuadro 3. Tratamientos enzimáticos aplicados a pasta Kraft de *E. globulus*.



Figura 15. Tratamientos enzimáticos.

3.2.3. Evaluación del efecto del tratamiento enzimático.

En esta etapa se procedió a la evaluación del efecto de los distintos tratamientos enzimáticos sobre las propiedades de las pastas. Las variables medidas fueron: número kappa, blancura y longitud de ruptura, empleándose norma Tappi para la primera, e ISO para las restantes propiedades.

3.2.3.1. Medición del Número kappa. Norma Tappi T-236.

Para determinar el número kappa se realizó primeramente una prueba a los reactivos (blanco) con el objeto de analizar la calidad de los productos químicos a utilizar en la medición. El resultado de la prueba, según la norma, debe ser de un gasto de tiosulfato de sodio de 50 ± 1 ml.

Para cada tratamiento, se tomó una muestra de pasta y se formó una tortilla, de donde se extrajo una porción para realizar la medición del kappa y el resto se dejó en la estufa para determinar el peso anhidro de la pasta. Se cogió la muestra para medir el número kappa y se disgregó en 800 ml de agua destilada, la solución se vertió en un vaso precipitado y, para poder mantenerla homogénea, se revolvió con un agitador electromagnético (Figura 16-1).

Para dar inicio a la prueba se adicionó en un vaso precipitado 100 ml de permanganato de potasio (KMnO_4 , 0,1N) y 100 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 4N) dejándose reaccionar en agitación por un lapso de 10 minutos (Figura 16-2). Al cumplirse 5 minutos se midió la temperatura para poder aplicar el factor de corrección (ver en la tabla 30 del anexo). Una vez transcurridos 10 minutos se detuvo la reacción aplicando 20 ml de yoduro de potasio (KI, 1M) (Figura 16-3). Después de agregar el yoduro se tituló con tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,2N) hasta que la solución tomó un color levemente amarillo (Figura 16-4). Seguidamente se agregaron unas gotas de almidón, adquiriendo la solución un color azul oscuro (Figura 16-5). Finalmente se terminó de agregar el tiosulfato de sodio hasta que la solución se transparentó totalmente (Figura 16-6). Con el gasto marcado en la bureta se obtuvo el factor de permanganato (ver cuadro 29 del anexo).

A continuación, se indica la fórmula utilizada para la obtención del número Kappa:

$$\text{N}^{\circ} \text{ Kappa} = \frac{\text{Blanco} - \text{gasto} \times 2 \times \text{factor KMnO}_4 \times \text{factor Temperatura}}{\text{Peso seco}}$$

donde:

Blanco: Gasto de tiosulfato de 50 ± 1 ml.

Gasto: Cantidad de tiosulfato utilizado.

Factor KMnO_4 : Valor obtenido en la tabla para el gasto de tiosulfato.

Factor temperatura: Valor obtenido de la tabla para la temperatura tomada.

Peso seco: peso anhidro de la pasta tomada para la determinación.

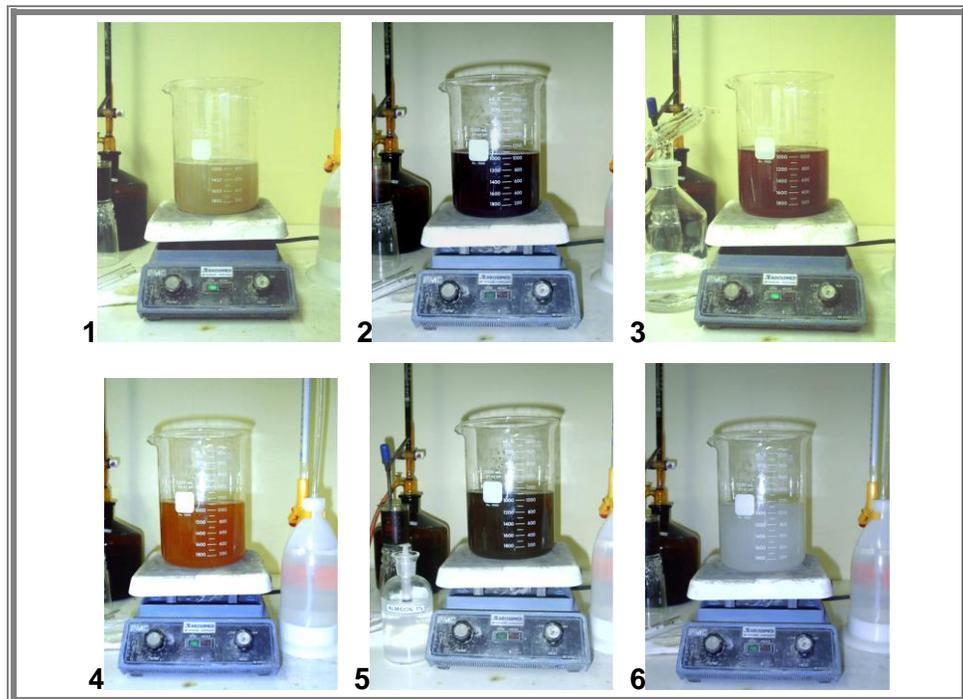


Figura 16. Secuencia de pasos para obtener el Número Kappa.

3.2.3.2. Preparación de las hojas

La formación y preparación de las hojas utilizadas en este estudio fue realizada de acuerdo a la metodología indicada en la norma ISO 5269/2, en las instalaciones de CMPC Papeles S.A. (Planta, Pte. Alto).

En la figura 17 se aprecia la mesa formadora tipo Rapid-Köthen que se utilizó para la formación de las hojas empleadas en esta parte del estudio.



Figura 17. Mesa formadora de hojas Rapid-Köthen.

Para formar las hojas, se cogió una muestra de pasta seca y se disgregó en dos litros de agua destilada. De esta solución se tomó una muestra de pasta para obtener su consistencia (masa de pasta seca por unidad de masa de pasta húmeda).

Con la consistencia obtenida se determinó el volumen de pasta necesario para formar hojas de gramaje 100 g/m^2 . Después se midió el volumen predeterminado y se vació en la mesa formadora para obtener papeles de 20 cm de diámetro, con el gramaje previamente indicado.

Una vez formadas las hojas, se les aplicaron los ciclos de presión y temperatura predeterminados por la norma. Luego fueron ambientadas por un lapso de 30 minutos para finalmente ser pesadas y utilizadas en las mediciones de las propiedades.



Figura 18. Papeles en sala climatizada ambientándose para medir propiedades.

3.2.3.3. Medición del largo de ruptura.

La metodología de referencia utilizada para medir el largo de ruptura fue la norma ISO 1924. En la figura 19 se puede observar el equipo empleado para medir el largo de ruptura (resistencia a la tensión).

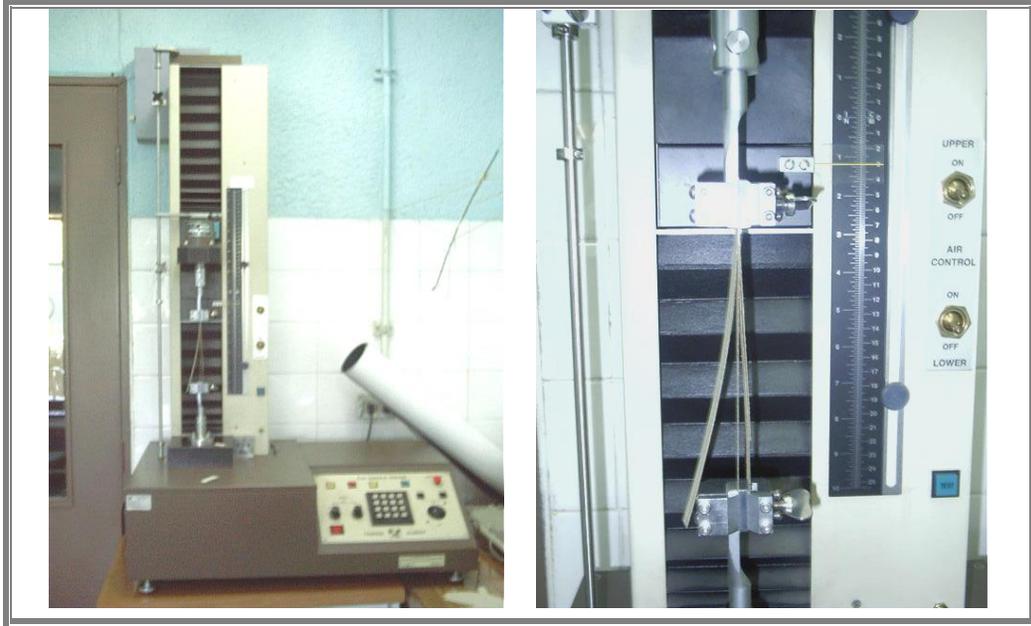


Figura 19. Medidor de resistencia a la tensión.

Se tomaron las hojas previamente ambientadas y de cada una se cortaron 5 cintas de 15 mm de ancho por 150 mm de largo. Se colocaron las probetas en la mordaza superior del equipo y se ubicó cada probeta en forma individual en la mordaza inferior. Finalmente se midió y registró el valor obtenido en el ensayo.

Con el valor obtenido, se aplicó la fórmula que se muestra a continuación para obtener el valor de largo de ruptura en metros.

$$LR (m) = \frac{RR \times 10^6}{G \times 15}$$

donde RR = Resistencia en kg (valor entregado por el equipo)
G = Gramaje en g/m²

3.2.3.4. Medición de la blancura.

La metodología de referencia utilizada para la medición de la blancura fue la norma ISO 3688. En la figura 20 se puede ver el equipo empleado para medir la blancura ISO.



Figura 20. Medidor de blancura Technibrite.

Se tomaron las hojas ambientadas en el laboratorio de propiedades físico-mecánicas. Las probetas se cogieron en grupos de a tres y se ubicaron en el equipo, midiéndose y registrándose los valores arrojados por este. El valor de la blancura de cada hoja fluctúa entre 0 y 100% ISO.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos en el estudio, el cual cuenta con tres etapas fundamentales:

En la primera fase se procedió a medir la actividad enzimática de la solución facilitada por NOVOZYMES (Dinamarca), lo que se realizó según lo descrito en el apartado 3.2.1 de la metodología.

En la segunda etapa, se procedió a aplicar la enzima del tipo lacasa a la pasta. Esta etapa es fundamental para el estudio y en ella se operó según lo descrito en el apartado 3.2.2 de la metodología.

Finalmente, en la última etapa, se procedió a la evaluación del efecto del tratamiento enzimático sobre la pasta, según lo indicado en el apartado 3.2.3 de la metodología.

Para evaluar el efecto sobre las propiedades de la pasta Kraft de *Eucaliptus globulus* expuesta a la acción de una enzima comercial del tipo lacasa, se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA), con un nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0,95$; $p \leq 0,05$)

En cuanto al análisis de los resultados obtenidos, se debe señalar que la variable respuesta más relevante es el número Kappa final (después del tratamiento), debido a que la importancia de la investigación radica en determinar la incidencia de la acción enzimática sobre la deslignificación de la pasta y, por ende, sobre el número Kappa. Las otras variables respuesta, blancura y largo de ruptura, son complementarias para el estudio y la evaluación de estas propiedades pretende detectar si los tratamientos enzimáticos afectan de algún modo el papel formado con la pasta tratada. Como es sabido la pasta kraft es usada en la fabricación de papel, para el cual son importantes las propiedades físico-mecánicas y ópticas.

4.1. Número Kappa

4.1.1. Efecto de la dosis de enzima.

En términos generales, en las pastas tratadas se obtuvo disminuciones del número Kappa en el rango de 7,76% a 13,65% para la dosis 0 nkat/g, de 8,12% a 18,29% para las pastas tratadas con dosis 400 nkat/g, mientras que para las pasta a las cuales se le aplicó una dosis de 800 nkat/g los valores fluctuaron entre 11,06% y 25%.

Al iniciar el análisis de disminución en el número Kappa y tocar el punto de la deslignificación producida por la dosis 0, se debe destacar que tales tratamientos se utilizan, en estricto rigor, sólo en términos de experimentación científica. De esta forma, los tratamientos con dosis 0 nkat/g se incluyen para poder diferenciar claramente el efecto de la enzima, pues es sabido que la extracción alcalina produce siempre algún grado de deslignificación.

En el cuadro 4 se presentan los valores medios de deslignificación, medida como número Kappa después del tratamiento, según la dosis de enzima aplicada.

Dosis (nkat/g)	Nº Kappa planta	Promedio Nº Kappa final	Desviación Estándar	% Deslignificación
0	17	15,22	0,33	10,47
400	17	14,93	0,40	12,18
800	17	14,19	0,53	16,53

Cuadro 4. Nº Kappa final y porcentaje de deslignificación, según dosis de enzima lacasa aplicada.

Es relevante comparar los resultados obtenidos en los tratamientos con dosis 0 nkat/g. En todos los casos se registró una disminución del número Kappa respecto a la pasta control. La caída del número Kappa en el tratamiento de dosis 0 se explica por la extracción alcalina (NaOH 1%), que lava la pasta y extrae parte de la lignina residual contenida en ella. Tal tratamiento será considerado como base para obtener el porcentaje de caída en el kappa por efecto de la acción enzimática.

De acuerdo a la figura 21, se pueden observar diferencias entre los valores medios de los números kappa finales de cada uno de los tratamientos, según la dosis de enzima aplicada. Al comparar dichos valores con el valor de planta y, a su vez, entre los diferentes tratamientos, la mayor caída del número kappa se registra, como se esperaba, con la dosis de enzima más alta (800 nkat/g).

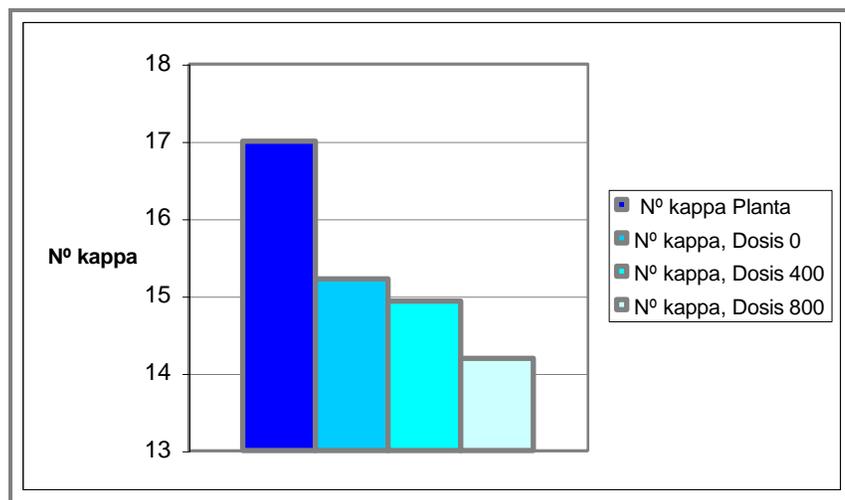


Figura 21. Nº kappa final promedio, según dosis de enzima utilizada.

