

O grupo metóxi do ácido 4-O-metil-glucurônico é fundamental para a formação de ácido hexenurônico durante a polpação kraft

The methoxy group of 4-O-methyl-glucuronic acid is central for the formation of hexenuronic acid during kraft pulping

Autores/Authors*: Jiebing Li
Chao Shi
Mikael E. Lindström
Gunnar Henriksson

Palavras-chave: Ácido hexenurônico, branqueamento, eliminação- β , polpação kraft, árvore transgênica, xilana

Keywords: β -elimination, bleaching, hexenuronic acid, kraft pulping, transgenic tree, xylan

RESUMO

O ácido hexenurônico é formado a partir do ácido 4-O-metil-glucurônico – um grupo lateral na cadeia principal da xilana, uma das hemiceluloses mais importantes tanto em madeiras de folhosas como de coníferas – durante condições alcalinas, tal como a polpação kraft. Especialmente na celulose kraft de folhosas, o ácido hexenurônico corresponde a grande parte do número kappa, e a presença desse componente em celuloses branqueadas é causa de amarelamento posterior. Neste trabalho é demonstrado que ácido glucurônico com falta de um grupo metóxi no carbono-4 não produz ácido hexenurônico sob condições alcalinas na mesma amplitude do ácido 4-O-metil-glucurônico. Isso abre novas estratégias para a modificação genética das estruturas da hemicelulose em madeira cultivada para polpação kraft.

ABSTRACT

Hexenuronic acid is created from 4-O-methyl glucuronic acid – a side chain group in xylan, and one of the most important hemicelluloses in both hardwood and softwood - during alkaline conditions, such as kraft pulping. Especially in hardwood kraft pulp, hexenuronic acid corresponds to a large part of the kappa number, and the presence of this component in bleached pulp causes post yellowing. In this work it is shown that glucuronic acid that lacks a methoxy group on the 4-carbon does not form hexenuronic acid under alkaline condition to the same extent as 4-O-methylglucuronic acid. This opens up novel strategies for genetic modification of the hemicellulose structures in wood cultivated for kraft pulping.

INTRODUÇÃO

Árvores cultivadas para a produção de celulose, papel e madeira serrada são adaptadas – ou modificadas - em grau muito menor do que aquele praticado em culturas da agricultura tradicional como arroz, trigo e milho. São várias as explicações para isso; uma seria que os tempos de geração

INTRODUCTION

Trees cultivated for the manufacture of pulp, paper and sawn timber are domesticated to a much lesser extent than normal agriculture crops like rice, wheat and corn. There are several explanations for this; one is that the generation times for trees are typically

*Referências dos autores / Authors' references:

Centro Wallenberg de Ciência da Madeira, Departamento de Tecnologia da Fibra e Polímero, Real Instituto de Tecnologia, KTH 10044, Estocolmo, Suécia
Wallenberg Wood Science Centre, Department of Fiber and Polymer Technology, Royal Institute of Technology, KTH 100 44, Stockholm, Sweden

E-mail: ghenrik@pmt.kth.se

de uma árvore são tipicamente longos e, por isso, o desenvolvimento de mudas seria mais difícil do que aquele para gramíneas. Outra razão seria que madeira de alta qualidade existe em florestas nativas de algumas regiões, como o Canadá, e com isso os motivos para a adaptação teriam sido menores. Ainda assim, com o desenvolvimento de plantação em viveiros, por exemplo, dos gêneros *Eucalyptus* e *Acacia* e silvicultura programada de pinus a abetos, foi estabelecida uma cultura clássica de árvores para produção de madeira, o que tem levado a rendimentos significativamente maiores (Young, 1990). A modificação genética de árvores é uma possibilidade interessante para acelerar esse processo. Mediante a alteração de genes de plantas tem sido possível melhorar alguns aspectos, tais como a taxa de crescimento e a resistência a pesticidas (Peña e Séguin, 2001). Um conceito muito atraente seria alterar a estrutura química de polímeros da madeira de modo a melhorar a polpação química. Na polpação química a madeira é processada com uma mistura de NaOH e NaSH (polpação kraft), ou uma solução neutra ou ácida de sais sulfito (polpação sulfito), que despolimerizam a lignina tornando-a solúvel. O processo é continuado até que a lignina da lamela média seja degradada até o ponto em que as fibras possam ser facilmente apartadas uma das outras. Contudo, alguma lignina modificada remanescente, de coloração marrom, continuará na madeira, fazendo necessária sua remoção por branqueamento caso seja pretendido um produto branco (Gierer, 1980). Assim, uma estratégia para a modificação genética de madeira para polpação seria a alteração da estrutura da lignina, de modo que as reações de deslignificação durante a polpação e o branqueamento sejam melhoradas. Isso pode ser feito por supressão ou superexpressão de enzimas na síntese dos monômeros da lignina. Um exemplo disso poderia ser aumentar o número de unidades siringil da lignina acima de suas unidades guaiacil. A modificação genética da estrutura da lignina é relativamente fácil, pois esse polímero tem a rara possibilidade da plasticidade metabólica, devido ao fato de o estágio final de biopolimerização ser uma reação acoplada radical não-catalizada (Ralph *et al.*, 2008). Resulta possível, portanto, modificar a estrutura de parte dos monômeros na lignina, obtendo-se lignina com estrutura alterada mais facilmente passível de degradação durante a polpação química (Pilate *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2001).

