

Descrição referente à patente de invenção de C-I-L INC., canadiana, industrial e comercial, com sede em 90 Sheppard Avenue East, North York, Ontário, Canadá, (inventores: John Richard Du Manoir e Paul Dubelsten, residentes no Canadá), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM MATERIAL LINHOCELULÓSICO BRANQUEADO" :

D E S C R I Ç Ã O

A presente invenção refere-se a um processo para o branqueamento de um material linhocelulósico que utiliza um tratamento com oxigénio e um tratamento enzimático com xilanase.

O material linhocelulósico numa forma fibrosa tem uma grande aplicação comercial como matéria prima para a produção do papel, cartão, cartão de construção, etc. A matéria prima é habitualmente a madeira cujos componentes principais são a celulose, e uma macromolécula tridimensional-linhina, que é considerada como estando inserida numa matriz de polissacáridos celulósicos e hemicelulósicos. É geralmente aceite que a ligação que existe entre os diferentes componentes é estabelecida através de ligações de natureza química diferente. Por exemplo, pensa-se que os blocos de linhina estão associados com cadeias de hemicelulose, sendo a hemicelulose outro componente do material linhocelulósico. Em madeiras duras, a hemicelulose predominante é o glucuronoxilano, que inclui um polímero de D-xilose, e que é de agora em diante referido como xilano.

Para produzir fibras para a produção de papel fortes e branqueáveis, o material linhocelulósico deve ser tratado de forma a remover a linhina, e normalmente, a parte inicial deste tratamento tem lugar num digestor na presença de substâncias químicas como por exemplo hidróxido de sódio e sulfito de sódio (para produzir uma polpa "kraft") ou sulfitos, geralmente de sódio ou magnésio, (para produzir uma pasta

de sulfito), obtendo-se assim pastas químicas. Considera-se a remoção da linhina como uma deslinhificação. O teor de linhina das pastas de madeira é medida por um ensaio de oxidação com permanganato de acordo com o Método Padrão da Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI) e que é referido por Número Kappa. A pasta química do digestor ainda contém uma quantidade apreciável de linhina residual nesta fase, e nalguns casos é adequado para produzir papel de construção ou de embalagem sem purificação adicional. Para a maior parte das aplicações, como a produção de papel de impressão, de escrita e sanitário, a pasta é, contudo, demasiadamente escura e deve ser clarificada por branqueamento. É nesta altura que o processo da presente invenção pode ser utilizado, isto é o processo do branqueamento do material linhocelulósico, sendo o material referido como pasta química. As fases iniciais de branqueamento também resultam numa deslinhificação adicional.

O processo convencional para a deslinhificação adicional e o branqueamento da pasta tem sido o de utilizar várias sequências de branqueamento de multi-fases, incluindo de qualquer forma 3 a 6 fases, ou passos, e com ou sem lavagem entre as fases. O objectivo a atingir no branqueamento é obter-se uma pasta, e no caso de pastas químicas, com uma brancura e com uma resistência suficientemente elevadas para a produção de papel e produtos de tecidos. Caracteristicamente, obtém-se pastas com uma brancura de 85% a 90% ISO. As pastas com brancura maior podem ser produzidas a partir de certos tipos de pasta não branqueada mas com custos superiores e com risco de existirem perdas da qualidade da resistência da pasta. O limite asinotótico da brancura que se encontra para um dado tipo de pasta nos processos convencionais de branqueamento é referido de agora em diante como limite de brancura. Este limite de brancura, acima do qual o processo de branqueamento adicional seria considerado demasiadamente prejudicial para a qualidade da pasta, demasiadamente caro, ou inatingível para certos materiais.

Tradicionalmente, as sequências do branqueamento têm sido baseadas na utilização de cloro e de compostos contendo cloro, de uma forma ou de outra. Alguns dos compostos contendo cloro que são utilizados são o cloro, designado por C, dióxido de cloro, designado por D, e hipocloritos, designados por H, geralmente o hipoclorito de sódio. O cloro, com ou sem mistura de dióxido de cloro, é vulgarmente utilizado para iniciar o branqueamento da pasta química, seguido por extração da

pasta tratada com cloro num meio alcalino aquoso, também designado por C-E. A carga de cloro (ou carga de cloro mais dióxido de cloro, sendo o dióxido de cloro expresso numa base equivalente oxidante de cloro) na fase C é proporcional ao teor de linhina (Número Kappa) da pasta a tratar. A fase de extracção alcalina é utilizada para solubilizar e remover uma parte importante da linhina residual clorada e oxidada, e também alguma hemi-celulose é removida.

Com o advento de regulações ambientais mais exigentes concebidas para diminuir os problemas de poluição da água e do ar associados com os compostos químicos de branqueamento contendo cloro, em ligação com os sistemas de recuperação complicados necessários para a remoção de produtos residuais contendo cloro, existe uma clara vantagem em reduzir e preferivelmente em evitar a utilização desses produtos químicos em processos do branqueamento. Além disso, se se fizer a reciclagem dos resíduos contendo cloro através de um sistema de recuperação de lixívia negra do processo Kraft, ocorrerá uma danificação do evaporador e do forno. Existirá um aumento de cloreto de sódio, provocando danos ao forno. Assim, a indústria da pasta e do papel tem dirigido as suas atenções para outros produtos químicos de branqueamento que podem evitar estes problemas.

Um dos avanços significativos na indústria nas últimas duas décadas tem sido associado com a utilização de oxigénio como agente deslinhificante e de branqueamento. Uma aplicação é a utilização de oxigénio em ligação com uma fase de extracção alcalina convencional, designada por Eo, seguido a uma cloração. A fase de extracção alcalina seguida de fase de cloração pode conter outros agentes oxidantes, como por exemplo peróxido (p) ou hipoclorito (h) em combinação com ou em vez de oxigénio. Essas fases são assim designadas por Epo, ho, Ep ou Eh, e são cada uma referidas geralmente com uma extracção oxidante.

A outra aplicação principal do oxigénio é, principalmente, a deslinhificação após o digestor de pasta e precedendo o branqueamento e designada por O. O oxigénio utilizado desta forma é utilizado numa pasta não branqueada num meio alcalino sob pressão. Embora o uso de oxigénio tenha proporcionado métodos alternativos para a deslinhificação e branqueamento, ele é apenas de uma utilidade limitada dado que afecta prejudicialmente o grau de polimerização da celulose, o que é

considerado uma desvantagem. O grau de polimerização da celulose é uma indicação da resistência da pasta e é medida como a viscosidade da pasta pelo Método Padrão TAPPI. Um critério necessário para a fase de branqueamento é de que a viscosidade da pasta resultante não seja muito diminuída. Geralmente, observa-se que apenas até 50% aproximadamente da linhina que permanece após o tratamento da pasta pode ser removida nesta fase com uma perda de viscosidade tolerável. Tentativas de maior deslinhificação nesta fase são feitas à custa de perdas adicionais de viscosidade. Sabe-se que a presença do ião magnésio nesta fase ajuda a minimizar estas perdas de viscosidade. As perdas ou redução da viscosidade da pasta são atribuídas ao aparecimento de modificações químicas (degradação) da celulose e de zonas de hemicelulose.