Para las dosis 400 y 800 nkat/g se aprecia una mayor caída en el número Kappa que el obtenido con la dosis 0. Esto se debe a la presencia de la enzima en el tratamiento, la cual afecta la lignina residual de la pasta kraft, obteniéndose una reducción adicional en el número kappa por efecto de la enzima de 1,71 % en los tratamientos con dosis 400 nkat/g y de 6,06% en los tratamientos con dosis 800 nkat/g.

Al comparar las pastas con tratamiento enzimático contra la pasta testigo (pasta planta) se observan caídas en el número kappa promedio de 12,18 % en el caso de tratamientos con dosis 400 nkat/g, y de 16,53 % en los tratamientos con dosis 800 nkat/g.

Al restar al porcentaje de deslignificación obtenido con las dosis 400 y 800 nkat/g el porcentaje de deslignificación obtenido con la dosis 0 nkat/g, se aprecia que la diferencia obtenida con la dosis 800 nkat/g es 3,5 veces mayor que la diferencia obtenida con la dosis 400 nkat/g. Al comparar estas diferencias, se observa que al aumentar la dosis al doble, el aumento de la deslignificación de la pasta no es directamente proporcional. Este hecho se exhibe en la figura 22, en la cual se proyecta una curva exponencial, con pendiente pronunciada, para la dosis de enzima.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico ANDEVA (ver cuadro 22 del anexo) muestran que el número kappa final de la pasta se ve afectado por las dosis de enzima aplicadas en los diferentes tratamientos, existiendo diferencias significativas a un nivel de confianza de 95% entre los valores medios de disminución de los números kappa obtenidos para las dosis 0, 400 y 800 nkat/g de pasta.

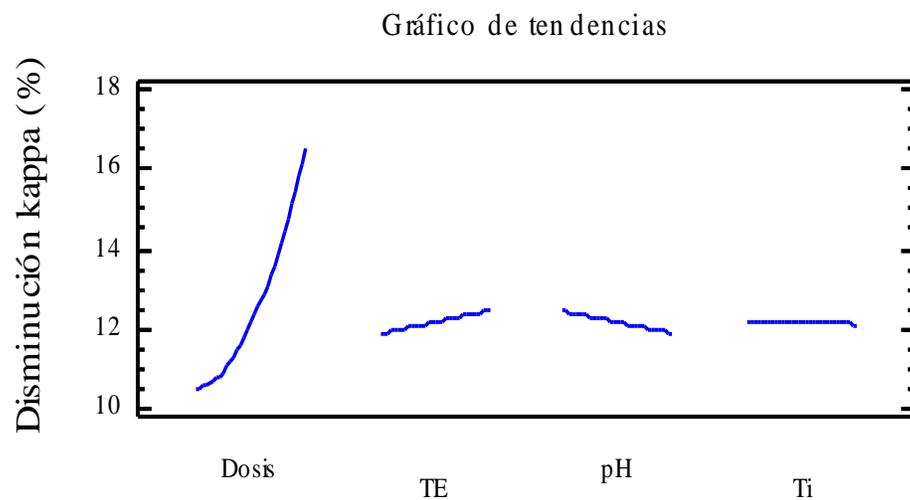


Figura 22. Tendencia de las variables de entrada.

Además, la figura 22 nos indica que de todos los factores o variables de tratamiento considerados en el estudio la de mayor incidencia sobre el grado de deslignificación alcanzado es la dosis de enzima aplicada, dado que presenta la mayor pendiente.

4.1.2. Efecto de la temperatura.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico ANDEVA (ver cuadro 22 del anexo) muestran que el número Kappa final de la pasta no se ve afectado por la temperatura de tratamiento, no existiendo diferencias significativas a un nivel de confianza de 95% entre los valores medios de disminución del número Kappa obtenidos a temperatura 50 °C y temperatura 70 °C.

Los valores medios finales de reducción del número Kappa para esta variable se presentan a continuación en el cuadro 5.

Temperatura (°C)	Nº Kappa planta	Promedio Nº Kappa final	Desviación Estándar	% Deslignificación
50	17	14,83	0,55	12,76
70	17	14,73	0,47	13,35

Cuadro 5. Comparación de medias de los números Kappa, según temperatura.

Al realizar un análisis comparativo entre los valores medios finales de ambas temperaturas (50 y 70 °C) se observa una reducción, en relación al número Kappa testigo (Nº Kappa planta), de un 12,76% para los tratamientos a 50 °C y de un 13,35% para los tratamientos a 70 °C. Luego no se aprecia una diferencia considerable entre los números Kappa finales asociado a ambas temperaturas, por lo que se puede inferir que la temperatura de tratamiento no es una variable significativa sobre la disminución del número Kappa final de la pasta. Aún así, el mayor porcentaje de deslignificación asociado a la temperatura 70° C indica que la acción enzimática se ve favorecida con una temperatura mayor, no produciéndose inactivación o desnaturalización de la enzima lacasa a esta temperatura.

Los valores medios finales de reducción del número Kappa, que se presentan en el cuadro 5, se ven corroborados con el gráfico de tendencias de las variables de entrada (Figura 22), en el cual se observa que la curva correspondiente a la variable temperatura tiene una pendiente positiva levemente inclinada.

En la Figura 23 se comparan los valores finales de las medias de los números Kappa, según la temperatura de tratamiento.

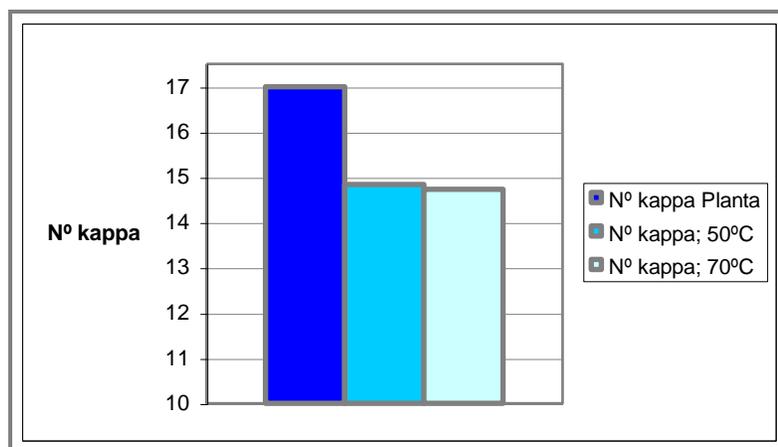


Figura 23. Número Kappa final promedio, según temperatura de tratamiento.

Los valores de temperatura considerados en el estudio se encuentran dentro del rango de operación definido por el productor de la enzima, por lo que es posible que los valores escogidos dentro de este intervalo (50°C y 70°C) no sean suficientemente diferentes como para provocar un efecto diferenciado de deslignificación sobre la pasta estadísticamente significativo.

4.1.3. Efecto del pH.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico ANDEVA (ver cuadro 22 del anexo) muestran que el número Kappa final de la pasta no se ve afectado por el pH de tratamiento, no existiendo diferencias significativas a un nivel de confianza de 95% entre los valores medios de disminución del número Kappa obtenidos a pH 5 y pH 7.

Los valores medios finales de reducción del número Kappa para esta variable se presentan a continuación en el cuadro 6.

pH	Nº Kappa planta	Promedio Nº Kappa final	Desviación Estándar	% Deslignificación
5	17	14,74	0,41	13,3
7	17	14,83	0,60	12,8

Cuadro 6. Número Kappa final promedio, según pH de tratamiento.

Al realizar un análisis comparativo entre los valores medios finales de ambos pH (5 y 7) se obtiene una reducción del número Kappa, en relación al número Kappa testigo (Nº Kappa planta), de un 13,3% para los tratamientos a pH 5 y de un 12,8% para los tratamientos a pH 7. Luego no se aprecia una diferencia considerable entre las medias de los números Kappa final asociados a ambos pH, por lo que se puede inferir que el pH de tratamiento no es una variable significativa sobre la disminución del número Kappa final de la pasta.

La pequeña diferencia en el porcentaje de deslignificación favorable a pH 5 nos indica que el ataque enzimático a la lignina se ve favorecido a pH levemente ácido, en relación al efecto del sistema a pH neutro.

Los valores medios finales de reducción del número Kappa, que se presentan en el cuadro 6, se ven corroborados con el gráfico de tendencias de las variables de entrada (figura 22), en el cual se observa que la curva correspondiente a la variable pH tiene una pendiente negativa levemente inclinada.

Los resultados de reducción del número Kappa obtenidos para la variable pH, se presentan en la figura 24.

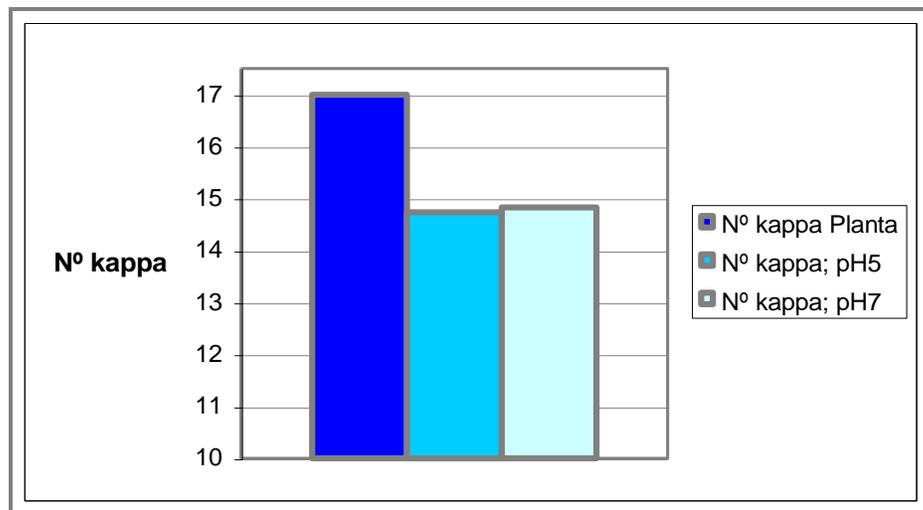


Figura 24. Número Kappa final promedio, según pH de tratamiento.

Al igual que en el caso de la temperatura, los valores de pH considerados en el estudio se encuentran dentro del rango de operación definido por el productor de la enzima, por lo que es posible que los valores escogidos dentro de este intervalo (pH 5 y pH 7) no sean suficientemente diferentes como para provocar un efecto diferenciado de deslignificación estadísticamente significativo.

4.1.4. Efecto del tiempo de tratamiento.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico ANDEVA (ver cuadro 22 del anexo) muestran que el número Kappa final de la pasta no se ve afectado por el tiempo de tratamiento, no existiendo diferencias significativas a un nivel de confianza de 95% entre los valores medios de disminución del número Kappa obtenidos a tiempo 2 y 6 horas.

Los valores medios finales de reducción del número Kappa para esta variable se presentan a continuación en el cuadro 7.

Tiempo (h)	Nº Kappa planta	Promedio Nº Kappa final	Desviación Estándar	% Deslignificación
2	17	14,77	0,52	13,12
6	17	14,79	0,50	13,00

Cuadro 7. Número Kappa final promedio, según tiempo de tratamiento.

Al realizar un análisis comparativo entre los valores medios finales de ambos tiempos de tratamientos (2 y 6 horas) se obtiene una reducción, en relación al número Kappa testigo (Nº Kappa planta), de un 13,12% para los tratamientos a tiempo 2 horas y de un 13,00% para los tratamientos a 6 horas. Luego no se aprecia una diferencia considerable entre las medias de los números kappa final asociados a ambos tiempos, por lo que se puede inferir que el tiempo de tratamiento no es una variable significativa sobre la disminución del número Kappa final de la pasta.

La mínima diferencia establecida en el porcentaje de deslignificación favorable a tiempo de tratamiento 2 horas nos indica que el ataque enzimático a la lignina se ve levemente favorecido a tiempos de tratamiento cortos, lo que beneficia la aplicación de este método de blanqueo a la industria de celulosa.

Los valores medios finales de reducción del número Kappa, que se presentan en el cuadro 7, se ven corroborados con el gráfico de tendencias de las variables de entrada (figura 22), en el cual se observa que la curva correspondiente a la variable tiempo registra una pendiente negativa ligeramente apreciable.

Los resultados de reducción del número Kappa obtenidos para la variable tiempo, se presentan en la figura 25.

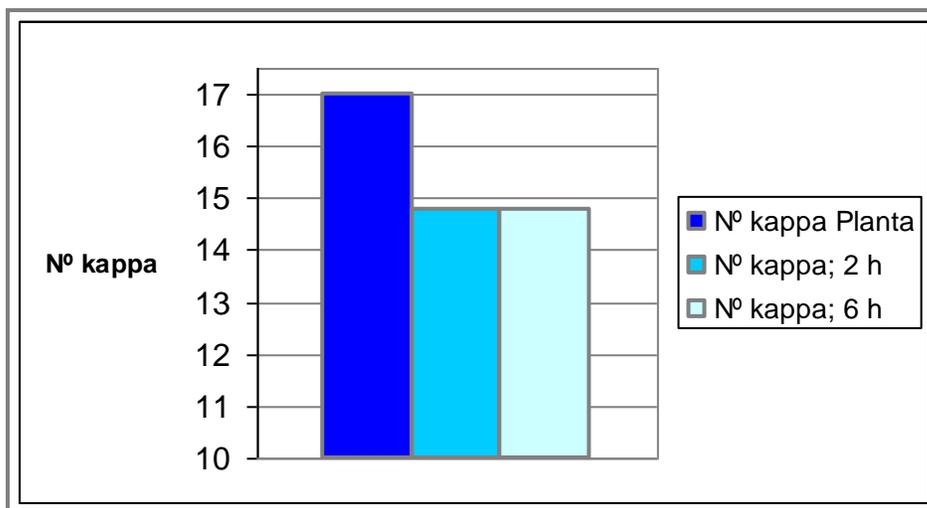


Figura 25. Número Kappa final promedio, según tiempo de tratamiento.

Como se desprende del análisis estadístico, la variable tiempo no aparece como estadísticamente significativa sobre la disminución del número Kappa. Esto quiere decir que los tiempos de tratamiento empleados no producen efectos de deslignificación significativamente distintos; sin embargo, no es posible desarrollar tratamientos enzimáticos de mayor duración puesto que la alternativa del blanqueo enzimático debe restringirse, por razones de producción, a los tiempos de blanqueo en procesos convencionales, los que no superan en general las 8 horas. Además, se debe considerar que los efectos de la deslignificación enzimática, hasta donde se ha estudiado, no permiten pensar aún en un reemplazo total del blanqueo convencional, debiéndose combinar probablemente etapas enzimáticas y etapas con reactivos inorgánicos, por lo que la duración de la primera de ellas no puede ser muy extensa.

Los resultados obtenidos en este estudio son concordantes con los obtenidos por Silva S. (2002) quien trató pasta Kraft de *Eucaliptus globulus* con dosis incrementales de enzima del tipo lacasa en tiempos de tratamientos de 1 y 3 horas. En los tratamientos donde utilizó pasta de número kappa inicial 18, similar al nuestro, este autor obtuvo disminuciones de entre 5,9% y 21,9% en el número kappa de la pasta tratada, valores que son similares a los obtenidos en nuestro estudio.