Além da lignina, na polpação e branqueamento são também importantes estruturas derivadas de carboidratos. Entre essas, o 4-deoxy-L-threo-hex-4-ácido enopiranosidurônico (ácido hexenurônico, HexA) é provavelmente a mais importante. Essa estrutura é formada do ácido 4-O-metil-glucurônico, que é um grupo lateral na xilana, uma das principais hemiceluloses nas coníferas (*softwood*) e nas madeiras de eudicotiledóneas (folhosas) (Teleman *et al.*, 1995; Sjöström, 1992). Um mecanismo

long and thus organized breeding is more difficult than for herbs. Another reason is that wood of high quality is present in virgin forests in some areas, such as Canada, and thus the reason for domestication has been low. Nevertheless, with the development of nursery plantations, for instance Eucalyptus and Acacia genus, and organized forestry of pines and spruces, a classical breeding of trees for wood production has been established, which has led to a significantly higher production (Young, 1990). Genetic modification of trees is an interesting possibility to speed up this process. By altering the genes of trees, it has been possible to improve certain aspects, such as growing rate and resistance to pesticides (Peña and Séguin, 2001). A very interesting concept is to alter the chemical structures of wood polymers in order to enhance chemical pulping. In chemical pulping wood is treated with either a mixture of NaOH and NaSH (kraft pulping), or a neutral or acidic solution of sulphite salts (sulphite pulping), depolymerizing the lignin and making it soluble. The process is continued until the lignin in the middle lamella is degraded so much that the fibers are easily separated from each other. However, some remaining modified lignin, brown in color, remains in the wood, making necessary removal by bleaching if a white product is desired (Gierer, 1980). Thus, a strategy for genetic modification of wood for pulping is to alter the lignin structure, so that the delignification reactions during pulping and bleaching are enhanced. This can be done by suppression or over-expression of enzymes in the synthesis of the monomers of lignin. An example of this could be increasing the number of syringyl lignin units over guaiacyl units. Genetic modification of lignin structure is relatively easy, since this polymer has the unique possibility of metabolic plasticity, due to that the final stage of the biopolymerization is an uncatalyzed radical coupling reaction (Ralph, et al., 2008). Thereby, it is possible to change the structure of part of the monomers in lignin, obtaining lignin with an altered structure which can be more easily degraded during chemical pulping (Pilate et al., 2002; Chen et al., 2001).

*In addition to lignin, carbohydrate derived structures are also important in pulping and bleaching. Among these, 4-deoxy-L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid (hexenuronic acid, HexA) is probably the most important. This structure is formed during alkaline cooking from 4-O-methyl glucuronic acid, which is a side group on xylan, one of the main hemicelluloses in conifer- (*softwood*) and eudicotyledonous wood (*hardwood*) (Teleman et al., 1995; Sjöström, 1992). A sug-*

de reação proposto - uma eliminação- β - para a formação de HexA é mostrado na **Figura 1a**.