As aplicações que utilizam a deslinhificação pelo oxigénio têm contribuído para uma redução na utilização de compostos contendo cloro em sequência de branqueamento dado que a carga química na fase de cloração é baseada no teor de linhina da pasta, e este teor de linhina é substancialmente reduzido (cerca de 40% a 50%) por deslinhificação pelo oxigénio.

Têm sido estudadas enzimas para a sua utilização no tratamento do material linhocelulósico. Por exemplo, as enzimas lignolíticas, particularmente os fungos branco-vermelhos, são conhecidos como degradando a linhina em vários graus. Além disso, sabe-se bem que as enzimas celulases degradam a celulose e têm interesse comercial na indústria alimentar e na preparação de alcoois. Na produção de pasta para papel, o efeito de um enzima celulase pode ser prejudicial devido à diminuição resultante no grau de polimerização da celulose.

Atendendo ao componente hemicelulose do material linhocelulósico, têm sido feitos estudos sobre os efeitos da enzima xilanase nas pastas de madeira. A xilanase reage selectivamente de forma esperada com o xilano da hemicelulose.

O Pedido de Patente Francesa No. 2 557 894 (publicado em 1985) refere um processo para tratar papel kraft branqueado de madeira dura ou uma pasta química de sulfito branqueado de madeira macia com uma solução de enzima contendo xilanase para reduzir a quantidade de aquecimento ou refinação posterior necessária para a produção de papel. Eram necessárias quantidades particularmente grandes de enzima para o

tratamento da pasta branqueada de modo a obter-se o efeito pretendido. Além disso, a xilanase segregada pelo fungo basidiomiceta *Sporotrichum dimorphosporum* para utilização na redução da refinação, não era isento de celulase e a actividade prejudicial da celulase foi suprimida pela adição de cloreto mercúrio ao processo. Atendendo aos efeitos tóxicos conhecidos e outros efeitos prejudiciais associados com a exposição a compostos contendo mercúrio, a sua utilização não é aceitável.

Chauvet e col. (Proceedings of the International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Paris, p.325, 1987) referiram a utilização de uma preparação de xilanase obtida do fungo basidiomiceta *Sporotrichum dimorphosporum* para utilização no pré-tratamento de uma sequência do branqueamento de pasta química convencional, C/D-E-D-E-D. O complexo de enzima bruto é tratado com cloreto mercúrio para desactivar todas as actividades da polissacaridase, com a excepção da xilanase. O pré-tratamento da pasta compreendia um tratamento enzimático seguido de lavagem e imersão posterior numa solução ácida aquosa que resulta numa redução até 14% do número Kappa para a amostra de madeira dura. A resistência da pasta não é modificada.

A aplicação de xilanase em pasta kraft de madeira dura e madeira macia com o objectivo de aumento da brancura e melhor redução do número Kappa após tratamento químico posterior com peróxido de hidrogénio ou numa sequência de branqueamento é discutido por Viikari e col. (Proceedings of the International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Paris, 1987). As xilanases são obtidas por fermentação de uma estirpe de fungo da espécie *Aspergillus awamori* ou por fermentação das estirpes bacterianas de *Streptomyces olivochromogenes* ou *Bacillus subtilis*. As xilanases apresentavam actividades de xilanase e xiloxidase, com a excepção da xilanase da última bactéria que era isenta de xilosidade. As preparações de enzima contêm traços de actividade de celulose. Um ligeiro aumento de brancura de 1,0 a 3,4 pontos de brancura é observada com pastas de madeira dura ou madeira macia após um tratamento com peróxido de hidrogénio seguido de tratamento enzimático. Em muitos casos, as viscosidades resultantes da pasta foram conservadas ou apenas ligeiramente reduzidas. Não existe indicação no que se refere ao efeito do tratamento com enzima isolado nas propriedades da pasta.

Paice e col. (Biotech. and Bioeng., Vol. 32, p. 235-239, 1988) referem um tratamento de uma pasta de madeira dura não

branqueada por um tratamento sequencial de xilanase seguido de um tratamento com 1% em hidróxido de sódio na pasta. Este processo de duas fases proporcionava um aumento da brancura e uma redução no Número Kappa. Além disso, algum, mas não todo o aumento da brancura é mantido após um tratamento de branqueamento posterior C-E-D. Afirmava que a xilanase era isenta de celulose e era produzida por um clona *E. coli*.

Verificou-se, com surpresa, que a pasta química pode ser mais eficazmente deslinhificada e branqueada em sequências que incluem uma fase de deslinhificação com oxigénio e um tratamento com xilanase.

Assim, constitui um objecto da presente invenção proporcionar um processo para aumentar a extensão da deslinhificação de um material linhocelulósico sem provocar uma perda significativa adicional na viscosidade.

Constitui um objecto adicional da presente invenção proporcionar um processo para o branqueamento de um material linhocelulósico utilizando quantidades inferiores de agentes de branqueamento contendo cloro do que os convencionalmente utilizados, ou eliminar-se essencialmente a utilização de cloro elementar, proporcionando assim um processo mais aceitável do ponto de vista ambiental.

Constitui ainda outro objecto da presente invenção proporcionar um processo para a deslinhificação e branqueamento de um material linhocelulósico que aumenta efectivamente o nível de brancura do referido material.

Deste modo, num aspecto da presente invenção proporciona-se um processo para o branqueamento de material linhocelulósico possuindo ligações xilosídicas hidrolisáveis com xilanase, compreendendo o referido processo tratar-se o referido material linhocelulósico com

- (a) oxigénio ou um gás contendo oxigénio num meio alcalino, e
- (b) uma quantidade suficiente de xilanase substancialmente isenta de celulase para efectuar a hidrólise das referidas ligações xilosídicas hidrolisáveis no referido material, para proporcionar um material linhocelulósico branqueado.

No processo de acordo com a presente invenção, o

tratamento com xilanase pode preceder o tratamento com oxigénio ou com um gás contendo oxigénio. Na realização geralmente preferida do processo de acordo com a presente invenção o tratamento com oxigénio ou com um gás contendo oxigénio antecede o tratamento com a xilanase.

O tratamento do material lignocelulósico com oxigénio ou com um gás contendo oxigénio é efectuado num material em pasta em suspensão aquosa com uma concentração escolhida na gama de cerca de 3% a cerca de 35% em peso, preferivelmente de cerca de 10% a cerca de 30% em peso, com oxigénio, ou com um gás contendo oxigénio a uma pressão parcial de oxigénio de cerca de 207-1724 kN/m² barométrica, particularmente cerca de 276-1034 kN/m² barométrica e a uma temperatura na gama de cerca de 70°C a cerca de 170°C, preferivelmente entre cerca de 100°C e cerca de 150°C, sendo ainda mais preferível de cerca de 110°C a cerca de 130°C, durante um período de cerca de 10 a cerca de 90 minutos, preferivelmente de cerca de 20 a cerca de 60 minutos.