Realizando una comparación con los resultados obtenidos por Balakshin y colaboradores (2000), estos son concordantes con nuestros resultados en relación al incremento en la deslignificación al aumentar la dosis de enzima. Estos autores deslignificaron pasta Kraft de Pino radiata con crudos de lacasa y lacasa purificada de *Coriolus versicolor*, empleando HBT como mediador. Los tratamientos fueron realizados a pH 4,5 y una temperatura de 40°C, por un lapso de 24 horas, obteniéndose disminuciones en el número kappa de entre un 36% y un 41%.

Resultados similares, fueron obtenidos por Call y Mücke (1997) en relación al efecto de la dosis de enzima, detectándose incrementos en la deslignificación cuando se aumentó la dosis de enzima lacasa empleada.

Por otra parte Bourbonais y Paice (1996) no encontraron diferencias en la tasa de deslignificación al incrementar la carga de lacasa, siendo el único de los trabajos consultados en el cual no existe un efecto apreciable de mayor deslignificación frente al aumento en la dosis de enzima.

Sin embargo, otros trabajos corroboran los resultados obtenidos en nuestro estudio. Es así como Wong y Colaboradores (1999) deslignificaron, por un tiempo de 5 horas, pasta Kraft de Pino radiata, tratamientos que se realizaron a pH 4,5 y 50°C de temperatura. Obtuvieron reducciones en el número kappa de 17% con la dosis menor y de un 19% con la dosis mayor.

Así también, Messner y Colaboradores (2000) obtuvieron resultados comparables con los nuestros. Ellos trataron pasta Kraft de Pino radiata, de kappa inicial 7, empleando lacasa en dosis incrementales en presencia de HBT como mediador, y obtuvieron los siguientes porcentajes de reducción del número kappa: 8,6% para una dosis 5 nkat/g, 18,6% para una dosis 25 nkat/g y 18,6% para una dosis 50 nkat/g.

En cuanto a la aplicación de un mediador como complemento para el agente deslignificador enzimático, este trabajo adquiere una mayor relevancia, debido a que se aplicó una enzima ligninolítica del tipo lacasa en ausencia de un mediador, los que según la bibliografía potencian la acción catalítica de las enzimas, y por ende, el efecto de deslignificación de éstas.

En cuanto a los resultados obtenidos en esta memoria, al analizar la variable respuesta más relevante para este estudio, disminución del número kappa, se aprecia que, de acuerdo al cuadro 4, al incrementar la dosis de enzima al doble se produce un incremento en los porcentajes de deslignificación de la pasta tratada, no siendo este proporcional al aumento en la dosis aplicada.

4.1.5. Análisis de Pareto para el número Kappa.

Del análisis estadístico se desprende que la variable más importante entre las consideradas para obtener reducción en el número Kappa final de la pasta es la dosis de enzima, debido a que en el Diagrama de Pareto, que se presenta a continuación (figura 26), es la única variable significativa a un nivel de confianza de 95%.

Como variable independiente, la segunda de mayor importancia es la temperatura, a pesar de que no está dentro del 95% de confianza elegido para el análisis de varianza. En el Diagrama de Pareto las variables de entrada (y sus interacciones dobles) están representadas por la siguiente nomenclatura:

A: Dosis de Enzima

B: Temperatura

C: pH

D: Tiempo de Tratamiento.

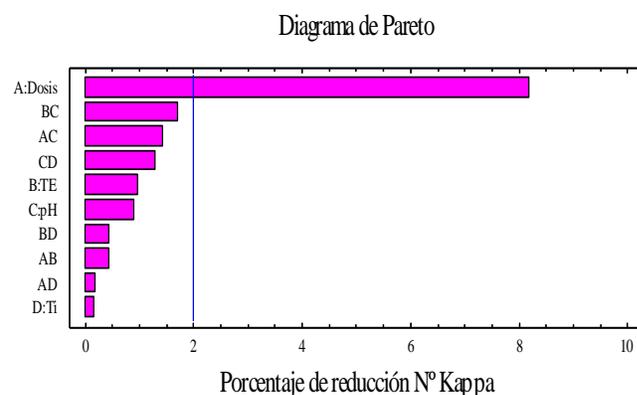


Figura 26. Diagrama de Pareto para la variable respuesta “Porcentaje de reducción del número Kappa”.

Dado que la variable más importante para obtener una reducción en el número Kappa es la dosis de enzima, se podría pensar que la interacción de ésta con cualquiera de las otras variables podría ser también estadísticamente significativa. Sin embargo, como se observa en el diagrama de la figura 26, al realizar el análisis estadístico, la primera interacción (temperatura de tratamiento y pH) no incluye a la variable dosis y, a pesar de que en los diferentes tratamientos se obtuvieron interacciones entre las diferentes variables de entrada, éstas no son estadísticamente significativas para la variable respuesta reducción del número Kappa.

4.2. Blancura.

4.2.1. Efecto de la dosis.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico ANDEVA (ver cuadro 23 del anexo) muestran que la blancura ISO final de la pasta se ve afectada por la dosis de enzima, existiendo diferencias significativas a un nivel de confianza de 95% entre los valores medios de incremento de la blancura ISO obtenidos para las dosis 0, 400 y 800 nkat/g.

Los valores medios finales de incremento en la blancura ISO para esta variable se presentan a continuación en el cuadro 8.

Dosis (nkat/g)	Blancura ISO testigo (%)	Promedio final Blancura ISO (%)	Desviación Estándar	Incremento Blancura %
0	35,00	40,05	0,75	14,43
400	35,00	40,13	0,86	14,66
800	35,00	39,18	0,78	11,94

Cuadro 8. Blancura ISO final promedio, según dosis de enzima aplicada.

Al realizar un análisis comparativo entre los valores medios finales de las dosis (0, 400 y 800 nkat/g) se observa un aumento, en relación a la blancura ISO testigo (35%), de un 14,43% para la dosis 0 nkat/g, de un 14,66% para la dosis 400 nkat/g y de un 11,94% para la dosis 800 nkat/g. Luego se aprecia una pequeña diferencia entre las blancuras ISO finales obtenidas según la dosis de enzima aplicada, las cuales son considerables para esta variable, por lo que se puede inferir que la dosis de enzima de tratamiento es una variable significativa sobre el aumento de la blancura ISO final de la pasta.

Entre los diferentes tratamientos los resultados tienen variaciones significativas desde el punto de vista estadístico y los valores obtenidos fluctúan alrededor de una blancura de 40% ISO, presentando un incremento de cinco puntos porcentuales con respecto a la blancura testigo (35% ISO). Además del efecto positivo sobre la blancura provocado por los tratamientos enzimáticos, el incremento en la blancura producido por la dosis 0 nkat/g puede ser explicado por la solubilización, en el tampón utilizado para ajustar la consistencia, de parte de la lignina adsorbida a las paredes de las fibras, lignina que está presente por un lavado incompleto de la pasta.

Las blancuras obtenidas para las diferentes dosis no tienen aparentemente directa relación con el porcentaje de deslignificación de la pasta presentado en el cuadro 4. Por ejemplo, la mayor blancura se registra para la dosis 400 nkat/g y la menor blancura para la dosis 800 nkat/g, que es la que presenta mayor porcentaje de deslignificación de la pasta.

La dosis 800 nkat/g es la que presenta menor blancura, lo que puede deberse al efecto de la interacción entre el pH y el tiempo de tratamiento, ya que según se desprende del cuadro 25 del anexo, se puede apreciar que la interacción entre el pH y el tiempo presentan la misma tendencia, como se indica en el cuadro 8. Todo esto se avala con la importancia que presenta, según el análisis de pareto, la variable tiempo de tratamiento.

A continuación, en la figura 27, se exhiben los valores de las medias finales de la pasta tratada para la variable respuesta blancura.

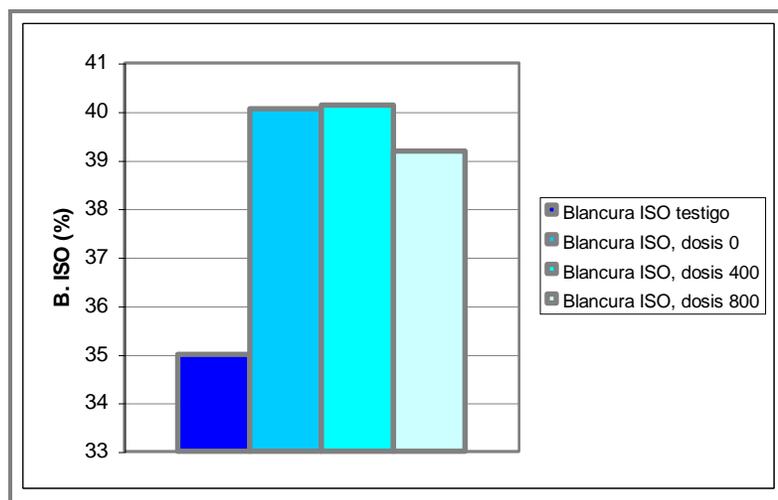


Figura 27. Blancura ISO final promedio, según dosis de enzima aplicada.

4.2.2. Efecto de la temperatura.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico ANDEVA (ver cuadro 23 del anexo) muestran que la blancura ISO final de la pasta no se ve afectada por la temperatura de tratamiento, no existiendo diferencias significativas a un nivel de confianza de 95% entre los valores medios de incremento de la blancura ISO obtenidos a temperatura 50 °C y temperatura 70 °C.

Los valores medios finales de incremento de la blancura ISO para esta variable se presentan a continuación en el cuadro 9.

Temperatura °C	Blancura ISO testigo (%)	Promedio final Blancura ISO (%)	Desviación Estándar	Incremento Blancura %
50	35,00	39,64	0,85	13,26
70	35,00	39,93	0,51	14,09

Cuadro 9. Blancura ISO final promedio, para la variable temperatura.

Al realizar un análisis comparativo entre los valores medios finales de blancura para ambas temperaturas (50 y 70 °C) se observa un aumento, en relación a la blancura ISO testigo (35%), de un 13,26% para los tratamientos a 50 °C y de un 14,09% para los tratamientos a 70 °C. Luego no se aprecia una diferencia considerable entre las blancuras ISO finales asociadas a ambas temperaturas de tratamiento, por lo que se puede inferir que la temperatura de tratamiento no es una variable significativa sobre el incremento de la blancura ISO final de la pasta.

Aún así, el mayor grado de blancura asociado a la temperatura 70° C se relaciona con el aumento de la deslignificación obtenidos a esta temperatura, como se aprecia en el cuadro 5, por lo tanto se puede decir que, en términos generales, a mayor deslignificación hay mayor blancura.

En la figura 28 se comparan los valores finales de las medias de las blancuras ISO, según la temperatura de tratamiento.

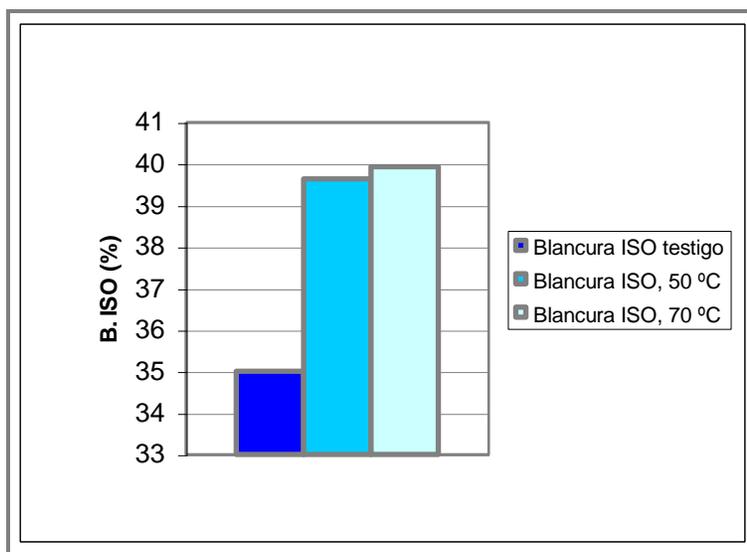


Figura 28. Blancura ISO final promedio, según temperatura de tratamiento.

Como se mencionó en el caso del efecto de la temperatura sobre el grado de deslignificación alcanzado, los valores de temperatura considerados en el estudio se encuentran dentro del rango de operación definido por el productor de la enzima, por lo que es posible que los valores escogidos dentro de este intervalo (50°C y 70°C) no sean suficientemente diferentes como para provocar un efecto diferenciado en el incremento de la blancura ISO final de la pasta estadísticamente significativo.

4.2.3. Efecto del pH.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico ANDEVA (ver cuadro 23 del anexo) muestran que la blancura ISO final de la pasta no se ve afectada por el pH de tratamiento, no existiendo diferencias significativas a un nivel de confianza de 95% entre los valores medios finales de blancura ISO obtenidos a pH 5 y 7.

Los valores medios finales de blancura ISO para esta variable se presentan a continuación en el cuadro 10.

PH	Blancura ISO testigo (%)	Promedio final Blancura ISO (%)	Desviación Estándar	Incremento Blancura %
5	35,00	39,86	0,77	13,89
7	35,00	39,71	0,64	13,46

Cuadro 10. Blancura ISO final promedio, para la variable pH.

Al realizar un análisis comparativo entre los valores medios finales para ambos pH (5 y 7) se observa un incremento de la blancura ISO, en relación a la blancura ISO testigo (35%), de un 13,89% para los tratamientos a pH 5 y de un 13,46% para los tratamientos a pH 7, luego no se aprecia una diferencia considerable entre las medias de las blancuras ISO finales asociadas a ambos pH, por lo que se puede inferir que el pH de tratamiento no es una variable significativa sobre el aumento de blancura ISO final de la pasta.

La pequeña diferencia en el grado de blancura obtenido favorable a pH 5 con respecto pH 7 está asociada al mayor porcentaje de deslignificación obtenido a pH 5, tal como se indica en el cuadro 6.

Los resultados de incremento de la blancura ISO obtenidos para la variable pH, se presentan en la figura 29.

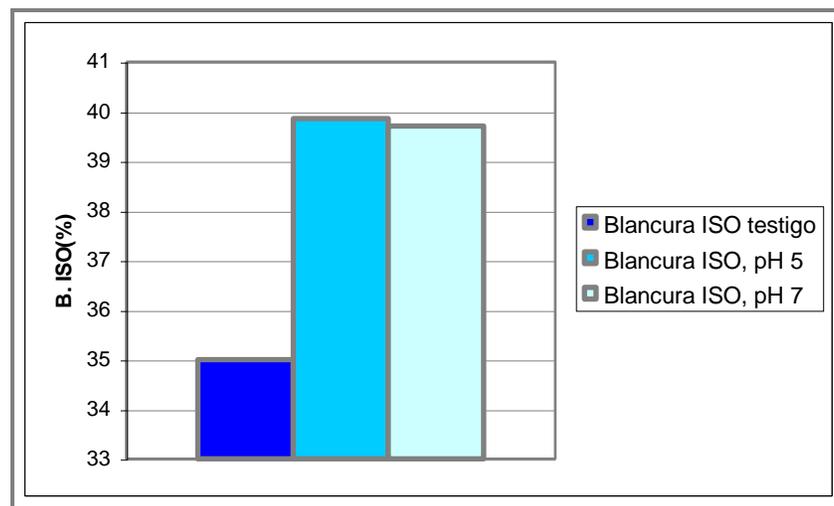


Figura 29. Blancura ISO final promedio, según pH de tratamiento.