O HexA como tal é incolor, mas, ainda assim, é um componente problemático na celulose kraft. Em primeiro lugar, reage com a polpa, e com isso consome químicos de branqueamento tais como ClO_2 , O_3 e ácido peracético, levando a maiores custos de branqueamento (Ragnar e Lindström, 2002). Em segundo lugar, se HexA permanecer na polpa branqueada poderá reagir posteriormente formando produtos coloridos, o que causa amarelecimento da polpa branqueada – algo que constitui sério problema especialmente para polpas transportadas a longas distâncias antes de convertidas em papel (Sevastyanova *et al.*, 2006). Em terceiro lugar, HexA dá origem a compostos orgânicos clorados que, quando em reação com agentes de branqueamento baseados em produtos clorados (ClO_2 , Cl_2) e compostos cloro-orgânicos, podem se constituir em problemas ambientais (Björklund *et al.*, 2002). Em quarto lugar, o HexA tem forte poder de quelação para íons de metais de transição, o que interfere negativamente com várias operações de branqueamento por aumentar a demanda de químicos ou causar

gested reaction mechanism - a β -elimination - for the formation of HexA is shown in **Figure 1a**.

HexA is in itself colorless, but is nevertheless a problematic component in kraft pulp. Firstly, it reacts with and thus consumes bleaching chemicals such as ClO_2 , O_3 and peracetic acid, leading to increased costs of bleaching (Ragnar and Lindström, 2002). Secondly, if HexA is still remaining in the bleached pulp, it can react further to form colored products, giving rise to post yellowing of bleached pulp – something that is a large problem especially for pulps that are transported long way before papermaking (Sevastyanova *et al.*, 2006). Thirdly, HexA generates chlorinated organic compounds which, when reacted with chlorine based bleaching agents (ClO_2 , Cl_2), and chloroorganic compounds, may represent environmental problems (Björklund *et al.*, 2002). Fourthly, HexA has a strong chelating capability for transition metal ions, which negatively interfere with various bleaching operations by an increased chemical consumption or decreased