O gás contendo oxigénio utilizado no processo será geralmente o ar. A utilização do ar requere pressões maiores do que com o oxigénio. Por exemplo o ar será utilizado a pressão de 1034-1724 kN/m² barométrica, enquanto o oxigénio é eficaz a pressões de 207-1034 kN/m² barométrica. Além disso, pode deixar formar-se o oxigénio gasoso localmente. O oxigénio pode ser fornecido pela decomposição do peróxido de hidrogénio, e podem utilizar-se activadores como por exemplo o dióxido de azoto no tratamento com oxigénio.

O tratamento com oxigénio ou com um gás contendo oxigénio é efectuado na presença de 1% a 20% em peso com base no referido material) de uma base alcalina ou alcalino-ferrosa. De preferência, a base é hidróxido de sódio e é utilizada numa proporção na gama de 1% a 10% em peso.

Pode adicionar-se um conservante da viscosidade como por exemplo ião de magnésio numa proporção na gama de 0,05% a 1,0% em peso no tratamento com oxigénio tal como acima definido. Os compostos contendo magnésio adequados incluem sulfato de magnésio, óxido de magnésio, carbonato de magnésio, e hidróxido de magnésio. Outros aditivos adequados para conservar a viscosidade podem compreender agentes complexantes como por exemplo fosfonatos de aminoalquilo e policarboxilato de poliamino.

O tratamento do material linhocelulósico com xilanase substancialmente isenta de celulase é efectuado a uma concentração de 1% a 20% em peso preferivelmente, 2% a 12% a uma concentração de xilanase, na gama de 1 a 500 UI/ml a uma temperatura na gama de 20°C a 80°C durante um período de 1 a 48 horas. A temperatura é preferivelmente de cerca de 50°C. Além disso, o tratamento é efectuado em meio aquoso a um pH de cerca de 4 a cerca de 8. O meio é opcionalmente tamponado para controlar o pH. Os tampões adequados incluem mas não se limitam a tampão de acetato e tampão de acetato/citrato.

No processo de acordo com a presente invenção, a xilanase é caracterizada como sendo substancialmente isenta de celulase. Pelo termo "substancialmente isenta de celulase" pretende significar-se que não existe celulase suficiente presente na reacção para efectuar a hidrólise desfavorável das ligações glucosídicas. Esta hidrólise seria prejudicial e indesejável no tratamento do material linhocelulósico para o objectivo de melhorar as propriedades do referido material de acordo com o processo da presente invenção aqui definido. A quantidade de celulase que pode ser tolerada depende do objectivo particular da prática desta invenção.

Numa característica do processo de acordo com a presente invenção, o tratamento com oxigénio e o tratamento com a xilanase é feito tal como atrás definido acompanhado por um ou mais tratamentos adicionais escolhidos no grupo consistindo em

- (i) tratamento em meio aquoso com cloro, dióxido de cloro ou suas misturas,
- (ii) tratamento em meio aquoso com dióxido de cloro,
- (iii) tratamento em meio aquoso alcalino com um peróxido,
- (iv) tratamento em meio aquoso com hipoclorito,
- (v) tratamento em meio aquoso com ozono,
- (vi) tratamento em meio aquoso com dióxido de azoto.

O ou os referidos tratamentos adicionais podem anteceder os tratamentos com oxigénio e com xilanase, ou podem ser utilizados como tratamentos de intervenção entre os tratamentos com oxigénio.

nio e com xilanase, ou podem seguir-se aos tratamentos com oxigénio e com xilanase, ou podem ser utilizados numa combinação destes tratamentos alternativos.

De preferência, no processo de acordo com a presente invenção, o ou os referidos tratamentos adicionais sucedem aos tratamentos com oxigénio e com xilanase.

Numa característica adicional do processo de acordo com a presente invenção, o referido processo compreende ainda tratar-se o referido material linhocelulósico branqueado resultante de pelo menos os tratamentos com oxigénio e com xilanase como atrás descrito com um tratamento adicional escolhido no grupo consistindo

- (i) extracção em meio aquoso com uma base alcalina, e
- (ii) extracção oxidante em meio aquoso com uma base alcalina.

Prefere-se que os tratamentos com oxigénio e com xilanase sejam seguidos por tratamentos adicionais compreendendo em sequência

- (i) tratamento em meio aquoso com cloro, dióxido de cloro ou suas misturas,
- (ii) extracção ou extracção oxidante em meio aquoso com uma base alcalina, e
- (iii) tratamento em meio aquoso com dióxido de cloro.

Numa realização adicional preferida, os tratamentos com oxigénio e com xilanase são seguidos por tratamentos adicionais compreendendo em sequência

- (i) tratamento em meio aquoso com dióxido de cloro, e
- (ii) tratamento em meio aquoso alcalino com peróxido de hidrogénio.

Deve notar-se que no processo de acordo com esta realização preferida da presente invenção, bem como no processo de acordo com as características e realizações preferidas acima descritas, o tratamento com xilanase pode anteceder o tratamento com oxigénio a menos que se diga o contrário.

Num aspecto adicional, a presente invenção proporciona um material linhocelulósico branqueado produzido pelos processos acima definidos.

Na prática do processo da presente invenção os tratamentos adicionais são conhecidos na técnica do branqueamento de pastas, quer individualmente quer em muitos casos em sequência, e podem ser efectuados de qualquer forma razoável tal como é convencionalmente praticado ou conhecido. Os processos preferidos da presente invenção para a produção de pasta branqueada incluem as sequências definidas por O-X-C/D-E-D, (em que X representa o tratamento com xilanase e C/D designa o tratamento com cloro, dióxido de cloro ou suas misturas), e a fase de extracção (E) é opcionalmente uma extracção oxidante tal como acima definido. Alternativamente, o processo pode ser definido pela sequência O-X-D-P, em que não se inclui qualquer tratamento com cloro elementar. Pela natureza da produção de dióxido de cloro, existe muito frequentemente cloro presente, que não necessita de ser removido, e que não é prejudicial para o processo da presente invenção.

A xilanase a utilizar na prática da presente invenção é substancialmente isenta de celulase e é obtida pela fermentação de qualquer microorganismo produtor de xilanase adequados como por exemplo as bactérias produtoras de xilanase. O microorganismo pode ser uma estirpe de ocorrência natural, ou um seu mutante, ou uma estirpe produzida por engenharia genética, isto é uma estirpe recombinante, para aumentar a produção da xilanase e/ou para produzir uma mistura de xilanase mais pura, por exemplo substancialmente isenta de celulase.

De preferência, obtém-se a xilanase substancialmente isenta de celulase a partir de um microorganismo da espécie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ou do género *Streptomyces*, tendo sido os referidos microorganismos geneticamente modificados para apresentarem uma actividade de celulase substancialmente negativa. Mais preferivelmente, a xilanase é obtida substancialmente isenta da celulase a partir de um microorganismo contendo um gene recombinante da xilanase da espécie *Streptomyces lividans*.