Como queda evidenciado, los valores considerados para las variables de entrada pH y temperatura no presentan diferencias estadísticamente significativas sobre la variable respuesta blancura (ni tampoco sobre la disminución en el número kappa) de la pasta. Resulta evidente entonces, que los rangos de trabajo para el pH y la temperatura permiten establecer condiciones óptimas de operación para la actividad enzimática de deslignificación, no existiendo un efecto por separado de estas variables, al menos en el rango de valores en que han sido empleadas.

4.2.4. Efecto del tiempo de tratamiento.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico ANDEVA (ver cuadro 23 del anexo) muestran que la blancura ISO final de la pasta se ve afectada por el tiempo de tratamiento, existiendo diferencias significativas a un nivel de confianza de 95% entre los valores medios de incremento de la blancura ISO obtenidos a tiempo 2 y 6 horas.

Los valores medios finales de aumento de la blancura ISO para esta variable se presentan a continuación en el cuadro 11.

Tiempo (h)	Blancura ISO testigo (%)	Promedio final Blancura ISO (%)	Desviación Estándar	Incremento Blancura %
2	35,00	39,99	0,46	14,26
6	35,00	39,58	0,85	13,09

Cuadro 11. Blancura ISO final promedio, para la variable tiempo de tratamiento.

Al realizar un análisis comparativo entre los valores medios finales para ambos tiempos de tratamientos (2 y 6 horas) se obtiene un incremento significativo desde el punto de vista estadístico para la variable respuesta blancura ISO, en relación a la blancura ISO testigo (35%), siendo este de un 14,26% para los tratamientos a tiempo 2 horas y de un 13,09% para los tratamientos a 6 horas. Luego se aprecia una diferencia considerable para esta variable respuesta, entre las blancuras ISO finales de ambos tiempos de tratamiento, por lo que se puede inferir que el tiempo de tratamiento es una variable significativa sobre el aumento de la blancura ISO final de la pasta.

El mayor grado de blancura está asociado al tiempo de tratamiento de 2 horas, siendo esta levemente superior a la obtenida con los tratamientos de 6 horas, lo que se puede relacionar con la mayor deslignificación producida a tiempo 2 horas de tratamiento indicada en el cuadro 7.

Los resultados de incremento de la blancura ISO obtenidos para la variable tiempo, se presentan en la figura 30.

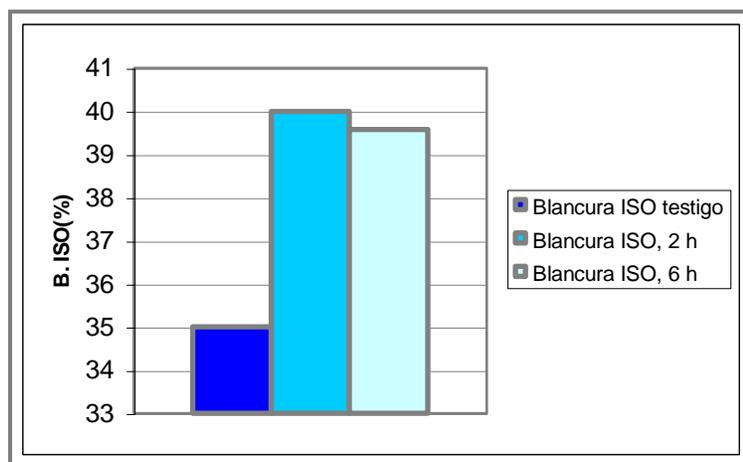


Figura 30. Blancura ISO final promedio, según tiempo de tratamiento.

Como se desprende de los resultados entregados previamente para esta propiedad, los valores obtenidos en las pastas con tratamiento enzimático son mejores que los de las pastas control.

Los resultados obtenidos en este estudio son concordantes con los reportados por Silva (2002) en cuanto al aumento de la blancura en las pastas tratadas con enzima lacasa. Sin embargo, la medición de la blancura en el trabajo citado se realizó post blanqueo con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), donde el valor más alto de blancura fue de un 69,5% ISO, valor que representa un incremento respecto a la pasta control de un 2,7%. El menor valor para esta propiedad fue de 67,4% ISO, que es además, el mayor incremento respecto a su pasta control, con un 34,8%.

En nuestro estudio, la mayor blancura obtenida fue de 40,63% ISO, valor que representa un incremento con respecto a la pasta control de un 16,09%. Es importante señalar que la medición de esta propiedad en nuestro estudio se realizó sin blanquear la pasta con peróxido de hidrógeno, es decir, solo con el tratamiento enzimático. Probablemente el porcentaje de incremento de la blancura puede ser mayor aun si se realiza un tratamiento de blanqueo con peróxido de hidrógeno, tanto a las pastas tratadas como a las pastas control.

4.2.5. Análisis de Pareto para la blancura ISO.

Del análisis estadístico se desprende que las variables más importantes entre las consideradas para obtener incremento en la blancura ISO final son, en orden de significancia estadística, la dosis de enzima, la interacción entre las variables dosis y temperatura y, finalmente, la variable tiempo de tratamiento.

En el Diagrama de Pareto, que se presenta a continuación (figura 31), se aprecia que las variables señaladas son significativas, debido a que se encuentran dentro del 95% de confianza elegido para el análisis de varianza.

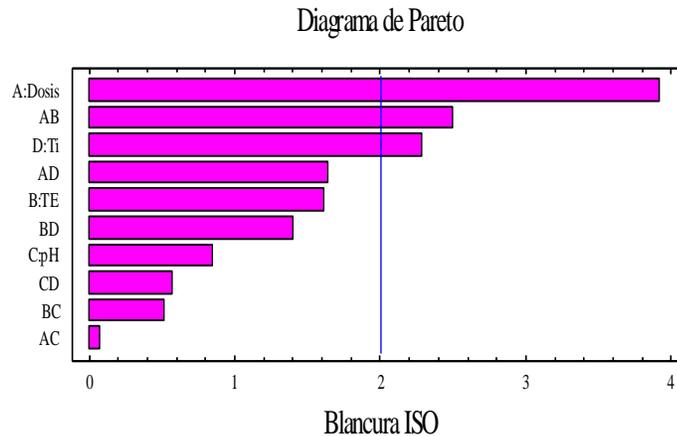


Figura 31. Diagrama de Pareto, para la variable blancura.

De todas las interacciones dobles obtenidas al combinar las variables de entrada, la única que resulta estadísticamente significativa es la dosis de enzima con la temperatura (AB). La relevancia de esta interacción puede deberse a la gran importancia que tiene la dosis de enzima sobre la variable respuesta blancura, cuyo efecto positivo se ve incrementado cuando se eleva la temperatura de tratamiento desde 50 a 70° C (cuadro 9), aún sin ser esta última variable estadísticamente significativa. En cuanto a las demás interacciones estas no son estadísticamente significativas, aunque la más importante de entre ellas es la combinación de las dos variables independientes más significativas, es decir dosis de enzima con tiempo de tratamiento (AD).

4.3. Largo de ruptura.

4.3.1. Efecto de la dosis.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico ANDEVA (ver cuadro 24 del anexo) muestran que el largo de ruptura final de la pasta no se ve afectado por la dosis de enzima, no existiendo diferencias significativas a un nivel de confianza de 95% entre los valores medios de incremento del largo de ruptura obtenidos a dosis 0, 400 y 800 nkat/g.

Los valores medios finales de incremento del largo de ruptura para esta variable se presentan a continuación en el cuadro 12.

Dosis (nkat/g)	Largo ruptura testigo (m)	Promedio final Largo de ruptura (m)	Desviación Estándar	Incremento largo ruptura %
0	2000,00	2222,77	239,60	11,14
400	2000,00	2220,11	281,03	11,00
800	2000,00	2198,45	164,04	9,92

Cuadro 12. Largo de ruptura final promedio, según dosis de enzima aplicada.

Al realizar un análisis comparativo entre los valores medios finales de largo de ruptura se observa un aumento, en relación al largo de ruptura testigo (2000 m), de 11,14% para la dosis 0 nkat/g, de 11,00% para la dosis 400 nkat/g y de 9,92% para la dosis 800 nkat/g. Luego no se aprecia una diferencia considerable entre los largos de ruptura finales obtenidos para las diferentes dosis de enzima, por lo que se puede inferir que la dosis de enzima de los tratamientos no es una variable estadísticamente significativa sobre el aumento del largo de ruptura final de la pasta.

Entre los diferentes tratamientos los resultados son uniformes y fluctúan en torno a un largo de ruptura de 2200 metros, presentando un aumento con respecto al largo de ruptura testigo (2000 m).

Los largos de ruptura asociados a las distintas dosis de enzima presentan un aumento con respecto al testigo, como se dijo anteriormente, lo que se debe a la deslignificación que se produce en la pasta por efecto de los tratamientos, obteniéndose pastas más resistentes mecánicamente. En cuanto a los valores de largo de ruptura obtenidos para las diferentes dosis, se aprecia que al aumentar la dosis de enzima (desde 0 a 800 nkat/g) aumentó también la deslignificación (como se indica en el cuadro 4) aunque el largo de ruptura decrece levemente. Esta aparente inconsistencia puede ser explicada por la formación de las hojas, proceso que incide fuertemente sobre las propiedades mecánicas, y en donde pudieron producirse alteraciones que afectaron la relación mayor deslignificación – mayor largo de ruptura. Aún así, los valores obtenidos son muy cercanos y no diferentes en términos estadísticos.

A continuación, en la figura 32, se exhiben los valores de las medias finales de la pasta tratada para la variable respuesta largo de ruptura en función de la dosis de enzima aplicada.

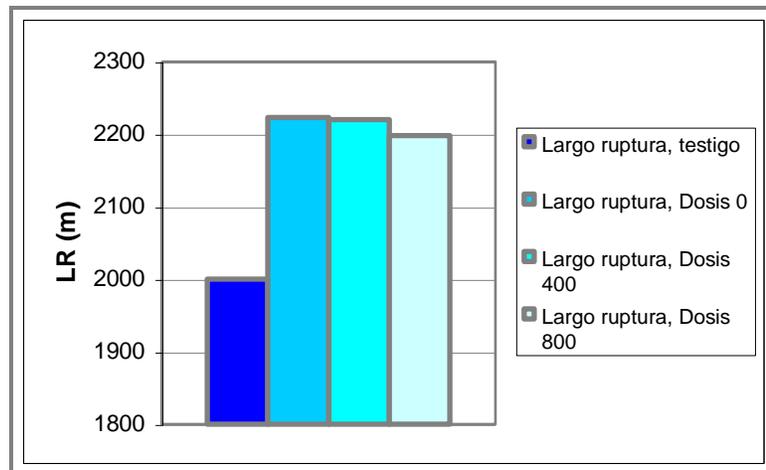


Figura 32. Largo de ruptura final promedio, según dosis de enzima aplicada.

4.3.2. Efecto de la temperatura.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico ANDEVA (ver cuadro 24 del anexo) muestran que el largo de ruptura final de la pasta se ve afectado por la temperatura de tratamiento, existiendo diferencias significativas a un nivel de confianza de 95% entre los valores medios finales de incremento en el largo de ruptura obtenidos a temperatura 50 y 70 °C.

Los valores medios finales de incremento del largo de ruptura de la pasta para esta variable se presentan a continuación en el cuadro 13.

Temperatura (°C)	Largo ruptura testigo (m)	Promedio final Largo de ruptura (m)	Desviación Estándar	Incremento largo ruptura %
50	2000,00	2160,64	164,77	8,03
70	2000,00	2266,92	241,15	13,34

Cuadro 13. Largo de ruptura final promedio, según la variable temperatura.

Al realizar un análisis comparativo entre los valores medios finales de largo de ruptura asociados a ambas temperaturas (50 y 70 °C) se observa un aumento, en relación al largo de ruptura testigo (2000 m), de un 8,03% para los tratamientos a 50 °C y de un 13,34% para los tratamientos a 70 °C. Luego se aprecia una diferencia entre los largos de ruptura final de la pasta tratada para ambas temperaturas, por lo que se puede inferir que la temperatura de tratamiento es una variable estadísticamente significativa sobre el incremento del largo de ruptura final de la pasta.

Para esta variable respuesta el mayor largo de ruptura está asociado a la temperatura 70° C indicando que el largo de ruptura se ve favorecido a mayor temperatura, lo que se relaciona con la mayor deslignificación obtenida con la temperatura más alta, y a que las pastas con menos lignina son más resistentes mecánicamente.

En la figura 33 se comparan los valores finales medios de la pasta para la variable respuesta largo de ruptura, según la temperatura de tratamiento.

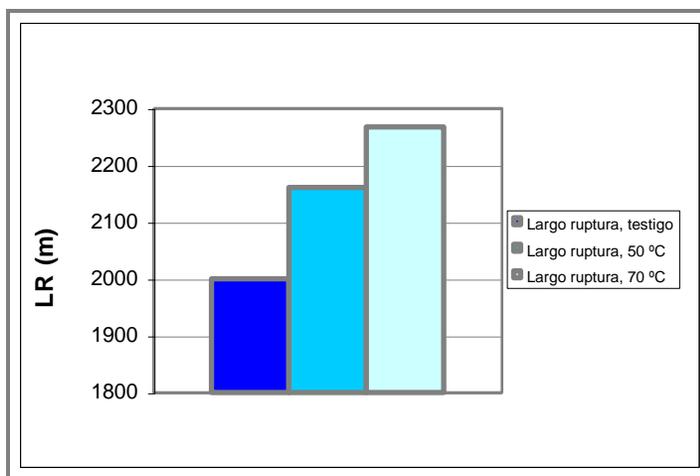


Figura 33. Largo de ruptura final promedio, según temperatura de tratamiento.

4.3.3. Efecto del pH.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico ANDEVA (ver cuadro 24 del anexo) muestran que el largo de ruptura final de la pasta se ve afectado por el pH de tratamiento, existiendo diferencias significativas a un nivel de confianza de 95% entre los valores medios finales de incremento del largo de ruptura para la pasta tratada obtenidos a pH 5 y pH 7.

Los valores medios finales de incremento del largo de ruptura de la pasta para esta variable respuesta se presentan a continuación en el cuadro 14.

pH	Largo ruptura testigo (m)	Promedio final Largo de ruptura (m)	Desviación Estándar	Incremento largo ruptura %
5	2000,00	2283,41	231,39	14,17
7	2000,00	2144,15	165,36	7,21

Cuadro 14. Largo de ruptura final promedio, según la variable pH.