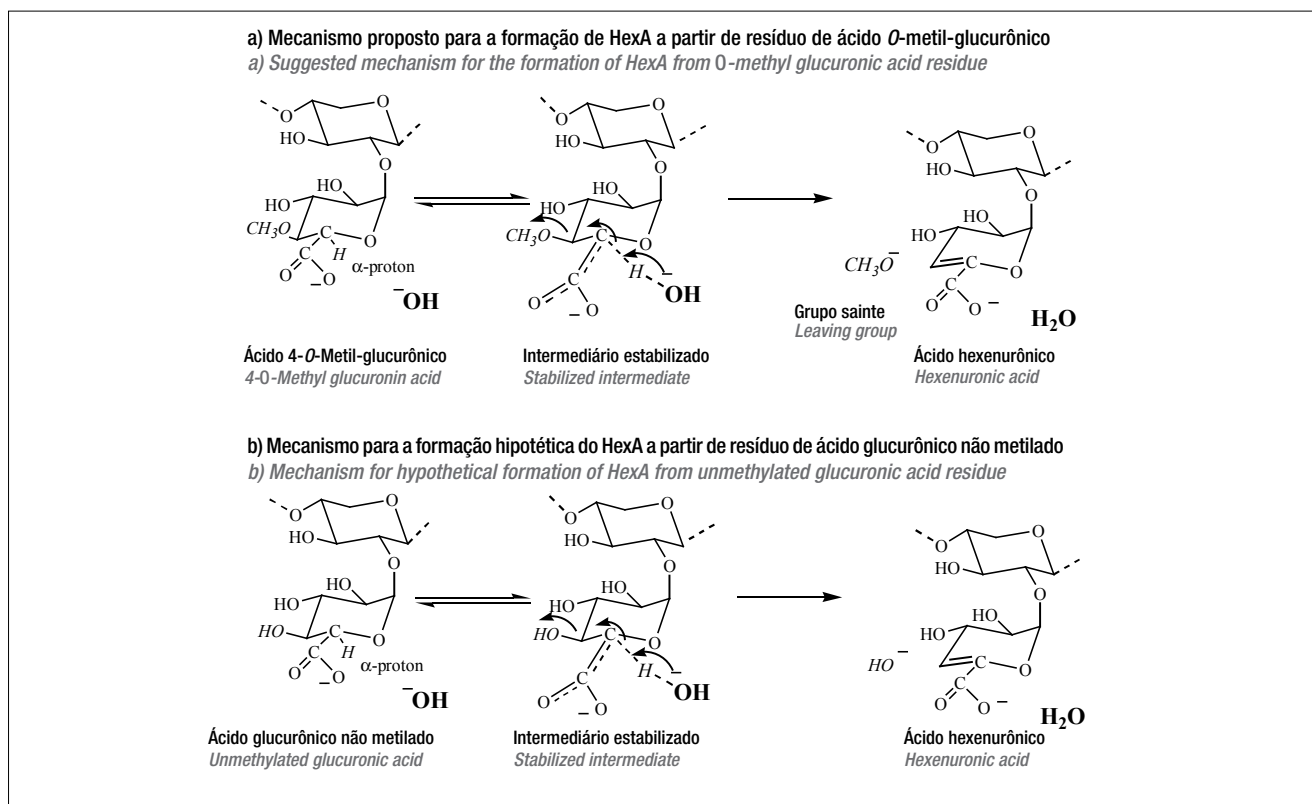


Figura 1a. Mecanismo proposto para a formação de HexA a partir de resíduos de ácido glucurônico sob condições alcalinas, tal como na polpação kraft. a) Formação a partir do ácido 4-*O*-metil-glucurônico, que é a estrutura natural. O carboxila na posição-6 estabiliza um intermediário, onde um próton no carbono-5 é removido por um íon hidroxila, com o íon metóxi sendo o grupo sainte. b) Hipótese da formação do HexA a partir da cadeia lateral do ácido glucurônico não metilado da xilana sob condições alcalinas. Essa reação é prevista como muito mais lenta do que a reação em a) devido ao fato de o íon hidroxila ser um grupo de saída mais difícil do que o íon metóxi / **Figure 1a.** Suggested mechanism for HexA formation from glucuronic acid residues under alkaline conditions, such as in kraft pulping. a) Formation from 4-*O*-methyl glucuronic acid, which is the natural structure. The carboxyl at the 6-position stabilizes an intermediate, where a proton at the 5-carbon is abstracted by a hydroxyl ion, and methoxy ion is the leaving group. b) Hypothetical formation of HexA from unmethylated glucuronic acid side chain of xylan under alkaline conditions. This reaction is expected to be much slower than the reaction in a) due to that the hydroxyl ion is a less good leaving group than the methoxy ion

perda de resistência da polpa (Vourinen *et al.*, 1996). Contudo, o HexA fornece cargas negativas às fibras da celulose, o que potencializa muitas propriedades, inclusive a própria resistência da polpa (Laine e Stenius, 1997).

O teor de HexA é frequentemente muito alto; em polpas kraft não branqueadas de folhosas o HexA é até mesmo responsável por parte do número kappa - um método para a medição de grupos oxidáveis em polpas químicas (Li e Gellerstedt, 1997) -, maior do que aquela da lignina residual. O HexA é também considerável contribuinte para o número kappa de polpas não branqueadas de coníferas (Li e Gellerstedt, 1997). Consequentemente, o HexA se constitui em problema especialmente para celuloses kraft de folhosas. Tem havido o desenvolvimento de métodos seletivos de branqueamento para a remoção de HexA, tal como a lavagem ácida quente (A*) e o branqueamento com xilanase (X) (Vuorinen *et al.*, 1997; Viikari *et al.*, 1991; Simenova *et al.*, 2006). Contudo, a remoção do HexA também tem consequências negativas, pois remove grupos carboxílicos e, com isso, cargas elétricas das fibras prejudicando as propriedades mecânicas dos produtos fabricados com a polpa. Estratégia melhor seria manter os grupos carboxílicos/cargas evitando a formação de ácido hexenurônico.

Neste trabalho utilizamos modelos estruturados para realizar cozimento alcalino simulado para polpação kraft a fim de comparação das cinéticas da formação de HexA entre ácido 4-*O*-metil-glucurônico e resíduos de ácido glucurônico. Com base nos resultados do estudo do modelo são discutidas estratégias de alteração do ácido 4-*O*-metil-glucurônico em ácido glucurônico para prevenção da formação de HexA durante o cozimento kraft.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Foram obtidos xilana de bétula (X-0502) da Sigma Aldrich, St Louis, Mo, EUA e sal de sódio do ácido 1-*O*-metil- β -glucurônico da Carbosynth Limited, Bershire, Reino Unido (**Figura 2**). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

pulp strength (Vourinen et al., 1996). On the other hand, HexA supplies negative charges to the pulp fibers, which contribute to many properties, including strength of the pulp (Laine and Stenius, 1997).