Por exemplo, Mondue e col. (Gene, Vol. 49 (3), p. 323-329, 1987) descreve a preparação de um microorganismo geneticamente

modificado recombinante do género *Streptomyces* e a produção de xilanase substancialmente isenta de celulase a partir dele que é adequada para utilização na presente invenção. O microorganismo recombinante pode ser obtido pela introdução de um plasmídio híbrido numa estirpe mutante de um microorganismo hospedeiro do género *Streptomyces*, sendo a referida estirpe caracterizada por possuir uma actividade negativa de celulase, sendo o referido plamídio híbrido constituído pela inserção de um gene de xilanase num plasmídio vector adequado. O plasmídio híbrido é suscetível de indozir uma secreção extra-celular de xilanase isenta de celulase num microorganismo hospedeiro no qual se tenha introduzido o referido plasmídio. O plasmídio híbrido pode ser construído por qualquer processo convencional, como por exemplo por ligação, para a inserção do fragmento de ADN pretendido, o gene de xilanase, num plasmídio vector. O gene de xilanase pode ser obtido a partir da estirpe conhecida de *Streptomyces lividans* 1326. Um plasmídio vector adequado é o conhecido pIJ 702, que pode ser obtido a partir da *Streptomyces lividans* 3131.

O plasmídio híbrido pode ser introduzido no microorganismo hospedeiro por técnicas de fusão ou transdução ou transformação protoplástica.

Desta forma, numa realização preferida da presente invenção, a xilanase substancialmente isenta da celulase para utilização do tratamento com xilanase do material linhocelulósico é obtida por clonação homóloga de um gene de xilanase (xln) da *Streptomyces lividans* 66 (estirpe 1326). O gene de xilanase pode ser clonado pela complementação funcional da estirpe mutante dupla xilanase-negativa, celulase-negativa *Streptomyces lividans* 10-164 utilizando o plasmídio multicópia pIJ702. Este procedimento de clonação é totalmente descrito por F. Mondue e col. Gene 49 (3), p. 323-329 (1987) para proporcionar um dos clones de *Streptomyces lividans* IAF28.

O plasmídio hospedeiro pIJ702 da *Streptomyces lividans* 3131 está em depósito na "American Type Culture Collection" com o número de acesso APCC 35287. Foi feito um depósito de *Streptomyces lividans* 1326, e da estirpe mutante dupla *Streptomyces lividans* 10-164 no "National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited, Aberdeen, UK do Reino Unido em 8 de Fevereiro de 1990, com os números de acesso NCIMB 40257 e NCIMB 40258, respectivamente.

A expressão do gene de xilanase (xln) e a produção da xilanase a partir do clone de *Streptomyces lividans* IAF 18 em substratos naturais são descritos por J-L Bertrand e col., Biotechnol. Bioengineering, 33, p. 791-794 (1989). A purificação e propriedades da enzima xilanase obtida neste processo são descritas por R. Morosoli e col., Biochem. J. 239, p. 587-592 (1986).

Na fermentação do microorganismo produtor de xilanase é necessária uma fonte de carbono no meio de cultura que possa afetar a taxa de produção da xilanase. Por exemplo, na produção de uma xilanase substancialmente isenta de xilanase pela fermentação de um microorganismo recombinante da espécie *Streptomyces lividans*, o meio para utilização para fermentação pode conter feno, palha de trigo, milho seco, xilano e/ou grãos usados em destilarias como fontes principais de carbono, juntamente com outros tensioactivos adequados como por exemplo azeite e/ou Tween 80 (marca registada), como descrito por Kluepfel e col. Proceedings of the 6th. Canadian Bioenergy R & D Seminar, Vancouver, Canada (1987).

Quando uma mistura de enzima contendo xilanase também contém quantidades substanciais de celulase, a celulase é removida por qualquer processo conhecido para a purificação de xilanase, ou torna-se a celulase selectivamente desactivada por qualquer tratamento químico ou mecânico.

A xilanase pode ser aplicada tal e qual como produzida num caldo de fermentação, ou sob a forma de uma sua mistura concentrada, ou como mistura preparada a partir de uma mistura mais concentrada da xilanase ou de uma preparação seca de xilanase.

O tratamento com xilanase do material lignocelulósico de acordo com a presente invenção é efectuado com ou sem agitação. No final do período de tempo para o referido tratamento de xilanase, o material tratado resultante pode ser utilizado directamente ou espessado, e o referido material tratado pode ser em seguida utilizado para processamento adicional. Opcionalmente, inclui-se uma lavagem.

Numa característica adicional do processo da presente invenção, faz-se de preferência reciclar um filtrado contendo xilanase activa residual obtida de espessamento e/ou lavagem após o trata-

mento com xilanase por aplicação do referido filtrado ao material a tratar com xilanase.

O processo da invenção proporciona um produto branqueado possuindo uma brancura e viscosidade satisfatórias que é equivalente ou melhor do que o observado para as pastas branqueadas na mesma extensão por processos convencionais. Além disso, níveis de brancuras superiores podem ser praticamente conseguidos utilizando o processo acima descrito, enquanto que estes níveis de brancura podiam ser apenas conseguidos à custa de uma utilização de produtos químicos contendo elevados teores de cloro e/ou uma perda prejudicial da viscosidade.

O processo aqui descrito proporciona uma pasta branqueada utilizando quantidades inferiores de compostos contendo cloro, e a oportunidade de eliminar essencialmente a utilização de cloro elemental, reduzindo portanto o efluente poluidor de uma instalação de produção de pasta que utilize o processo.

O processo de acordo com a presente invenção proporciona a oportunidade de reciclar mais material orgânico do que o que é removido do material linhocelulósico de partida num processo de recuperação de uma instalação e reduz assim a carga poluidora do processo do branqueamento.

Nesta especificação todas as proporções e percentagens são em peso do material seco na estufa, a menos que se diga o contrário.

Os ensaios que caracterizam o material tratado desta invenção foram efectuados de acordo com as seguintes Normas.

Número kappa	Método TAPPI	T-236 M-76
Viscosidade	Método TAPPI	T-230 om-82
Brancura	Método TAPPI	T-452 om-83

A invenção é ilustrada adicionalmente pelos seguintes Exemplos mas o seu âmbito não é limitado às realizações apresentadas.

Os exemplos 1 e 2 descrevem a preparação do clone de *Streptomyces lividans* IAF19.

EXEMPLO 1

Extraiu-se o ADN cromossómico de *Streptomyces lividans* 66 (estirpe 1326) e efectuou-se a sua digestão parcial com *Sau3A*. Os fragmentos resultantes foram fraccionados num gradiente linear de 10 a 40% de sacarose. As fracções enriquecidas que continham fragmentos de 4 a 10 kb foram combinadas antes da precipitação com etanol. O plasmídio vector pIJ702, obtido de *Streptomyces lividans* 3131, foi submetido a digestão para se transformar completamente em *BglIII* e a enzima foi removida por extração de fenz-clorofórmio. O plasmídio foi precipitado com etanol e desfóforilado como descrito por Kendall e Cullum (Gene; 29, 315 (1984)). Para ligação, tratou-se uma mistura de fragmentos de ADN de *Streptomyces lividans* cromossómico parcialmente digerido e pIJ702 desfosforilado numa proporção de 5:1 como 0,1 unidades de T4 ADN liga-se durante a noite à temperatura ambiente a uma concentração de 37,5 μ g/ml.