Al realizar un análisis comparativo entre los valores medios finales de largo de ruptura asociado a ambos pH (5 y 7) se observa un incremento estadísticamente significativo, en relación al largo de ruptura testigo (2000 m), siendo de un 14,17% para los tratamientos a pH 5 y de un 7,21% para los tratamientos a pH 7. Luego se aprecia una diferencia considerable entre los largos de ruptura final a ambos pH, por lo que se puede inferir que el pH de tratamiento es una variable estadísticamente significativa sobre el incremento del largo de ruptura final de la pasta. Además, como indica el cuadro 6, el porcentaje de deslignificación obtenido a pH 5 (13,3%) es mayor que el obtenido a pH 7 (12,8%) por lo que es esperable que el largo de ruptura asociado a una pasta más deslignificada (pH 5) sea mayor (2283,41 m) que el asociado a una pasta menos deslignificada (pH 7; 2144,15 m).

En la figura 34 se comparan los valores finales de las medias de la pasta para la variable respuesta largo de ruptura, según el pH de tratamiento.

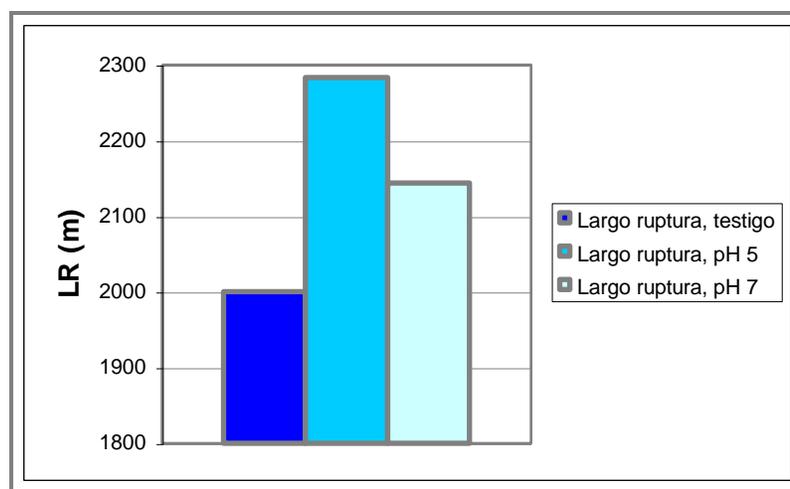


Figura 34. Largo de ruptura final promedio, según pH de tratamiento.

4.3.4. Efecto del tiempo de tratamiento.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico ANDEVA (ver cuadro 24 del anexo) muestran que el largo de ruptura final de la pasta no se ve afectado por el tiempo de tratamiento, no existiendo diferencias significativas a un nivel de confianza de 95% entre los valores medios finales de aumento del largo de ruptura obtenidos a tiempo 2 y 6 horas.

Los valores medios finales de incremento del largo de ruptura de la pasta para esta variable respuesta se presentan a continuación en el cuadro 15.

Tiempo (h)	Largo ruptura testigo (m)	Promedio final Largo de ruptura (m)	Desviación Estándar	Incremento largo ruptura %
2	2000,00	2201,54	166,36	10,08
6	2000,00	2226,02	251,92	11,30

Cuadro 15. Largo de ruptura final promedio, según la variable tiempo.

Al realizar un análisis comparativo entre los valores medios finales de largo de ruptura para ambos tiempos de tratamiento (2 y 6 horas) se observa un pequeño aumento, en relación al largo de ruptura testigo (2000 m), de un 10,08% para los tratamientos de 2 horas y de un 11,30% para los tratamientos de 6 horas. Sin embargo, no se aprecia una diferencia considerable entre los largos de ruptura finales de ambos tiempos de tratamiento, por lo que se puede inferir que el tiempo de tratamiento no es una variable estadísticamente significativa sobre el incremento del largo de ruptura final de la pasta.

En este caso las diferencias en el porcentaje de deslignificación para ambos tiempos son mínimas (13,12 % para 2 horas de tratamiento y 13,00 % para 6 horas de tratamiento, como se indica en el cuadro 7) y las diferencias en los porcentajes de incremento del largo de ruptura también lo son (10,08 % para 2 horas contra 11,3 % para 6 horas de tratamiento) por lo que tales diferencias pueden ser atribuibles a pequeñas variaciones en las características de las hojas formadas con la pasta sobre las que se midieron la blancura y el largo de ruptura.

En la figura 35 se comparan los valores finales de las medias de la pasta para la variable respuesta largo de ruptura, según tiempo de tratamiento.

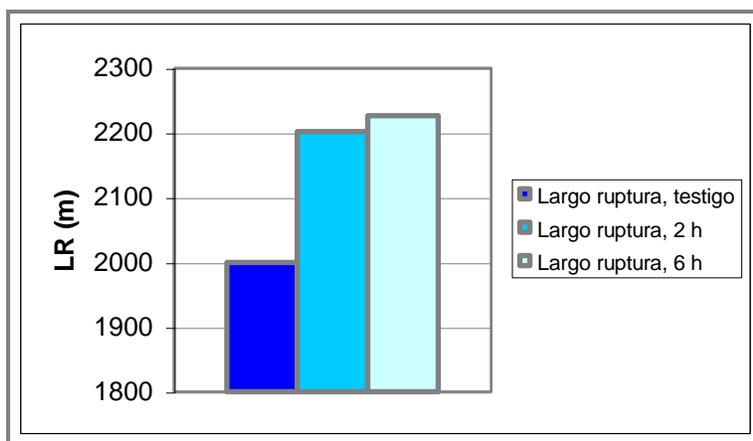


Figura 35. Largo de ruptura final promedio, según tiempo de tratamiento.

En cuanto a los resultados presentados previamente para la variable respuesta largo de ruptura, los valores obtenidos en las pastas tratadas son mejores que los de la pasta control.

Es así como, con la dosis de enzima de 400 nkat/g, el largo de ruptura promedio para todos los tratamientos con esta dosis fue de 2220,1 m, lo que representa un incremento de 11% con respecto a la pasta control. En el caso de la dosis 800 nkat/g, el largo de ruptura promedio para todos los tratamientos con esta dosis fue de 2198,4 m, lo que significa un incremento de 9,9% respecto a la pasta control. Como se desprende de estos datos, el incremento en el largo de ruptura se ve levemente afectado por la dosis de enzima, siendo el menor valor de incremento el correspondiente a la mayor dosis de enzima.

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Silva (2002), quien obtuvo aumentos en el valor de esta propiedad en pastas Kraft de Eucalyptus globulus tratadas con curdos de lacasa. Este autor indica incrementos de entre 1% y 9% en el largo de ruptura con respecto a la pasta control.

4.3.5. Análisis de Pareto para el Largo de Ruptura.

Del análisis estadístico se desprende que, de las variables consideradas, las más incidentes sobre el largo de ruptura, en orden de significancia estadística, son: la interacción entre la variable temperatura y pH, la variable pH, la variable temperatura y, finalmente, la interacción entre las variables dosis y pH.

En el Diagrama de Pareto, que se presenta a continuación (figura 36), se aprecia que las variables indicadas son estadísticamente significativas, ya que se encuentran dentro del 95% de confianza elegido para el análisis de varianza.

Diagrama de Pareto

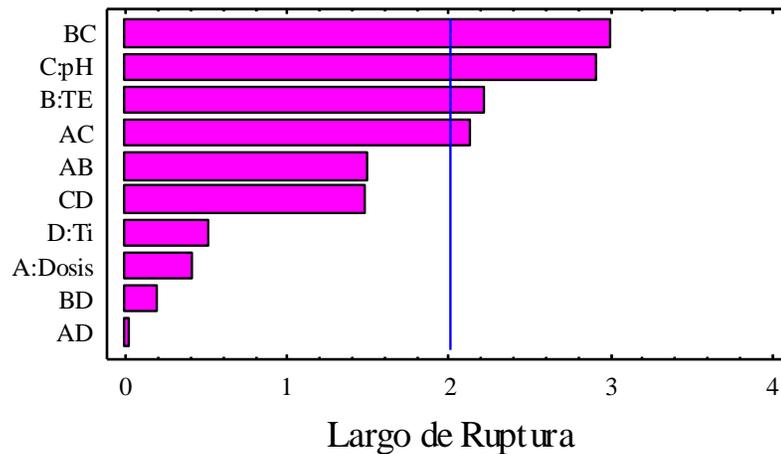


Figura 36. Diagrama de Pareto, análisis de la variable largo de ruptura.

La existencia de la interacción BC como significativa está indicando que el efecto aislado del pH (C) y la temperatura (B) sobre el largo de ruptura se ve potenciado cuando ambas condiciones actúan en conjunto. Aunque las variables por separado son estadísticamente significativas, su interacción lo es más, contribuyendo a diferenciar el valor de la variable respuesta cuando se opera a temperatura 70° C y pH 5 (mayores largos de ruptura) frente a la combinación temperatura 50° C y pH 7 (menores largos de ruptura).

Un análisis similar puede hacerse para la interacción AC (dosis de enzima – pH), caso en el cual, aún sin ser significativo el factor A (dosis), su efecto se complementa con el pH haciendo que el efecto combinado de ambos presente significancia sobre la variable respuesta largo de ruptura.

4.4. Análisis estadístico general.

En términos generales, a partir del análisis de varianza realizado y de los diagramas de Pareto asociados se puede concluir que para las variables respuesta número kappa y blancura, la variable independiente de mayor nivel de significancia estadística es la dosis de enzima aplicada.

Para la variable respuesta largo de ruptura la variable independiente dosis de enzima deja de ser relevante y toma una mayor significancia la interacción entre las variables temperatura y pH. Para este análisis, la variable independiente de mayor importancia es la temperatura, seguida del pH. De acuerdo a los resultados observados, se infiere que la pasta kraft tratada tuvo un pequeño incremento en los valores obtenidos para esta variable respuesta.

De lo anterior se obtuvo un tratamiento óptimo para la variable respuesta número kappa, la cual es la más relevante para esta investigación. Los valores óptimos corresponden a: dosis 800 nkat/g de pasta, 70 °C de temperatura, pH 7 y tiempo de tratamiento 2 horas.

Las variables temperatura y pH presentan una menor significancia en los valores obtenidos para las variables respuesta número kappa y blancura ISO, debido a que se experimentó con valores de temperatura y pH en un rango previamente establecido en las especificaciones técnicas de la enzima enviadas por el productor. Sin embargo, si los valores utilizados se encontraran fuera de los intervalos señalados, la enzima corre el riesgo de desnaturalizarse, en cuyo caso los tratamientos aplicados no serían efectivos en la deslignificación de la pasta.

Los valores obtenidos para la variable respuesta más significativa para este estudio, número kappa, presentan una disminución considerable. En cuanto a los valores medios obtenidos en la blancura y largo de ruptura para cada variable independiente, estos muestran un leve aumento. Esto se debe a la deslignificación producida en la pasta, en parte por la acción enzimática y probablemente también por el efecto de solubilización, en el tampón usado, de la lignina adsorbida en las fibras, incidiendo en alguna medida la extracción alcalina aplicada para eliminar los restos de lignina de la pasta que quedan libres por efecto del tratamiento enzimático.

5. CONCLUSIONES.

- La acción de una enzima comercial ligninolítica del tipo lacasa sobre pasta Kraft de *Eucaliptus globulus* produce un efecto de deslignificación de esta, lo que se demuestra con la disminución del número Kappa.
- La acción de la enzima sobre la pasta Kraft produce variaciones estadísticamente significativas sobre las propiedades del papel Kraft fabricado con la pasta tratada. La propiedad óptica blancura presenta un aumento que fluctúa entre 11,94% y 14,66%; la propiedad mecánica largo de ruptura presenta un aumento que fluctúa entre 7,21% y 14,17 %.
- La variable de entrada que tuvo mayor incidencia sobre el grado de deslignificación de la pasta fue la dosis de enzima. Los mejores resultados en la reducción del número Kappa se obtuvieron para la mayor dosis de enzima aplicada, es decir, 800 nkat/g de pasta. Con esta dosis y a pH 7, 2 horas de tratamiento y temperatura 70°C se obtuvo la máxima disminución del número Kappa, un 25%.
- Al comparar el número Kappa inicial de la pasta con los valores promedio obtenidos después del tratamiento enzimático, el porcentaje de reducción del número Kappa fue de más de 12% con la dosis 400 nkat/g, mientras que con la dosis de 800 nkat/g éste se elevó a cerca de 16,5%.
- Con respecto a la variable respuesta blancura ISO, ésta se ve afectada por el ataque enzimático, produciéndose en los resultados finales variaciones estadísticamente significativas para esta variable respuesta. Los valores de blancura obtenidos para los testigos fueron de 35% ISO y las pastas tratadas registraron valores que fluctúan en torno a 40% ISO.
- La variable respuesta largo de ruptura del papel fabricado con la pasta tratada experimentó un aumento en relación al largo de ruptura testigo (2000 metros). Los valores obtenidos fluctuaron en torno a los 2200 metros.
- La disminución del número Kappa en la pasta con dosis de enzima 0 nkat/g, se debe a la extracción de la lignina residual con hidróxido de sodio y de la solubilización de la lignina adsorbida a la fibra, ya que ambos producen un efecto de caída en el número Kappa de la pasta.
- Se experimentó con valores dentro de un rango previamente establecido para las variables temperatura y pH, con el fin de no desnaturalizar la enzima. Esto pudo haber provocado la baja incidencia de estas variables y de sus interacciones sobre los resultados finales del estudio.

- La máxima dosis de enzima del tipo lacasa aplicada en el estudio fue convenientemente baja, correspondiendo a una cantidad de enzima concentrada cercana a 0,1 % con respecto a masa de pasta, lo que en términos económicos no representa un costo importante si se utiliza la enzima a nivel industrial.

Se recomienda, para complementar el estudio, considerar una mayor cantidad de niveles en cada variable independiente (dosis, temperatura, pH y tiempo de tratamiento) y estudiar otras variables de entrada, como por ejemplo el tipo de pasta, sin restringirse por el posible efecto de desnaturalización de la enzima.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- ❖ ADLER, E. 1977. Lignin chemistry past, present and future. *Wood Sci. Technol.* 11: 169-218.
- ❖ AKHTAR, M., KIRK, TK., y BLANCHETTE, RA. 1996. Biopulping: An overview of consortia research. Pp: 187-192. *Biotechnology in the pulp and paper industry. Recent advances in applied and fundamental research.* Srebotnik E y Messner K. (eds.), Facultas-Universitätsverlag, Vienna.
- ❖ AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R. y KENT, T. 1997. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, "Fungal Delignification and Biomechanical Pulping of wood". Vol 57: 159-195.
- ❖ ANTONOPOULOS V.T., HERNANDEZ M, ARIAS ME, MAVRAKOS E y BALL A.S. 2001. The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus Kraft pulp. 57: 92-97.
- ❖ APUNTES. 2002. Enzimas.
<http://www.lafacu.com/apuntes/biologia/enzimas/default.htm#GlossClasi>
- ❖ BALAKSHIN M, CHEN CL, GRATZL JS, KIRKMAN A y JAKOB H. 2000. Biobleaching of pulp with dioxygen in the laccase-mediator system. Part 1. Kinetics of delignification. 54: 390-396.
- ❖ BEG Q.K., KAPOOR M., MAAHAJAM L. y HOONDAL G.S. 2001. Microbial xylanases and their applications: a review. *Appl Microbiol Bbiotechnol* 56:326-338.
- ❖ BOURBONNAIS R y PAICE MG. 1992. Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 823-827.
- ❖ BOURBONNAIS R y PAICE MG. 1996. Enzymatic delignification of Kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi Journal.* 79: 199-204.
- ❖ BROWNING. 1967. *Methods of wood chemistry.* Institute of paper chemistry. Appleton, Wisconsin. P: 7-17.
- ❖ BÜNTENMEYER, K. 1986. Hidrólisis ácida de Eucalyptus glóbulos Labill. Mediante el proceso scholler. Tesis Universidad de Chile. 144 pp.
- ❖ CALL H.P. y MÜCKE I. 1997. *Journal of biotechnology*, editorial Elsevier, Alemania. 53: 163-202.