The content of HexA is often very high; in unbleached hardwood kraft pulp the HexA is even responsible for a larger part of the kappa number - a method for measuring oxidable groups in chemical pulps (Li and Gellerstedt, 1997) -, than the residual lignin. Further in softwood kraft pulps the HexA is a substantial contributor to the kappa number of unbleached pulp (Li and Gellerstedt 1997). Thus, the HexA represents a problem especially for hardwood kraft pulps. Bleaching methods selective for removal of HexA have been developed, such as hot acid washing (A) and xylanase bleaching (X) (Vuorinen et al., 1997; Viikari et al., 1991; Simenova et al., 2006). However, removal of HexA also has negative consequences, since it removes carboxylic groups, and thereby electrical charges from the fibers, negatively affecting the mechanical properties of the products made from the pulp. A better strategy would therefore be to keep the carboxylic groups/charges by preventing the formation of hexenuronic acid.*

*In this work we use model structures to perform a simulated alkaline cooking to kraft pulping for comparison of the kinetics of HexA formation between 4-*O*-methyl-glucuronic acid and glucuronic acid residues. Based on the results of the model study, strategies in altering 4-*O*-methyl-glucuronic acid into glucuronic acid to prevent the HexA formation during kraft cooking are discussed.*

MATERIALS AND METHODS

Materials

Xylan from birchwood (X-0502) was obtained from Sigma Aldrich, St Louis, Mo, USA and 1-*O*-methyl- β -glucuronic acid sodium salt was obtained from Carbosynth Limited, Bershire, UK (**Figure 2**). All of the chemical reagents used were of analytical grade.

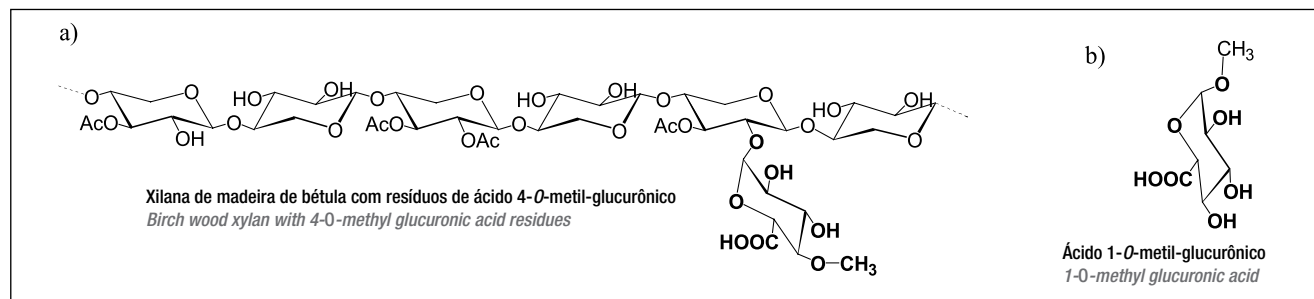


Figura 2. Estrutura dos componentes do modelo utilizado neste trabalho. Foi utilizada xilana de madeira de bétula com terminais redutores reduzidos (não indicados) e seu conteúdo natural de cadeias laterais (a) como modelo para o ácido 4-*O*-metil-glucurônico, enquanto o ácido 1-*O*-metil-glucurônico comercial (b) foi utilizado como composto do modelo para resíduos de ácido glucurônico sem éteres metanol na posição-4. O grupo 1-*O*-metil simula a ligação com a cadeia principal da xilana / **Figure 2.** Structure of model components used in this work. Birch wood xylan with reduced reducing end (not shown) and its natural content of side chains (a) was used as model for 4-*O*-methyl glucuronic acid, whereas the commercial chemical 1-*O*-methyl glucuronic acid (b) was used as model compound for glucuronic acid residues without methanol ethers at 4-position. The 1-*O*-methyl group simulates the link to the xylan main chain

Redução da xilana

Foi preparada suspensão de um grama de xilana em 25 mL de água deionizada. À mistura foram adicionados vinte e cinco mL com 2%/peso de NaBH_4 (borohidreto de sódio) em 1,0 mol/L de NaOH. Foi permitido processo de redução durante 1 h com agitação a temperatura ambiente seguida de eliminação do NaBH_4 e neutralização para pH 5 mediante adição de 5,7% de HCl. A xilana reduzida foi então isolada por centrifugação e secada.

Simulação de cozimento alcalino (kraft)

Em testes duplicados, amostras de 20 mg de xilana reduzida ou 2 mg de sal de sódio do ácido 1-*O*-metil- β -glucurônico foram dissolvidos em 1 mL de 1,0 mol/L de NaOH em tubos fechados de microcentrífuga. As amostras foram aquecidas a 120°C durante 5 – 250 min e em seguida feita determinação direta por UV para a detecção de HexA, e neutralização para pH 5 por adição de 5,7% de HCl para quantificação do HexA.