A *streptomyces lividans* 1326 foi submetida a mutação utilizando a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Delic e col., Mutant Res.; 9, 167 (1970) e escolheu-se um duplo mutante β -1,4-D-glucano glucanohidrolase (endocelulase)-negativa e xilanase-negativa. Selecionou-se o duplo mutante num meio mínimo sólido contendo 1% de carboximetilcelulose como fonte principal de carbono. A visualização da actividade de endocelulase foi efectuada por revelação com o Vermelho do Congo de acordo com Teather e Wood, op. cit. A detecção dos mutantes xilanase-negativos foi efectuada da mesma maneira substituindo a carboximetil celulose por 1% de xilano de aveia. Verificou-se que a coloração de Vermelho de Congo era também aplicável para a detecção da actividade de xilanase. Em ambos os casos, foi tomada a ausência de descoloração como indicação para a ausência da produção de enzima. A dupla mutante *Streptomyces lividans* 10-164 era muito estável, e parecia dar a maior eficiência de transformação e foi assim escolhida como o microorganismo hospedeiro mais preferido para o desenvolvimento do sistema de expressão.

A produção de protoplastas e transformação da dupla mutante *Streptomyces lividans* 10-164 foi efectuada como descrito por Chapter e col. (Curr. Topics Microbiol. Immunol.; 97, 69 (1982)). Colocaram-se os protoplastos transformados em placas em meio R5 suplementado para a expressão de melamina e cobriram-se com 3 ml de meio R5 contendo 0,6% de ágar a 42°C. Escolheram-se os transformantes pela resistência

ao tiostrepton após 16 horas a 30°C de acordo com o procedimento de Kendall e Cullum, op. cit. (1984). O escrutínio dos clones xilanase-positivos foi efectuado utilizando um meio mínimo suplementado com RBB-xilano que foi preparado de acordo com Biely e col. (Anal. Biochem.; 144, 142 (1985)). As colónias que produziam xilanase, hidrolisavam este substrato criando zonas transparentes.

Escolheram-se dois clones produtores de xilanase e designaram-se por *Streptomyces lividans* IAF18 e IAF30. A análise por electroforese com gel de agarose do material de ADN plasmídico encontrado na *Streptomyces lividans* IAF18 e IAF30 demonstrou que todos os plasmídios encontrados eram maiores do que PIJ702, isto é, os plasmídios pIAF18 e pIAF30 tinham inserções de 5,7 e 6,7 kb, respectivamente. Estes plasmídios híbridos foram utilizados para retransformar o mutante duplo *Streptomyces lividans* 10-164. Em todos os casos, 100% dos transformantes eram positivos para a actividade enzimática previamente medida indicando que o presumível gene de xilanase (*xln*) estava ligado a plasmídio. O mapeamento de restrição dos plasmídios pIAF30 revelou uma discrepância entre as duas inserções no que se refere aos sítios de restrição. Contudo, o ensaio de revelação de Southern, utilizando como sonda o fragmento de restrição BamHI-SphI interno à inserção pIAF18 mostrou que cerca de 2kb de ADN eram comuns às duas inserções.

A expressão do gene *xln* foi estudada por culturas submersas dos diferentes clones em TSB (caldo de soja tripticase) e em meio de xilano e comparado com estirpe de tipo selvagem de *Streptomyces lividans* 1326 e 3131. O meio de xilano, referido como M13, consiste em: xilano (de pedaços de cevada; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) 10g; (NH4)2SO4, 1,4 g; K2HPO4, 2,5 g; KH2PO4, 1,0 g; extracto de fungo (Difco), 2 g; proteose peptona (Difco), 1 g; MgSO4, 7H2O, 0,3 g; Tween 80, 2 ml; e 1 ml de uma solução de traços de metal contendo CoCl2.6H2O (200 mg), FeSO4.7H2O (500 mg), MnSO4.H2O (160 mg) e ZnSO4.7H2O (140 mg), todos dissolvidos em 100 ml de água destilada acidificada a pH3. escorreu-se uma temperatura de incubação de 34°C dado que ela produzia uma boa velocidade de crescimento para a actividade de xilanase (Kluepfel e col., Appl. Microbiol. Biotechnol.; 24, 230 (1986)). Os resultados são apresentados na Tabela 1 para 48h e 72h de incubação.

TABELA I

A actividade é expressa em UI/ml de filtrado de cultura.

Estirpe ou Clone	Actividade de xilanase em IU ^a			
	T S B		Meio de xilan	
	48 h	72 h	48 h	72 h
1326	0	0	3.1	5.8
3131	0	0	3.7	6.3
IAF18	4.4	4.5	293.0	380.0

O ensaio para a xilanase foi efectuado por incubação de 1 ml de solução de enzima adequadamente diluído em tampão McIlvain 0,1 M pH 6,0 com 1 ml de uma suspensão aquosa de 1% de xilano a 60°C durante 10 min. A reacção foi terminada pela adição de 2 ml do reagente ácido de dinitro-salicílico e por aquecimento durante 15 min. em água ebulliente. A quantidade de açúcares redutores libertados foi determinada com D-xilose como padrão. Os padrões de comparação consistiam numa suspensão de xilano de 1 ml incubada do mesmo modo a que se adicionaram 2ml de solução do ácido dinitro-salicílico e 1 ml de enzima.

A estirpe de tipo selvagem, quer contivesse o plasmídio pIJ702 ou não, não produzia actividade de enzima quando cultivada em TSB e os níveis produzidos do meio de xilano variavam entre 3 e 6 UI/ml de filtrado de cultura. Os clones IAF18 e IAF30 apresentavam actividade significativa em TSB(0,9-4,5 UI/ml) mesmo na ausência de qualquer indutor. Os clones IAF18 e IAF30 crescidos no meio de xilano produziam níveis muito elevados de xilanase, por exemplo IAF18 atingia 380 UI/ml. Na fracção intracelular de todas as culturas, apenas se detectaram quantidades traço de actividade de xilanase, indicando uma eficiente secreção.

Os concentrados sobrenadantes das culturas de es-

tirpe *Streptomyces lividans* 3130, e os clones IAF18 e IAF30 após indução com xilano foram analisados para determinar a xilanase segregada por SDS-9% PAGE após revelação com o Azul de Coomassie. Os produtos semelhantes a xilanase de todos estes clones tinham valores estimados de Mr de 43 000. Este valor correspondia exactamente ao valor de Mr da xilanase pura nativa isolada de *Streptomyces lividans* 1326 (Morosoli e col., 1986) indicando que ambos os clones tinham inserções que codificavam pelo menos para o gene estrutural completo. Além disso, a identidade destas proteínas foi confirmada imunologicamente nos ensaios de revelação de Western utilizando anticorpos de antixilanase.