- ❖ CALL H.P. y MUCKE I. 1997. History, overview and application of mediated lignolytic system, especially laccase-mediator-systems (Lignozim-process) Journal of Biotechnology 53. pp: 163-202.
- ❖ CARLTON W. Dence and DOUGLAS W. Reeve. 1996. Pulp Bleaching. Principles and Practice.
- ❖ CARMONA, R, 1998. Apuntes docentes del Curso de química de la Madera. Departamento de Tecnología de la Madera, Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile, Chile.
- ❖ CARTWRIGHT, M. 1958. Decay of timber and its prevention. London, Her Majesty's Stationery Office. 332 pp.
- ❖ COLONELLI, P. 1996. Efecto del tratamiento con hongos de pudrición blanca sobre pasta kraft, su refinación y propiedades físico-mecánicas del papel. Tesis Universidad de Chile. 79 pp.
- ❖ CRESTINI C. and ARGYROPOULOS D. 1998. The early oxidative biodegradation steps of residual kraft lignin model with laccase. Bioorganic and Medical chemistry 6: 2161-2169.
- ❖ CURSO DE BIOMOLECULAS. 2003. Enzimas. Universidad del País Vasco. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
<http://www.ehu.es/biomoleculas/ENZ/ENZ.htm>
- ❖ EATON, R.A, and HALE, M.D.C., 1993. Wood. Decay, pest and protection. Chapman and Hall.
- ❖ EMPRESAS CMPC. [2000 a]. Mercado Mundial de la Celulosa. [En línea]. Disponible en http://www.papelnet.cl/celulosa/mercado_mundial.htm. Fecha de consulta Agosto 2002.
- ❖ EMPRESAS CMPC. [2000 b]. Mercado Mundial de la Celulosa. [En línea]. Disponible en <http://www.papelnet.cl/celulosa/comercializacion.htm>. Fecha de consulta Agosto 2002.
- ❖ ERIKSSON K.E. y KIRK T.K. 1985. Biopulping, biobleaching and treatment of kraft bleaching effluents with white rot fungi. In: Moo-Young, M. Comprehensive biotechnology: The principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. Pergamon Press, New York, USA p.i.
- ❖ ERIKSSON KE. 1990. Biotechnology in the pulp and paper industry. Wood Sci. Technol. 24: 79-103.

- ❖ ESPINOSA, C. 2001. Evaluación de los impactos de la producción de celulosa. Publicaciones Terram, Análisis de Políticas Públicas N° 4. <http://www.wrm.org.uy/paises/chile/eia.pdf>
- ❖ EUROPEAN COMISIÓN. 2002. La biotecnología, una tecnología de producción más limpia para el papel y la pasta de papel. <http://www.jrc.es/iptsreport/vol16/spanish/BIO1S166.htm>
- ❖ FALK y REINHAMMAR 1972. Visible and near-infrared circular dichroism of some copper proteins. Biochem. Biophys. Acta. BBA. 285: 84-90.
- ❖ FENGEL, D. And WEGENER, G. 1977. Studies on milled wood lignins from spruce. Part 1 Composition and molecular properties. Wood Sci. Technol. 11: 133-145.
- ❖ FENGEL, D. And WEGENER, G. 1984. Wood Chemistry ultrastructure and reaccion D. W. de Grmyter, BERLIN, 422 p.
- ❖ FUNDACIÓN ECOLOGÍA Y DESARROLLO. 2003. Impactos ambientales de la fabricación de pasta de papel. <http://www.ecodes.org/lifepapel/htm/info/tecnica/ciclo/impacto2.htm>
- ❖ GALVEZ, N. 2001. Determinación de la composición química de la madera de Pino Insigne (*Pinus Radiata* D. Don) sometida a la acción de dos hongos de pudrición blanca. Tesis Universidad de Chile. 60 pp.
- ❖ GIL, I. y IRARRÁZABAL, C. 1999. Biotecnología en Chile, Oportunidades de Innovación Tecnológica”, Ed. Gil y Irarrázabal. (Libro de Resúmenes, U. de Talca, 1998).
- ❖ GOLD MH, GLENN JK y ALIC M. 1989. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biocatalist in agricultural biotechnology. Whitaker JR y Sonnet PE. (eds.) American Chemical Society, Washington, pp 127-140.
- ❖ GOMEZ, A. 1995. Evaluación de la biodegradación de la lignina en *Pinus radiata* D. Don por la acción de hongos de pudrición blanca y su efecto en pulpaje kraft. Tesis de magíster en ciencias forestales, Universidad de Chile. 83 pp.
- ❖ GONZALEZ, J. y GARAY, R. 1998. Biotecnología forestal, base para un futuro mejor. Chile forestal, Documento técnico 119.
- ❖ GONZALEZ, J. 1999. Apuntes docentes del curso de Celulosa y Papel. Departamento de Tecnología de la Madera, Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile, Chile.

- ❖ GONZALEZ, J.; DONOSO, J.; ALLISON, B. y VALENZUELA, C. 2001. Biotechnologies for Kraft pulp production: results of experiences in Chile and future perspectives. *Revue ATIP* 55 (5) :14-17.
- ❖ GONZALEZ, J.; DONOSO, J.; ALLISON, B. y VALENZUELA, C. 2001. biotecnologías para la fabricación de pasta Kraft: resultados de las experiencias en Chile y perspectivas futuras. *El papel* 95, Diciembre 2001 – Enero 2002. pp: 38 – 40.
- ❖ HIGUCHI, T. 1990. Lignin biochemistry : Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24: 23-63.
- ❖ HIGUCHI, T., SHIMADA, M., NAKATSUBO, F. and TANAHOSHI, M. 1990. Differences in biosynthesis of guaiacyl and syringyl lignins in wood. *Wood Sci. Technol.* 11: 153-167.
- ❖ IÁÑEZ, E. 2002. Biotecnología y Biodiversidad. Instituto de Biotecnología. Universidad de Granada, España .
<http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/biodiversidad.htm>
- ❖ INFOR. 2002. Información estadística.
<http://www.infor.cl/estadisticas>
- ❖ INSTITUTO SINDICAL DE TRABAJO, AMBIENTE y SALUD. 2002.
<http://www.istas.net/ma/areas/residuos/caso03.pdf>
- ❖ INTERNACIONAL PROGRAMME COMITÉ, 2001. Symposium on recent advances in lignin biodegradation and biosíntesis. Viikki biocenter, University of Helsinki, Helsinki, Finlandia. 163 pp.
- ❖ KOLLMANN, F and COTE, W. 1968. Principles of wood science and technology. Solid wood Volumen I. Springer-Verlag New York Inc. 1968.
- ❖ KUHAD, R.C.; SINGH, A. y ERIKSSON, K. 1997. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Microorganisms and their Enzymes Involved in the Degradation of Plant Fiber Cell Walls. pp: 45-125.
- ❖ LIBBY, E.C. Ciencia y tecnología sobre pulpa y papel. 4ªed. CECSA, México, D.F. V.1, 514 pp.
- ❖ LUND M. y FELBY C. 2001. Wet strength improvement of unbleached kraft pulp through laccase catalyzed oxidation. *Enzyme and Microbial Technology.* 28: 760-765.
- ❖ MALMSTRÖM B.G. 1982. Enzymology of oxigen. *Amm. Rev. Biochemical.* 51:21-59.

- ❖ MATHEWS, C. K., 1998. Bioquímica. 2ª ed. Oregon State University. McGraw-Hill/ Interamericana de España, S.A.U. Capitulo 11. 398-458 p.
- ❖ MELO S. , J. PAZ P., 1992 Refinación de pulpas. Facultad de Ingeniería –II T. Universidad de Concepción. Chile.
- ❖ MESSNER, K. and SREBOTNIK, E. 1994. Biopulping: An overview of developments in an environmentally safe paper-making technology. Microbiology reviews 13:351-364.
- ❖ MESSNER, K. y COLABORADORES. 2000. Resumen final proyecto OXEPI, UE. Datos no publicado. Fuente: Silva R. 2002.
- ❖ MILLAR, H. 2002. Obtención de celulosa ECF de Pino Radiata incorporando una etapa ozono / dióxido de cloro. Tesis Magíster en Ciencias con mención Química. Universidad de Concepción. Chile. 110 pp.
- ❖ MOREIRA MT, FEIJOO G, REYES SIERRA-ALVAREZ, LEMA J y FIELD J. 1997. Biobleaching of oxygen delignified kraft pulp by several white rot fungal strains. Journal of Biotechnology. 53: 237-251.
- ❖ MONTGOMEY, D.C. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica, México, D.F. 589p.
- ❖ OLEA, F. 2002. Composición química de la madera de Pinus Radiata D. Don alterada por hongos de pudrición blanca. Memoria Universidad de Chile. 67 pp.
- ❖ REINHAMMAR 1984. Laccase En: copper proteins and copper enzymes. Vol 3, pp: 1-35. Lontie L (eds) CRC Press Inc. Florida. USA.
- ❖ REINOSO, E. 1996. 2002. El papel, la celulosa y el medio ambiente. Ediciones Santillana. Argentina.
<http://www.santillana.com.ar/doc/articulos/celulosa.pdf>
- ❖ SHIMADA M. y HIGUCHI T. Wood research institute, Kyoto University, Kyoto, Japón. Paginas 557-619.
- ❖ SILVA, R. 2002. Antibiosis entre hongos lignívoros y hongos antagónicos para efecto del biopulpaje de madera de *Pinus radiata*. Memoria Ingeniero Forestal. Universidad de Chile. 120 pp.
- ❖ SILVA, R. 2002. Obtención de enzimas ligninolíticas producidas por hongos basidiomicetos. Evaluación de su aplicación al blanqueo de pastas de madera. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. España. 211 pp.
- ❖ VICUÑA, R. 2002. Bioquímica, fisiología y genética molecular de microorganismos que degradan la lignina. Biotecnología en la industria de la celulosa. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Ciencias.
<http://www.bio.puc.cl/rvicuna1.htm>

- ❖ VIKARI L., RANVA M., KANTELINEN A., SANDQUIST J. y LINKO M. 1986. Bleaching with enzymes. 3th International conference in biotechnology in pulp and paper industry. Stockholm. pp: 67-69.
- ❖ WILHELM, H. 2003. Consecuencia de los últimos adelantos técnicos en la producción de la pasta y el papel para los países en desarrollo. Food And Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/docrep/f3200S/f3200s04.htm>
- ❖ WOLFENDEN R S y WILLSON R L.. 1982. Radical- cations as reference chromogens in the kinetics studies of one- electron transfer reactions. J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2: 805 – 812.
- ❖ WONG K., ANDERSON K. y KIBBLEWHITE R. 1999. Effect of the laccasa-mediator system on the handsheet properties of two high kappa kraft pulp. Enzyme and Microbial Technology. 25: 125-131.
- ❖ WORRAL, J.; ANAGNOST, S. y ZABEL, R. 1997. Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi. Mycologia, 89 (2): 199-219.
- ❖ ZABEL, R. y MORRELL, J. 1992. Wood Microbiology. Decay and its prevention. Chapter 8 and 9. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. Academic Press, Inc. USA. 476 pp.

7. APÉNDICE.

Cuadros generales.

Kappa inicial	Código tratamiento	Kappa final	Código tratamiento	Kappa final	Código tratamiento	Kappa final
17	0005052	14,95	4005052	14,88	8005052	14,10
17	0005056	15,21	4005056	15,02	8005056	14,03
17	0005072	15,49	4005072	15,29	8005072	14,37
17	0005076	15,25	4005076	15,37	8005076	14,03
17	0007052	14,95	4007052	14,78	8007052	14,31
17	0007056	15,21	4007056	14,92	8007056	14,47
17	0007072	15,49	4007072	14,81	8007072	13,87
17	0007076	15,25	4007076	14,39	8007076	14,35

Cuadro 16. Promedios de los diferentes tratamientos para variable respuesta N° Kappa.

Blancura control	Código tratamiento	Blancura	Código tratamiento	Blancura	Código tratamiento	Blancura
35	0005052	39,92	4005052	40,57	8005052	39,73
35	0005056	40,63	4005056	38,9	8005056	38,23
35	0005072	40,43	4005072	39,90	8005072	39,27
35	0005076	40,07	4005076	39,87	8005076	38,10
35	0007052	39,73	4007052	40,8	8007052	39,33
35	0007056	40,13	4007056	40,63	8007056	39,70
35	0007072	40,13	4007072	40,20	8007072	39,87
35	0007076	39,33	4007076	40,13	8007076	39,17

Cuadro 17. Promedios de los diferentes tratamientos para variable respuesta blancura.

Largo ruptura control	Código tratamiento	Largo ruptura	Código tratamiento	Largo ruptura	Código tratamiento	Largo ruptura
2000	0005052	2105,86	4005052	2100,06	8005052	2118,28
2000	0005056	2611,92	4005056	1996,83	8005056	2017,18
2000	0005072	2092,07	4005072	2298,33	8005072	2203,97
2000	0005076	2074,91	4005076	2209,54	8005076	2098,69
2000	0007052	2445,45	4007052	2336,11	8007052	2308,83
2000	0007056	2256,21	4007056	2726,47	8007056	2377,73
2000	0007072	2339,64	4007072	1819,32	8007072	2250,50
2000	0007076	1856,12	4007076	2274,24	8007076	2212,43

Cuadro 18. Promedios de los diferentes tratamientos para variable respuesta largo ruptura.

Cuadros según dosis.

Código tratamiento	Nº Kappa	Diferencia	Porcentaje	LR (m)	Blancura (%ISO)
Testigo (pasta planta)	17			2000	35
5052	14,73	2,27	13,35	2130,15	40,7
5052	14,68	2,32	13,65	2219,28	39,4
5052	15,43	1,57	9,24	1968,16	39,7
5056	15,68	1,32	7,76	2639,87	42,2
5056	14,88	2,12	12,47	2589,57	39,9
5056	15,06	1,94	11,41	2606,33	39,8
5072	15,45	1,55	9,12	2044,56	40,1
5072	15,36	1,64	9,65	2086,48	41,0
5072	15,66	1,34	7,88	2145,16	40,2
5076	15,42	1,58	9,29	2185,72	40,9
5076	15,25	1,75	10,29	2069,39	40,1
5076	15,07	1,93	11,35	1969,62	39,2
7052	14,73	2,27	13,35	2361,70	39,3
7052	14,68	2,32	13,65	2420,34	39,4
7052	15,43	1,57	9,24	2554,33	40,5
7056	15,68	1,32	7,76	2320,16	40,6
7056	14,88	2,12	12,47	2311,87	40,7
7056	15,06	1,94	11,41	2136,61	39,1
7072	15,45	1,55	9,12	2390,14	40,4
7072	15,36	1,64	9,65	2339,62	40,5
7072	15,66	1,34	7,88	2289,17	39,5
7076	15,42	1,58	9,29	1817,03	39,1
7076	15,25	1,75	10,29	1850,54	39,5
7076	15,07	1,93	11,35	1900,80	39,4

Cuadro 19. cuadro general para la dosis 0 nkat/g.