Detecção e quantificação do HexA

A mistura de reação foi medida diretamente por UV em 260 nm para detecção do HexA como descrito por Törngren e Gellerstedt (1997). A amostra neutralizada mencionada foi adicionada em 1 mL de solução de 60 mmol/L de HgAc_2 (acetato de mercúrio) com pH 5, seguida de quantificação do HexA por HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) com calibração por meio de celuloses kraft com teor conhecido de HexA, como descrito por Gellerstedt e Li (1996), e foram então calculados os resultados médios dos testes duplicados.

Quantificação do ácido 1-*O*-metil- β -glucurônico

Após neutralização, a mistura de reação foi acetilada utilizando anidrido acético com 1-metilimidazol como catalisador, segundo o método de Theander e Westerlund (1986), seguido de análise por GC (cromatografia de gás) utilizando coluna DB-5MS com hélio como gás transportador. A temperatura inicial foi de 150°C durante dois min, a seguir aumentada em 5°C/min até 230°C e aumento posterior de 25°C/min até os 330°C. Para calibração foi utilizada a amostra standard sólida acetilada por piridina e anidrido acético durante 1 hora a temperatura ambiente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quimicamente, o proton- α (ou seja, o próton ligado ao carbono-5) é relativamente reativo na cadeia lateral do ácido 4-*O*-metil-glucurônico natural devido à presença do grupo ácido carboxílico, e especialmente em condições alcalinas. Como mostrado na Figura 1, o grupo funcional carboxílico estabiliza um intermediário quando esse próton começa a ser removido por um íon hidroxila. O grupo metoxila, na

Reduction of xylan

One gram of xylan was suspended in 25 mL deionized water. Twenty five mL of 2wt/% NaBH_4 in 1.0 mol/L NaOH was added to the mixture. Reduction was allowed to proceed for 1 h with stirring at room temperature followed by destruction of NaBH_4 and neutralization to pH 5 by adding 5.7% HCl. The reduced xylan was then isolated by centrifugation and dried.

Simulation of alkaline cooking (kraft)

*In duplicated experiments, samples of 20 mg of reduced xylan or 2 mg of 1-*O*-methyl- β -glucuronic acid sodium salt were dissolved in 1 mL of 1.0 mol/L NaOH in closed microcentrifuge tubes. The mixtures were heated to 120°C for 5 – 250 min followed by a direct UV determination for HexA detection, and neutralization to pH 5 by adding 5.7% HCl for HexA quantification.*

HexA detection and quantification

The reaction mixture was directly measured by UV for HexA detection at 260 nm as described by Törngren and Gellerstedt (1997). The neutralized sample above was added in 1 mL of a pH 5 solution of 60 mmol/L HgAc_2 solution, followed by HPLC HexA quantification under calibration with kraft pulps with known HexA contents, as described by Gellerstedt and Li (1996), and the average results from the duplicated experiments were calculated.

Quantification of 1-*O*-methyl- β -glucuronic acid

The reaction mixture after the neutralization was acetylated using acetic anhydride with 1-methylimidazol as a catalyst, according to the method by Theander and Westerlund (1986), followed by GC analysis using a DB-5MS column with helium as carrier gas. The initial temperature was 150°C for 2 min and it was then increased at 5°C/min to 230°C followed by an increase at 25°C/min to 330°C. A direct acetylation of the solid standard sample by pyridine and acetic anhydride for 1 hour at room temperature was used for calibration.

RESULTS AND DISCUSSION

*Chemically, the α -proton (i.e., the proton bound to carbon 5) is relatively reactive in the native 4-*O*-methyl glucuronic acid side chain due to the presence of the carboxylic acid group, especially at alkaline conditions. As shown in Figure 1, the carboxylic functional group stabilizes an intermediate when this proton starts to be abstracted by a hydroxyl ion. The methoxyl group,*

posição- β , sairá na forma de íon metoxila, resultando na formação de HexA com estrutura de um α , β -insaturado (ligação dupla) (Figura 1). Nossa suposição é de que íons hidroxila - que deveriam ser o grupo a sair em uma hipotética formação de HexA a partir de ácido glucurônico não metilado -, sob as fortes condições alcalinas de um cozimento kraft serão um grupo com menor tendência à saída do que o íon metóxi, visto que o valor pKa da água é significativamente mais alto que aquele do metanol (15,74 e 15,20 respectivamente), e valores de pKa mais baixos têm normalmente melhor correlação com o grupo de maior tendência à saída. Em outras palavras, é presumível ser mais difícil obter ácido hexenurônico a partir de ácido glucurônico *sem* grupo metóxi na posição-4 do que a partir de ácido 4-*O*-metil-glucurônico.