EXEMPLO 2

Investigou-se a estabilidade genética de *Streptomyces lividans* IAF18 ensaiando a produção da enzima em TSB e no meio M13 contendo 1% de xilano (como acima definido) ambos na presença e ausência de tiostrepton. Em ambos os meios, os teores de enzima obtidos permaneciam constantes durante pelo menos 10 transferências consecutivas e não foram afectados pela ausência do antibiótico. O gene multicópia foi observado em TSB com cerca de 2 UI/ml que foram constantemente mediados após 24h e atingindo 10 UI/ml após 48 horas. Este nível de produção permanecia estável durante vários dias e podia ser explicado pela estabilidade da enzima a 34°C.

A adição de glicose ao meio M13 mostrava claramente a repressão catabólica e a produção de enzima começava quando este açúcar era consumido, enquanto a xilose como fonte principal de carbono no mesmo meio produzia um nível de xilanase extracelular de 800 UI/ml tal como obtido utilizando apenas xilano, como se mostra na Tabela 2.

TABELA 2

Fonte de carbono	Actividade (IU/ml)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1% xilano	143	564	782	957	1233
1% xilano + 1% glicose	0	48	462	888	1085
1% xilose	217	652	672.0	991	1216

A Tabela 3 mostra uma comparação da produção de enzima entre a estirpe de tipo selvagem *Streptomyces lividans* 1326 e o clone *Streptomyces lividans* IAF18 no meio M13 contendo 1% e 2% de xilano. O primeiro produzia 28UI/ml com ambas as concentrações enquanto o último segregava 1300 e 1600 UI/ml de xilanase respectivamente.

TABELA 3

Estirpe e concentração de xilano	Actividade (IU/ml)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
<u>S. lividans</u> 1326					
1% xilano	14	29	30	29	29
2% xilano	8	23	26	27	27
<u>S. lividans</u> IAF18					
1% xilano	84	576	898	1150	1342
2% xilano	154	784	1207	1408	1604

EXEMPLO 3

Proporciona-se o seguinte exemplo de uma sequência C/D-E-D-E-D com o objectivo de comparação com sequências de acordo com a presente invenção.

Branquearam-se 150 gramas com base seca em estufa, de uma pasta de papel kraft de madeira dura não branqueada com o Número Kappa 14,1, viscosidade 49,1 mPa.s e brancura de 34,3% ISO por uma sequência de branqueamento convencional C/D-E-D-E-D. As cargas químicas foram as seguintes:

fase C/D: 2,81% cloro, 0,12% dióxido de cloro a 50°C durante 30 minutos na pasta a 3,0% de concentração.

fase E1: 1,56% de hidróxido de sódio a 70°C durante 60 minutos na pasta com 10% de concentração

fase D1: 0,8% de dióxido de cloro, 0,45% de hidróxido de sódio a 70°C durante 3 horas com a concentração de 6,0%.

fase E2: 0,4% de hidróxido de sódio a 70°C durante 60 minutos na pasta com 10% de concentração.

fase D2: 0,1% de dióxido de cloro a 70°C durante 3 horas na pasta com concentração de 6,0%.

A pasta após a fase final do dióxido de cloro tinha as seguintes propriedades:

Brancura	90.0% ISO
Viscosidade	31.9 mPa.s

EXEMPLO 4

Proporciona-se o seguinte exemplo de uma sequência C-C/D-E-D com o objectivo de comparação com sequências de acordo com a presente invenção.

Combinaram-se 150 gramas, com base seca em estufa, de uma pasta de papel kraft de madeira dura não branqueada com o Número Kappa de 14,1 viscosidade 49,1 mPa.s e brancura 34,3% ISO, com 2,5% de hidróxido de sódio e água suficiente para se obter uma concentração de 10% agitando num misturador de Hobart. A pasta foi em seguida transferida para um reactor de oxigénio com concentração média. No reactor tratou-se a pasta com oxigénio gasoso a uma pressão de 414 KN/m² barométrica a uma temperatura de 100°C durante um período de 60 minutos. Verificou-se que a pasta tinha um pH final de 11,4. Após diluição para uma concentração de 4%, filtrou-se a pasta, lavou-se com água a 1% de con-

centração e filtrou-se de novo. A pasta lavada tinha as seguintes propriedades:

Número Kappa	8,3 (41% inferior ao não branqueado)
Viscosidade	25,6 mPa.s
Brancura	50,1% ISO

A pasta tratada com oxigénio foi em seguida branqueada C/D-E-D, sendo as cargas químicas e as condições de processo as seguintes:

fase C/D: 1,65% de cloro, 0,07% de dióxido de cloro a 50°C durante 30 minutos em pasta com concentração de 3,0%.

fase E: 0,82% de hidróxido de sódio a 70°C durante 60 minutos em pasta com concentração de 10%.

fase D: 0,25% de dióxido de cloro, 0,05% hidróxido de sódio a 70°C durante 3 horas em pasta com concentração de 6,0%.

A pasta branqueada pela sequência C/D-E-D tinha as seguintes propriedades:

Brancura	89,9% ISO
Viscosidade	18,9 mPa.s

EXEMPLO 5

Proporciona-se o seguinte exemplo de uma sequência X-C/D-E-D com o objectivo de comparação com sequências de acordo com a invenção. A fase de tratamento com xilanase será designada por "X" nas sequências.

Trataram-se 50 gramas da pasta de papel kraft de madeira dura não branqueada do Exemplo 3, com o Número Kappa 14,1, Viscosidade 49,1 mPa.s e brancura de 34,3% ISO com xilanase isenta de celulase obtida do clone acima referido *Streptomyces lividans* IAF18 descritos nos Exemplos 1 e 2. O tratamento foi efectuado com pasta com 3% de concentração a 50°C durante 16 horas com agitação a 250 rpm em solução tamponada aquosa 0,1 M de acetato de sódio, pH 5, a uma concentração

de xilanase de 150 UI/ml. Após o tratamento com enzima, filtrou-se a pasta, lavou-se até 1% de concentração e filtrou-se de novo. A pasta lavada tinha as seguintes propriedades:

Número Kappa	10,8 (23% inferior ao não branqueado)
Viscosidade	53,5 mPa.s
Brancura	40,1% ISO

A pasta tratada com xilanase foi em seguida branqueada pela sequência C/D-E-D. As cargas químicas e as condições foram as seguintes:

fase C/D: 2,14% de cloro, 0,09% de dióxido de cloro a 50°C durante 30 minutos na pasta com concentração de 3,0%.

fase E: 1,2% hidróxido de sódio a 70°C durante 60 minutos na pasta com concentração de 10%.

fase D: 1,0% de dióxido de cloro a 70°C durante 3 horas na pasta com concentração 6,0%.

A pasta branqueada pela sequência X-C/D-E-D tinha as seguintes propriedades:

Brancura	90,8% ISO
Viscosidade	30,3 mPa.s

EXEMPLO 6

O seguinte exemplo é proporcionado apenas para comparação.