Código trat.	Nº Kappa	Diferencia	Porcentaje	LR (m)	Blancura (%ISO)
Testigo (pasta planta)	17			2000	35
4005052	14,94	2,06	12,12	2097,27	40,8
4005052	14,68	2,32	13,65	2164,61	41,0
4005052	15,02	1,98	11,65	2038,29	39,9
4005056	14,94	2,06	12,12	2105,92	38,1
4005056	15,18	1,82	10,71	1728,35	38,2
4005056	14,94	2,06	12,12	2156,21	40,4
4005072	15,07	1,93	11,35	2332,01	40,3
4005072	15,28	1,72	10,12	2230,95	40,2
4005072	15,53	1,47	8,65	2332,01	39,2
4005076	15,21	1,79	10,53	2187,10	40,3
4005076	15,62	1,38	8,12	2187,10	40,1
4005076	15,28	1,72	10,12	2254,42	39,2
4007052	14,63	2,37	13,94	2341,67	41,4
4007052	14,90	2,10	12,35	2308,27	41,3
4007052	14,81	2,19	12,88	2358,40	39,7
4007056	15,31	1,69	9,94	2773,38	40,0
4007056	14,80	2,20	12,94	2798,23	41,3
4007056	14,66	2,34	13,76	2607,81	40,6
4007072	14,90	2,10	12,35	1858,74	39,5
4007072	15,24	1,76	10,35	1529,24	40,5
4007072	14,28	2,72	16,00	2069,98	40,6
4007076	14,98	2,02	11,88	2209,56	40,5
4007076	14,29	2,71	15,94	2302,37	39,5
4007076	13,89	3,11	18,29	2310,80	40,4

Cuadro 20. Cuadro general para dosis 400 nkat/g.

Código trat.	Nº Kappa	Diferencia	Porcentaje	LR (m)	Blancura (%ISO)
Testigo (pasta planta)	17			2000	35
8005052	13,99	3,01	17,71	2233,44	39,5
8005052	14,30	2,70	15,88	2140,77	40,4
8005052	14,02	2,98	17,53	1980,64	39,3
8005056	13,78	3,22	18,94	1846,50	38,2
8005056	14,06	2,94	17,29	2123,52	38,2
8005056	14,25	2,75	16,18	2081,53	38,3
8005072	14,13	2,87	16,88	2237,73	39,8
8005072	14,14	2,86	16,82	2161,77	39,2
8005072	14,84	2,16	12,71	2212,39	38,8
8005076	13,94	3,06	18,00	1898,03	37,6
8005076	14,05	2,95	17,35	2232,48	37,8
8005076	14,10	2,90	17,06	2165,56	38,9
8007052	14,95	2,05	12,06	2459,42	38,9
8007052	15,12	1,88	11,06	2216,80	39,0
8007052	12,85	4,15	24,41	2250,27	40,1
8007056	14,52	2,48	14,59	2452,82	39,4
8007056	14,52	2,48	14,59	2277,62	40,4
8007056	14,37	2,63	15,47	2402,74	39,3
8007072	14,35	2,65	15,59	2174,33	40,3
8007072	14,51	2,49	14,65	2335,14	39,1
8007072	12,75	4,25	25,00	2242,04	40,2
8007076	14,38	2,62	15,41	2477,37	39,0
8007076	14,23	2,77	16,29	1986,98	39,2
8007076	14,43	2,57	15,12	2172,94	39,3

Cuadro 21. Cuadro general para dosis 800 nkat/g.

ANÁLISIS DE VARIANZA.

Analysis of Variance for Porcet

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Dosis	442,078	1	442,078	67,22	0,0000
B:TE	6,21869	1	6,21869	0,95	0,3348
C:pH	5,45601	1	5,45601	0,83	0,3661
D:Ti	0,188089	1	0,188089	0,03	0,8663
AB	1,37025	1	1,37025	0,21	0,6497
AC	13,8353	1	13,8353	2,10	0,1522
AD	0,236602	1	0,236602	0,04	0,8502
BC	19,1787	1	19,1787	2,92	0,0930
BD	1,38334	1	1,38334	0,21	0,6482
CD	10,9512	1	10,9512	1,67	0,2019
blocks	22,3713	2	11,1857	1,70	0,1914
Total error	388,035	59	6,57686		
Total (corr.)	911,302	71			

R-squared = 57,4198 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 50,4394 percent

Standard Error of Est. = 2,56454

Mean absolute error = 1,77456

Durbin-Watson statistic = 1,98001

Cuadro 22. Análisis de varianza para la variable respuesta número Kappa.

Analysis of Variance for Blancura

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Dosis	9,1875	1	9,1875	15,37	0,0002
B:TE	1,56056	1	1,56056	2,61	0,1115
C:pH	0,435556	1	0,435556	0,73	0,3968
D:Ti	3,125	1	3,125	5,23	0,0258
AB	3,74083	1	3,74083	6,26	0,0152
AC	0,00333333	1	0,00333333	0,01	0,9407
AD	1,61333	1	1,61333	2,70	0,1057
BC	0,160556	1	0,160556	0,27	0,6062
BD	1,17556	1	1,17556	1,97	0,1660
CD	0,200556	1	0,200556	0,34	0,5646
blocks	1,31083	2	0,655417	1,10	0,3407
Total error	35,2664	59	0,597735		
Total (corr.)	57,78	71			

R-squared = 38,9644 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 28,9585 percent

Standard Error of Est. = 0,773133

Mean absolute error = 0,575694

Durbin-Watson statistic = 2,32346

Cuadro 23. Análisis de varianza para la variable respuesta blancura.

Analysis of Variance for LR

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Dosis	7099,74	1	7099,74	0,17	0,6790
B:TE	203346,0	1	203346,0	4,95	0,0299
C:pH	349111,0	1	349111,0	8,50	0,0050
D:Ti	10794,2	1	10794,2	0,26	0,6100
AB	91533,2	1	91533,2	2,23	0,1407
AC	187604,0	1	187604,0	4,57	0,0367
AD	12,948	1	12,948	0,00	0,9859
BC	372344,0	1	372344,0	9,07	0,0038
BD	1591,23	1	1591,23	0,04	0,8446
CD	90233,2	1	90233,2	2,20	0,1435
blocks	28695,8	2	14347,9	0,35	0,7065
Total error	2,42203E6	59	41051,4		
Total (corr.)	3,7644E6	71			

R-squared = 35,6595 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 25,1119 percent

Standard Error of Est. = 202,611

Mean absolute error = 139,001

Durbin-Watson statistic = 2,58351

Cuadro 24. Análisis de varianza para la variable respuesta largo de ruptura.

CUADROS POR VARIABLES.

según pH y tiempo	blancura	Largo Ruptura(M)	Kappa
5052	39,92	2105,86	14,95
7052	39,73	2445,45	14,95
4005052	40,57	2100,06	14,88
4007052	40,80	2336,11	14,78
8005052	39,73	2118,28	14,10
8007052	39,33	2308,83	14,31
	40,01	2235,77	14,66
5056	40,63	2611,92	15,21
7056	40,13	2256,21	15,21
4005056	38,90	1996,83	15,02
4007056	40,63	2726,47	14,92
8005056	38,23	2017,18	14,03
8007056	39,70	2377,73	14,47
	39,71	2331,06	14,81
5072	40,43	2092,07	15,49
7072	40,13	2339,64	15,49
4005072	39,90	2298,33	15,29
4007072	40,20	1819,32	14,81
8005072	39,27	2203,97	14,37
8007072	39,87	2250,50	13,87
	39,97	2167,30	14,89
5076	40,07	2074,91	15,25
7076	39,33	1856,12	15,25
4005076	39,87	2209,54	15,37
4007076	40,13	2274,24	14,39
8005076	38,10	2098,69	14,03
8007076	39,17	2212,43	14,35
	39,44	2120,99	14,77

Cuadro 25. Promedios de las variables respuesta según pH y tiempo.

según pH	blancura	Largo Ruptura(M)	Kappa
5052	39,92	2105,86	14,95
5056	40,63	2611,92	15,21
7052	39,73	2445,45	14,95
7056	40,13	2256,21	15,21
4005052	40,57	2100,06	14,88
4005056	38,90	1996,83	15,02
4007052	40,80	2336,11	14,78
4007056	40,63	2726,47	14,92
8005052	39,73	2118,28	14,10
8005056	38,23	2017,18	14,03
8007052	39,33	2308,83	14,31
8007056	39,70	2377,73	14,47
	39,86	2283,41	14,74
5072	40,43	2092,07	15,49
5076	40,07	2074,91	15,25
7072	40,13	2339,64	15,49
7076	39,33	1856,12	15,25
4005072	39,90	2298,33	15,29
4005076	39,87	2209,54	15,37
4007072	40,20	1819,32	14,81
4007076	40,13	2274,24	14,39
8005072	39,27	2203,97	14,37
8005076	38,10	2098,69	14,03
8007072	39,87	2250,50	13,87
8007076	39,17	2212,43	14,35
	39,71	2144,15	14,83

Cuadro 26. Promedios de las variables respuesta según pH.

según tiempo	blancura	Largo Ruptura(M)	Kappa
5052	39,92	2105,86	14,95
5072	40,43	2092,07	15,49
7052	39,73	2445,45	14,95
7072	40,13	2339,64	15,49
4005052	40,57	2100,06	14,88
4005072	39,90	2298,33	15,29
4007052	40,80	2336,11	14,78
4007072	40,20	1819,32	14,81
8005052	39,73	2118,28	14,10
8005072	39,27	2203,97	14,37
8007052	39,33	2308,83	14,31
8007072	39,87	2250,50	13,87
	39,99	2201,54	14,77
5056	40,63	2611,92	15,21
5076	40,07	2074,91	15,25
7056	40,13	2256,21	15,21
7076	39,33	1856,12	15,25
4005056	38,90	1996,83	15,02
4005076	39,87	2209,54	15,37
4007056	40,63	2726,47	14,92
4007076	40,13	2274,24	14,39
8005056	38,23	2017,18	14,03
8005076	38,10	2098,69	14,03
8007056	39,70	2377,73	14,47
8007076	39,17	2212,43	14,35
	39,58	2226,02	14,79

Cuadro 27. Promedios de las variables respuesta según tiempo.

Temperatura	Blancura	Largo Ruptura	Kappa
5052	39,92	2105,86	14,95
4005052	40,57	2100,06	14,88
8005052	39,73	2118,28	14,10
5056	40,63	2611,92	15,21
4005056	38,90	1996,83	15,02
8005056	38,23	2017,18	14,03
5072	40,43	2092,07	15,49
4005072	39,90	2298,33	15,29
8005072	39,27	2203,97	14,37
5076	40,07	2074,91	15,25
4005076	39,87	2209,54	15,37
8005076	38,10	2098,69	14,03
	39,64	2160,64	14,83
7052	39,73	2445,45	14,95
4007052	40,80	2336,11	14,78
8007052	39,33	2308,83	14,31
7056	40,13	2256,21	15,21
4007056	40,63	2726,47	14,92
8007056	39,70	2377,73	14,47
7072	40,13	2339,64	15,49
4007072	40,20	1819,32	14,81
8007072	39,87	2250,50	13,87
7076	39,33	1856,12	15,25
4007076	40,13	2274,24	14,39
8007076	39,17	2212,43	14,35
	39,93	2266,92	14,73

Cuadro 28. Promedios de las variables respuesta según temperatura.

8. ANEXO.

Factores de corrección para número Kappa.

	30	40	50	60	70
0	0,959	0,979	1,000	1,022	1,044
1	0,960	0,981	1,002	1,024	1,046
2	0,962	0,983	1,004	1,026	1,049
3	0,964	0,985	1,006	1,028	1,051
4	0,966	0,987	1,009	1,030	1,053
5	0,968	0,989	1,011	1,033	1,055
6	0,970	0,991	1,013	1,035	1,058
7	0,973	0,994	1,015	1,037	
8	0,975	0,996	1,017	1,039	
9	0,977	0,998	1,019	1,042	

Cuadro 29. Factor de permanganato para la obtención del número Kappa.

T °C	F						
12	1,1690	16,5	1,1105	21	1,0520	25,5	0,9935
12,5	1,1625	17	1,1040	21,5	1,0455	26	0,9870
13	1,1560	17,5	1,0975	22	1,0390	26,5	0,9805
13,5	1,1495	18	1,0910	22,5	1,0325	27	0,9740
14	1,1430	18,5	1,0845	23	1,0260	27,5	0,9675
14,5	1,1365	19	1,0780	23,5	1,0195	28	0,9610
15	1,1300	19,5	1,0715	24	1,0130	28,5	0,9545
15,5	1,1235	20	1,0650	24,5	1,0065		
16	1,1170	20,5	1,0585	25	1,0000		

Cuadro 30. Factor de temperatura para la obtención del número Kappa.

APÉNDICE.

Cuadros generales.

kappa inicial	Código tratamiento	kappa final	Código tratamiento	kappa final	Código tratamiento	kappa final
17	0005052	14,95	4005052	14,88	8005052	14,10
17	0005056	15,21	4005056	15,02	8005056	14,03
17	0005072	15,49	4005072	15,29	8005072	14,37
17	0005076	15,25	4005076	15,37	8005076	14,03
17	0007052	14,95	4007052	14,78	8007052	14,31
17	0007056	15,21	4007056	14,92	8007056	14,47
17	0007072	15,49	4007072	14,81	8007072	13,87
17	0007076	15,25	4007076	14,39	8007076	14,35

Cuadro 16. Promedios de los diferentes tratamientos para variable respuesta N° kappa.

Blancura control	Código tratamiento	Blancura	Código tratamiento	Blancura	Código tratamiento	Blancura
35	0005052	39,92	4005052	40,57	8005052	39,73
35	0005056	40,63	4005056	38,9	8005056	38,23
35	0005072	40,43	4005072	39,90	8005072	39,27
35	0005076	40,07	4005076	39,87	8005076	38,10
35	0007052	39,73	4007052	40,8	8007052	39,33
35	0007056	40,13	4007056	40,63	8007056	39,70
35	0007072	40,13	4007072	40,20	8007072	39,87
35	0007076	39,33	4007076	40,13	8007076	39,17

Cuadro 17. Promedios de los diferentes tratamientos para variable respuesta blancura.