Para averiguar quantitativamente essa hipótese, foi utilizada como modelo uma xilana de madeira comercial de bétula (Figura 2) contendo 12,6% de cadeias laterais de ácido 4-*O*-metil-glucurônico, como já antes determinado (Li *et al.*, 2007). Esse modelo, depois da redução do NaBH₄ para eliminar todos os grupos redutores finais - e com isso prevenir a reação de descascamento (Sjöström, 1992) que, de outro modo, poderia destruir substancialmente toda a estrutura da xilana -, foi incubado em 1 mol/L de NaOH a 120°C durante períodos de tempo variando de 5 a 240 min, e em seguida verificado quanto ao teor de ácido hexenurônico. Como pode ser visto na **Figura 3**, sob essas condições há uma óbvia formação de HexA, com absorção UV a um máximo de 260 nm pela amostra submetida a 240 min de incubação.

at the β -position, will leave as a methoxyl ion, resulting in the formation of HexA with an α , β -unsaturated (double bond) structure (Figure 1). Our hypothesis is that hydroxyl ions (that should be the leaving group in a hypothetical formation of HexA from unmethylated glucuronic acid) under the strongly alkali conditions of a kraft cook will be a poorer leaving group than the methoxy ion, since the pKa value of water is significantly higher than that of methanol (15.74 and 15.20 respectively), and lower pKa values normally correlate to a better leaving group. In other words, hexenuronic acid is expected to be more difficult to create from glucuronic acid without methoxy group at the 4-position than from 4-*O*-methyl glucuronic acid.

In order to investigate this hypothesis quantitatively, a commercial birch wood xylan (Figure 2) containing 12.6% of 4-*O*-methyl glucuronic acid side chains, as determined earlier (Li *et al.*, 2007), was used as a model. This model, after a NaBH₄ reduction to eliminate all the reducing end groups and thereby prevent the peeling reaction (Sjöström, 1992) which might otherwise substantially destroy the entire xylan structure, was incubated in 1 mol/L NaOH at 120°C for various times from 5 to 240 min, and thereafter investigated for hexenuronic acid content. As can be seen in **Figure 3**, there is an obvious formation of HexA under this conditions with an UV-absorption at a maximum of 260 nm from the sample after 240 min incubations.