A pasta de papel kraft de madeira dura não branqueada do Exemplo 4 foi submetida a um tratamento com oxigénio como no Exemplo 4. Tratou-se em seguida a pasta tratada com oxigénio nas condições de tratamento com xilanase como referido no Exemplo 5 com a exceção de não estar presente qualquer xilanase. A pasta foi em seguida filtrada, lavada com água até 1% de concentração e filtrada. A pasta lavada tinha as seguintes propriedades:

Número Kappa	8,0
Viscosidade	25,6 mPa.s
Brancura	52,5% ISO

Pode ver-se assim que a pasta tratada sequencialmente com tampão de oxigénio tinha o mesmo Número Kappa e características de viscosidade como a pasta tratada com oxigénio do Exemplo 4. O tratamento de tamponização não tinha essencialmente qualquer efeito nestas propriedades da pasta.

EXEMPLO 7

A seguir apresenta-se um exemplo de uma sequência O-X-C/D-E-D.

Submeteu-se a pasta de papel kraft de madeira dura não branqueada do Exemplo 4 a um tratamento com oxigénio como no Exemplo 4. A pasta tratada com oxigénio foi em seguida submetida a um tratamento com xilanase como no Exemplo 5. Após lavagem, a pasta tratada com oxigénio-xilanase tinha as seguintes propriedades:

Número Kappa	5,3 (62% inferior à não branqueada)
Viscosidade	2,6 mPa.s
Brancura	55,9% ISO

A pasta tratada com oxigénio-xilanase foi em seguida branqueada pela sequência C/D-E-D. As cargas químicas e condições foram as seguintes:

fase C/D: 1,05% de cloro, 0,044% de dióxido de cloro a 50°C durante 30 minutos na pasta com concentração de 3,0%.

fase E: 0,59% de hidróxido de sódio a 70°C durante 60 minutos na pasta com concentração de 10%.

fase D: 0,1% de dióxido de cloro, 0,05% de hidróxido de sódio a 70°C durante 3 horas na pasta com concentração de 6,0%.

A pasta branqueada pela sequência O-X-C/D-E-D tinha as seguintes propriedades:

Brancura	90,5% ISO
Viscosidade	25,7 mPa.s

O Número Kappa referido para o tratamento apenas com oxigénio no Exemplo 4 é de 8,3, o que é 41% mais baixo do que o Número Kappa da não branqueada. O Número Kappa para o tratamento apenas

com xilanase no Exemplo 5 é de 10,8, o que é 23% inferior ao Número Kappa da não branqueada. Por comparação, o tratamento sequencial com oxigénio-xilanase do Exemplo 7 proporcionava uma pasta com o Número Kappa de 5,3, o que é 62% inferior ao Número Kappa da não branqueada e demonstra totalmente o efeito sinérgico existente entre os dois tratamentos com base nas suas características individuais, o que se tomado como uma relação aditiva simples daria expectavelmente o Número Kappa de 6,4, o que corresponde a uma redução de 55%.

Além disso, a fase C/D, fase E e fase D das cargas químicas são cada uma significativamente diminuídas por branqueamento posterior da pasta tratada com O-X como se mostra no Exemplo 7 para uma sequência O-X-C/D-E-D, quando comparada com as cargas químicas necessárias para o branqueamento para uma brancura final comparável ou mesmo inferior em qualquer das sequências C/D-E-D-E-D, ou C-C/D-E-D ou X-C/C-E-D como se ilustra nos Exemplos 3,4 ou 5 respectivamente.

EXEMPLO 8

Apresenta-se a seguir um exemplo de uma sequência O-X-C/D-E-D.

A pasta de papel kraft de madeira dura não branqueada do Exemplo 4 foi submetida a um tratamento com xilanase como no Exemplo 5, seguido de um tratamento de oxigénio como no Exemplo 4. A pasta branqueada com X-O tinha as seguintes propriedades:

Número Kappa	5,3 (62% inferior à não branqueada)
Viscosidade	30,2 mPa.s
Brancura	62,3% ISO

A pasta tratada com X-O foi ainda branqueada pela sequência C/D-E-D. As cargas químicas e condições foram as seguintes:

fase C/D: 1,05% de cloro, 0,044% de dióxido de cloro a 50°C durante 30 minutos na pasta com concentração de 3,0%

fase E: 0,64% hidróxido de sódio a 70°C durante 60 minutos na pasta com concentração de 10%.

fase D: 0,15% de dióxido de cloro a 70°C durante 3 horas na pasta com concentração de 6%.

A carga branqueada pela sequência X-O-C/D-E-D tinha as seguintes propriedades:

Brancura	91,6% ISO
Viscosidade	21,8 mPa.s

O Número Kappa referido para a pasta tratada com X-O neste Exemplo 8 é o mesmo do obtido com a pasta tratada com X-O no Exemplo 7 e ilustra que o efeito sinérgico entre os dois tratamentos existe sempre seja qual for a ordem dos referidos tratamentos. Além disso, também se obtém uma brancura superior e uma viscosidade muito melhorada para esta pasta tratada com X-O quando comparada com o tratamento com O-X ou apenas tratamento com O.

Esta brancura final obtida com esta sequência X-O-C/D-E-D é de 91,6% ISO, o que ilustra o aumento efectivo do nível de brancura da pasta utilizando quantidades reduzidas de cloro e de compostos químicos de branqueamento contendo cloro e sem introduzir efeitos laterais indesejáveis.

EXEMPLO 9

Apresenta-se a seguir um exemplo de uma sequência O-X-D-E-D.

A pasta de papel kraft de madeira dura não branqueada do Exemplo 4 foi submetida a um tratamento com oxigénio como no Exemplo 4. A pasta tratada com oxigénio foi em seguida submetida a um tratamento com xilanase como no Exemplo 5. A pasta resultante tinha as seguintes propriedades:

Número Kappa	4,6 (67% inferior à não branqueada)
Viscosidade	24,1 mPa.s
Brancura	60,8% ISO

A pasta tratada com oxigénio-xilanase foi ainda branqueada pela sequência D-E-D, e as cargas químicas e condições foram as seguintes:

fase D1: 0,5% de dióxido de cloro, 0,25% de hidróxido de sódio, a 70°C durante 3 horas na pasta com concentração de 6,0%.

fase E: 0,3% de hidróxido de sódio a 70°C durante 60 minutos na pasta

com concentração de 10%.

fase D2: 0,1% de dióxido de cloro a 70°C durante 3 horas na pasta com concentração de 6,0%.

A pasta branqueada pela sequência O-X-D-E-D tinha as seguintes propriedades:

Brancura	90,3% ISO
Viscosidade	22,4 mPa.s

Este Exemplo 9 demonstra, de novo, o efeito sinérgico entre os tratamentos com oxigénio e com xilano, em que se consegue nesse caso uma redução de 67% do Número Kappa da não branqueada. Além disso, obtém-se uma melhor brancura com boa viscosidade após o tratamento com O-X.