Largo ruptura control	Código tratamiento	Largo ruptura	Código tratamiento	Largo ruptura	Código tratamiento	Largo ruptura
2000	0005052	2105,86	4005052	2100,06	8005052	2118,28
2000	0005056	2611,92	4005056	1996,83	8005056	2017,18
2000	0005072	2092,07	4005072	2298,33	8005072	2203,97
2000	0005076	2074,91	4005076	2209,54	8005076	2098,69
2000	0007052	2445,45	4007052	2336,11	8007052	2308,83
2000	0007056	2256,21	4007056	2726,47	8007056	2377,73
2000	0007072	2339,64	4007072	1819,32	8007072	2250,50
2000	0007076	1856,12	4007076	2274,24	8007076	2212,43

Cuadro 18. Promedios de los diferentes tratamientos para variable respuesta largo ruptura.

Cuadro general para dosis 0

Código	Nº kappa	Diferencia	Porcentaje	LR (m)	Blancura (%ISO)
Testigo (pasta planta)	17			2000	35
5052	14,73	2,27	13,35	2130,15	40,7
5052	14,68	2,32	13,65	2219,28	39,4
5052	15,43	1,57	9,24	1968,16	39,7
5056	15,68	1,32	7,76	2639,87	42,2
5056	14,88	2,12	12,47	2589,57	39,9
5056	15,06	1,94	11,41	2606,33	39,8
5072	15,45	1,55	9,12	2044,56	40,1
5072	15,36	1,64	9,65	2086,48	41,0
5072	15,66	1,34	7,88	2145,16	40,2
5076	15,42	1,58	9,29	2185,72	40,9
5076	15,25	1,75	10,29	2069,39	40,1
5076	15,07	1,93	11,35	1969,62	39,2
7052	14,73	2,27	13,35	2361,70	39,3
7052	14,68	2,32	13,65	2420,34	39,4
7052	15,43	1,57	9,24	2554,33	40,5
7056	15,68	1,32	7,76	2320,16	40,6
7056	14,88	2,12	12,47	2311,87	40,7
7056	15,06	1,94	11,41	2136,61	39,1
7072	15,45	1,55	9,12	2390,14	40,4
7072	15,36	1,64	9,65	2339,62	40,5
7072	15,66	1,34	7,88	2289,17	39,5
7076	15,42	1,58	9,29	1817,03	39,1
7076	15,25	1,75	10,29	1850,54	39,5
7076	15,07	1,93	11,35	1900,80	39,4

Cuadro 19. cuadro general para la dosis 0 nkat/g.

Cuadro general para dosis 400 nkat/g

Código	Nº kappa	Diferencia	Porcentaje	LR (m)	Blancura (%ISO)
Testigo (pasta planta)	17			2000	35
4005052	14,94	2,06	12,12	2097,27	40,8
4005052	14,68	2,32	13,65	2164,61	41,0
4005052	15,02	1,98	11,65	2038,29	39,9
4005056	14,94	2,06	12,12	2105,92	38,1
4005056	15,18	1,82	10,71	1728,35	38,2
4005056	14,94	2,06	12,12	2156,21	40,4
4005072	15,07	1,93	11,35	2332,01	40,3
4005072	15,28	1,72	10,12	2230,95	40,2
4005072	15,53	1,47	8,65	2332,01	39,2
4005076	15,21	1,79	10,53	2187,10	40,3
4005076	15,62	1,38	8,12	2187,10	40,1
4005076	15,28	1,72	10,12	2254,42	39,2
4007052	14,63	2,37	13,94	2341,67	41,4
4007052	14,90	2,10	12,35	2308,27	41,3
4007052	14,81	2,19	12,88	2358,40	39,7
4007056	15,31	1,69	9,94	2773,38	40,0
4007056	14,80	2,20	12,94	2798,23	41,3
4007056	14,66	2,34	13,76	2607,81	40,6
4007072	14,90	2,10	12,35	1858,74	39,5
4007072	15,24	1,76	10,35	1529,24	40,5
4007072	14,28	2,72	16,00	2069,98	40,6
4007076	14,98	2,02	11,88	2209,56	40,5
4007076	14,29	2,71	15,94	2302,37	39,5
4007076	13,89	3,11	18,29	2310,80	40,4

Cuadro 20. Cuadro general para dosis 400 nkat/g.

Cuadro general para dosis 800 nkat/g

Código	Nº kappa	Diferencia	Porcentaje	LR (m)	Blancura (%ISO)
Testigo (pasta planta)	17			2000	35
8005052	13,99	3,01	17,71	2233,44	39,5
8005052	14,30	2,70	15,88	2140,77	40,4
8005052	14,02	2,98	17,53	1980,64	39,3
8005056	13,78	3,22	18,94	1846,50	38,2
8005056	14,06	2,94	17,29	2123,52	38,2
8005056	14,25	2,75	16,18	2081,53	38,3
8005072	14,13	2,87	16,88	2237,73	39,8
8005072	14,14	2,86	16,82	2161,77	39,2
8005072	14,84	2,16	12,71	2212,39	38,8
8005076	13,94	3,06	18,00	1898,03	37,6
8005076	14,05	2,95	17,35	2232,48	37,8
8005076	14,10	2,90	17,06	2165,56	38,9
8007052	14,95	2,05	12,06	2459,42	38,9
8007052	15,12	1,88	11,06	2216,80	39,0
8007052	12,85	4,15	24,41	2250,27	40,1
8007056	14,52	2,48	14,59	2452,82	39,4
8007056	14,52	2,48	14,59	2277,62	40,4
8007056	14,37	2,63	15,47	2402,74	39,3
8007072	14,35	2,65	15,59	2174,33	40,3
8007072	14,51	2,49	14,65	2335,14	39,1
8007072	12,75	4,25	25,00	2242,04	40,2
8007076	14,38	2,62	15,41	2477,37	39,0
8007076	14,23	2,77	16,29	1986,98	39,2
8007076	14,43	2,57	15,12	2172,94	39,3

Cuadro 21. Cuadro general para dosis 800 nkat/g.

ANÁLISIS DE VARIANZA.

Analysis of Variance for Porcet

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Dosis	442,078	1	442,078	67,22	0,0000
B:TE	6,21869	1	6,21869	0,95	0,3348
C:pH	5,45601	1	5,45601	0,83	0,3661
D:Ti	0,188089	1	0,188089	0,03	0,8663
AB	1,37025	1	1,37025	0,21	0,6497
AC	13,8353	1	13,8353	2,10	0,1522
AD	0,236602	1	0,236602	0,04	0,8502
BC	19,1787	1	19,1787	2,92	0,0930
BD	1,38334	1	1,38334	0,21	0,6482
CD	10,9512	1	10,9512	1,67	0,2019
blocks	22,3713	2	11,1857	1,70	0,1914
Total error	388,035	59	6,57686		
Total (corr.)	911,302	71			

R-squared = 57,4198 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 50,4394 percent

Standard Error of Est. = 2,56454

Mean absolute error = 1,77456

Durbin-Watson statistic = 1,98001

Cuadro 22. Análisis de varianza para la variable respuesta número kappa.

Analysis of Variance for Blancura

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Dosis	9,1875	1	9,1875	15,37	0,0002
B:TE	1,56056	1	1,56056	2,61	0,1115
C:pH	0,435556	1	0,435556	0,73	0,3968
D:Ti	3,125	1	3,125	5,23	0,0258
AB	3,74083	1	3,74083	6,26	0,0152
AC	0,00333333	1	0,00333333	0,01	0,9407
AD	1,61333	1	1,61333	2,70	0,1057
BC	0,160556	1	0,160556	0,27	0,6062
BD	1,17556	1	1,17556	1,97	0,1660
CD	0,200556	1	0,200556	0,34	0,5646
blocks	1,31083	2	0,655417	1,10	0,3407
Total error	35,2664	59	0,597735		
Total (corr.)	57,78	71			

R-squared = 38,9644 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 28,9585 percent

Standard Error of Est. = 0,773133

Mean absolute error = 0,575694

Durbin-Watson statistic = 2,32346

Cuadro 23. Análisis de varianza para la variable respuesta blancura.

Analysis of Variance for LR

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Dosis	7099,74	1	7099,74	0,17	0,6790
B:TE	203346,0	1	203346,0	4,95	0,0299
C:pH	349111,0	1	349111,0	8,50	0,0050
D:Ti	10794,2	1	10794,2	0,26	0,6100
AB	91533,2	1	91533,2	2,23	0,1407
AC	187604,0	1	187604,0	4,57	0,0367
AD	12,948	1	12,948	0,00	0,9859
BC	372344,0	1	372344,0	9,07	0,0038
BD	1591,23	1	1591,23	0,04	0,8446
CD	90233,2	1	90233,2	2,20	0,1435
blocks	28695,8	2	14347,9	0,35	0,7065
Total error	2,42203E6	59	41051,4		
Total (corr.)	3,7644E6	71			

R-squared = 35,6595 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 25,1119 percent

Standard Error of Est. = 202,611

Mean absolute error = 139,001

Durbin-Watson statistic = 2,58351

Cuadro 24. Análisis de varianza para la variable respuesta largo de ruptura.

CUADROS POR VARIABLES.

según pH y tiempo	blancura	Largo Ruptura(M)	kappa
5052	39,92	2105,86	14,95
7052	39,73	2445,45	14,95
4005052	40,57	2100,06	14,88
4007052	40,80	2336,11	14,78
8005052	39,73	2118,28	14,10
8007052	39,33	2308,83	14,31
	40,01	2235,77	14,66
5056	40,63	2611,92	15,21
7056	40,13	2256,21	15,21
4005056	38,90	1996,83	15,02
4007056	40,63	2726,47	14,92
8005056	38,23	2017,18	14,03
8007056	39,70	2377,73	14,47
	39,71	2331,06	14,81
5072	40,43	2092,07	15,49
7072	40,13	2339,64	15,49
4005072	39,90	2298,33	15,29
4007072	40,20	1819,32	14,81
8005072	39,27	2203,97	14,37
8007072	39,87	2250,50	13,87
	39,97	2167,30	14,89
5076	40,07	2074,91	15,25
7076	39,33	1856,12	15,25
4005076	39,87	2209,54	15,37
4007076	40,13	2274,24	14,39
8005076	38,10	2098,69	14,03
8007076	39,17	2212,43	14,35
	39,44	2120,99	14,77

Cuadro 25. Promedios de las variables respuesta según pH y tiempo.

según pH	blancura	Largo Ruptura(M)	kappa
5052	39,92	2105,86	14,95
5056	40,63	2611,92	15,21
7052	39,73	2445,45	14,95
7056	40,13	2256,21	15,21
4005052	40,57	2100,06	14,88
4005056	38,90	1996,83	15,02
4007052	40,80	2336,11	14,78
4007056	40,63	2726,47	14,92
8005052	39,73	2118,28	14,10
8005056	38,23	2017,18	14,03
8007052	39,33	2308,83	14,31
8007056	39,70	2377,73	14,47
	39,86	2283,41	14,74
5072	40,43	2092,07	15,49
5076	40,07	2074,91	15,25
7072	40,13	2339,64	15,49
7076	39,33	1856,12	15,25
4005072	39,90	2298,33	15,29
4005076	39,87	2209,54	15,37
4007072	40,20	1819,32	14,81
4007076	40,13	2274,24	14,39
8005072	39,27	2203,97	14,37
8005076	38,10	2098,69	14,03
8007072	39,87	2250,50	13,87
8007076	39,17	2212,43	14,35
	39,71	2144,15	14,83

Cuadro 26. Promedios de las variables respuesta según pH.

según tiempo	blancura	Largo Ruptura(M)	kappa
5052	39,92	2105,86	14,95
5072	40,43	2092,07	15,49
7052	39,73	2445,45	14,95
7072	40,13	2339,64	15,49
4005052	40,57	2100,06	14,88
4005072	39,90	2298,33	15,29
4007052	40,80	2336,11	14,78
4007072	40,20	1819,32	14,81
8005052	39,73	2118,28	14,10
8005072	39,27	2203,97	14,37
8007052	39,33	2308,83	14,31
8007072	39,87	2250,50	13,87
	39,99	2201,54	14,77
5056	40,63	2611,92	15,21
5076	40,07	2074,91	15,25
7056	40,13	2256,21	15,21
7076	39,33	1856,12	15,25
4005056	38,90	1996,83	15,02
4005076	39,87	2209,54	15,37
4007056	40,63	2726,47	14,92
4007076	40,13	2274,24	14,39
8005056	38,23	2017,18	14,03
8005076	38,10	2098,69	14,03
8007056	39,70	2377,73	14,47
8007076	39,17	2212,43	14,35
	39,58	2226,02	14,79

Cuadro 27. Promedios de las variables respuesta según tiempo.

Temperatura	Blancura	Largo Ruptura	Kappa
5052	39,92	2105,86	14,95
4005052	40,57	2100,06	14,88
8005052	39,73	2118,28	14,10
5056	40,63	2611,92	15,21
4005056	38,90	1996,83	15,02
8005056	38,23	2017,18	14,03
5072	40,43	2092,07	15,49
4005072	39,90	2298,33	15,29
8005072	39,27	2203,97	14,37
5076	40,07	2074,91	15,25
4005076	39,87	2209,54	15,37
8005076	38,10	2098,69	14,03
	39,64	2160,64	14,83
7052	39,73	2445,45	14,95
4007052	40,80	2336,11	14,78
8007052	39,33	2308,83	14,31
7056	40,13	2256,21	15,21
4007056	40,63	2726,47	14,92
8007056	39,70	2377,73	14,47
7072	40,13	2339,64	15,49
4007072	40,20	1819,32	14,81
8007072	39,87	2250,50	13,87
7076	39,33	1856,12	15,25
4007076	40,13	2274,24	14,39
8007076	39,17	2212,43	14,35
	39,93	2266,92	14,73

Cuadro 28. Promedios de las variables respuesta según temperatura.

ANEXO.

Factores de corrección para número kappa.

	30	40	50	60	70
0	0,959	0,979	1,000	1,022	1,044
1	0,960	0,981	1,002	1,024	1,046
2	0,962	0,983	1,004	1,026	1,049
3	0,964	0,985	1,006	1,028	1,051
4	0,966	0,987	1,009	1,030	1,053
5	0,968	0,989	1,011	1,033	1,055
6	0,970	0,991	1,013	1,035	1,058
7	0,973	0,994	1,015	1,037	
8	0,975	0,996	1,017	1,039	
9	0,977	0,998	1,019	1,042	

Cuadro 29. Factor de permanganato para la obtención del número kappa.

T °C	F						
12	1,1690	16,5	1,1105	21	1,0520	25,5	0,9935
12,5	1,1625	17	1,1040	21,5	1,0455	26	0,9870
13	1,1560	17,5	1,0975	22	1,0390	26,5	0,9805
13,5	1,1495	18	1,0910	22,5	1,0325	27	0,9740
14	1,1430	18,5	1,0845	23	1,0260	27,5	0,9675
14,5	1,1365	19	1,0780	23,5	1,0195	28	0,9610
15	1,1300	19,5	1,0715	24	1,0130	28,5	0,9545
15,5	1,1235	20	1,0650	24,5	1,0065		
16	1,1170	20,5	1,0585	25	1,0000		

Cuadro 30. Factor de temperatura para la obtención del número kappa.