O processo da presente invenção tal como ilustrado no Exemplo 9 proporciona a oportunidade de se obter numa maior brancura de pasta totalmente branqueada não utilizando cloro elementar e mantendo uma boa viscosidade com o que seria considerada pelo especialista, como relativamente baixa em cargas de dióxido de cloro.

EXEMPLO 10

Apresenta-se a seguir um exemplo de uma sequência O-X-D-F.

A pasta de papel kraft de madeira dura não branqueada do Exemplo 4 foi submetida a um tratamento com oxigénio como no Exemplo 4 seguido de um tratamento com xilanase como no Exemplo 5. A pasta branqueada com O-X tinha as seguintes propriedades:

Número Kappa	4,6 (67% inferior à não branqueada)
Viscosidade	24,1 mPa.s
Brancura	60,8% ISO

A pasta branqueada com O-X foi em seguida branqueada pela sequência D-F, sendo as cargas químicas e as condições as seguintes:

fase D: 1,0% de dióxido de cloro, 0,2% de hidróxido de sódio a 70°C durante 3 horas na pasta com concentração de 6,0%.

fase P: 0,1% de peróxido de hidrogénio, 0,25% de hidróxido de sódio a 70°C durante 60 minutos na pasta com concentração de 10%.

A pasta branqueada pela sequência O-X-D-F tinha as seguintes propriedades:

Brancura	90,9% ISO
Viscosidade	20,3 mPa.s

Neste caso, obteve-se uma pasta totalmente branqueada com superior brancura utilizando apenas quatro fases de tratamento, e de novo sem cloro elementar.

EXEMPLO 11

A pasta de papel kraft de madeira dura não branqueada do Exemplo 4 foi submetida a um tratamento sequencial O-X-C/D-E-D como referido no Exemplo 7 com a excepção de as cargas químicas finais da fase D serem de 0,5% de dióxido de cloro, 0,1% de hidróxido de sódio na pasta. A pasta branqueada com O-X-C/D-E-D tinha as seguintes propriedades:

Brancura	91,7% ISO
Viscosidade	25,1 mPa.s

O Exemplo 11 demonstra ainda as vantagens referidas no Exemplo 7 para o processo da presente invenção. Em particular, neste caso, o elevado grau de brancura obtido (91,7% ISO) a um bom nível de viscosidade (25,1 mPa.s)

EXEMPLO 12

A pasta de papel kraft de madeira dura não branqueada do Exemplo 4 foi submetida a um tratamento sequencial X-O-C/D-E-D como referido no Exemplo 8 com a excepção de se ter aplicado uma carga na fase final D de 0,08% de dióxido de cloro na pasta. A pasta branqueada com X-O-C/D-E-D tinha as seguintes propriedades:

Viscosidade	24,1 mPa.s
Brancura	60,8% ISO

O Exemplo 12 demonstra ainda as vantagens referi-

das no Exemplo 8 para o processo da presente invenção.

A fase de lavagem após o tratamento com xilanase como descrito no Exemplo 5 aírás referido é considerado opcional, mas recomenda-se geralmente que para a armazenagem prolongada da pasta tratada com enzima, a lavagem deve ser incluida, e a enzima deve ser desnaturada.

REIVINDICAÇÕES

- 1^a -

Processo para a preparação de um material linhoce-lulósico branqueado incluindo uma fase de se tratar material linhocelulósico contendo ligações xilosídicas hidrolisáveis com xilanase, com uma quantidade suficiente de xilanase para se efectuar a hidrólise das referidas ligações xilosídicas hidrolisáveis, caracterizado por a xilanase ser substancialmente isenta de celulase e o referido processo incluir uma fase de se tratar o referido material linhocelulósico, antes ou depois do tratamento com a referida xilanase, com oxigénio, ou com um gás contendo oxigénio, num meio alcalino.

- 2^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido material linhocelulósico ser tratado em suspensão aquosa com uma concentração de 3 a 35% em peso, com oxigénio ou com um gás contendo oxigénio, a uma pressão parcial de oxigénio de 207 a 1724 kN/m², entre 70 e 170°C durante 10 a 90 minutos.

- 3^a -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado por o referido material linhocelulósico ser tratado em suspensão aquosa com uma concentração de 1 a 20 em peso com 1 a 500 UI/ml de xilanase entre 20 e 80°C durante 1 a 48 horas.

- 4^a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado por o referido material linhocelulósico ser também submetido a pelo menos um dos seguintes tratamentos:

tratamento em meio aquoso com cloro e/ou dióxido de cloro,
tratamento em meio alcalino na presença de um peróxido, e
tratamento em meio aquoso com hipoclorito, ozono, ou dióxido de azoto.

- 5^a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizado por se submeter o material linhocelulósico branqueado a uma extracção, ou extracção com oxidação, em meio aquoso com base alcalina.

- 6^a -

Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por após os tratamentos com xilanase e oxigénio, ou com um gás contendo oxigénio, se tratar o material linhocelulósico em meio aquoso com cloro e/ou dióxido de cloro, e em seguida se submeter a extracção, ou extracção com oxidação, num meio aquoso com uma base alcalina, e em seguida se tratar em meio aquoso com dióxido de cloro.

- 7^a -

Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por após os tratamentos com xilanase e oxigénio, ou com um gás contendo oxigénio, se tratar o material linhocelulósico em meio aquoso com dióxido de cloro, e em seguida tratar-se em meio alcalino aquoso com peróxido de hidrogénio.

- 8^a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 7, caracterizado por se adicionar uma fase de lavagem ou uma fase de espessamento após o tratamento com xilanase para se obter um filtrado contendo xilanase residual activa que é reciclada por aplicação do referido filtrado ao material linhocelulósico a ser tratado com xilanase.

- 9^a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações

1 a 8, caracterizado por se obter a referida xilanase a partir de um microorganismo recombinante por introdução de um plasmídio híbrido numa estirpe mutante hospedeira de Streptomyces lividans possuindo uma actividade substancial negativa da celulase, sendo o referido plasmídio híbrido construído pela inserção de um gene de xilanase (xln) obtido a partir de Streptomyces lividans 66 no plasmídio vector pIJ702.

- 10^a -

Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por a referida estirpe hospedeira ser a estirpe mutante dupla Streptomyces lividans 10-164 possuindo uma importante actividade negativa da xilanase.

A requerente reivindica a prioridade do pedido norte-americano apresentado em 10 de Fevereiro de 1989, sob o número de série 308,529.

Lisboa, 9 de Fevereiro de 1990
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM MATERIAL
LINHOCELULÓSICO BRANQUEADO"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um material linhocelulósico branqueado incluindo uma fase de se tratar o material linhocelulósico contendo ligações xilosídicas hidrolisáveis com xilanase, com uma quantidade suficiente de xilanase para se efectuar a hidrólise das referidas ligações xilosídicas hidrolisáveis, que compreende o facto de a xilanase ser substancialmente isenta de celulose e o referido processo incluir uma fase de tratamento do referido material linhocelulósico, antes ou depois do tratamento com a referida xilanase, com oxigénio, ou com um gás contendo oxigénio, num meio alcalino.