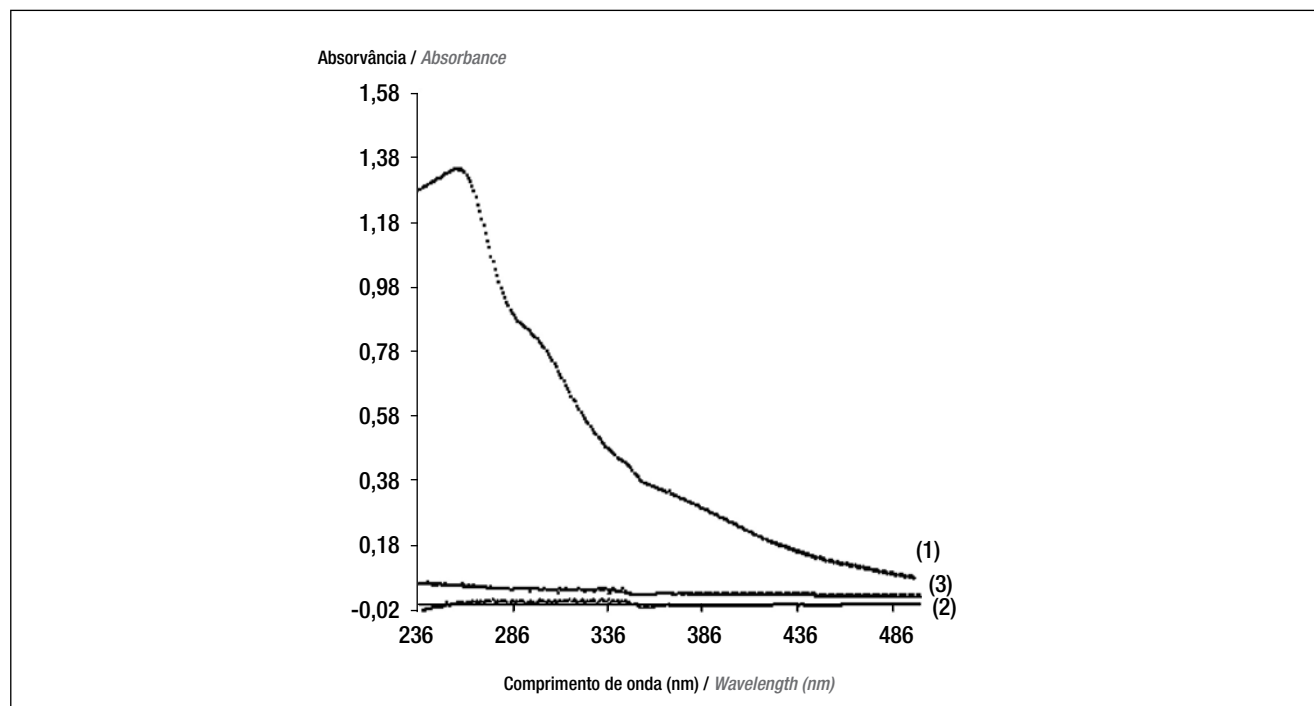


Figura 3. Detecção da formação de HexA. Espectros UV das soluções após incubação da xilana reduzida (Xilana-Vermelha) durante 150 min (1) e sal de sódio do ácido 4-*O*-metil- β -glucurônico durante 150 min (2) ou 4 horas (3) / **Figure 3.** Detection of HexA formation. UV spectra of the solutions after incubation of reduced xylan (Red-Xylan) for 150 min (1) and 1-*O*-methyl- β -glucuronic acid sodium salt for 150 min (2) or 4 hours (3)

Para esta amostra, após a quantificação foi obtido teor de $51\mu\text{mol}$ de HexA. Interessante o fato desse conteúdo de $51\mu\text{mol}$ se situar na mesma faixa de cerca de $20\mu\text{mol/g}$ de celulose de uma polpa kraft convencional, se suposto um teor de 30% de xilana da celulose na polpa. Embora, por razões práticas, a concentração alcalina e temperatura aplicadas para o estudo do modelo sejam mais brandas do que o seria em um cozimento real, as reações na xilana parecem próximas e possivelmente devidas à exposição direta da xilana a álcali e temperatura sem qualquer proteção dada pela estrutura da fibra, como ocorreria no caso do cavaco de madeira. As cinéticas da formação podem ser vistas na **Figura 4** durante os 250 min de incubação; os dados indicaram que o ácido hexenurônico foi formado conforme o previsto.

Um modelo comercial composto para resíduos de ácido glucurônico não metilado, sal de sódio do ácido 1-*O*-metil- β -glucurônico (figura 2) – o grupo metóxi na posição-1 corresponde à cadeia principal da xilana -, foi tratado sob condições idênticas às da xilana reduzida. Não foi possível detectar HexA com o método UV durante 150 min ou mesmo depois de 4 horas (Figura 3). Considerado que a estrutura do HexA é bem estável nas condições de cozimento aplicadas, como pode ser observado no caso do cozimento da xilana reduzida (Figura 4) em que o teor de HexA tem sido acumulado de modo bastante elevado e constante durante pelo menos 130 min (entre 120 e 250 min). As cinéticas quantitativas desse modelo (Figura 4) sugerem que não houve formação de HexA a partir de ácido urônico não metilado, pois que, se

*For this sample, $51\mu\text{mol/g}$ HexA content was obtained after quantification. Interestingly this $51\mu\text{mol/g}$ data is in the same range as in a real kraft pulp of around $20\mu\text{mol/g}$ of pulp, if supposing a 30% content of pulp xylan in the pulp. Although, for practical reasons, the alkaline concentration and temperature applied for the model study are milder than in a real kraft cooking, the reactions on xylan seem close to each other and possibly attributed to the bare exposure of xylan towards the alkali and temperature without any protection from the fiber structure, as is the case with wood chips. The formation kinetics can be seen in **Figure 4** during 250 min of incubation; the data indicated that hexenuronic acid was formed as expected.*

*A commercial model compound for unmethylated glucuronic acid residues, 1-*O*-methyl- β -glucuronic acid sodium salt (Figure 2) - the methoxy group on 1-position corresponds to the main chain of xylan - was treated under identical conditions as the reduced xylan. No HexA could be detected with the UV method during 150 min or even after 4 hours (Figure 3). Since the HexA structure is rather stable while the cooking conditions applied - as could be observed in the case of cooking the reduced xylan (Figure 4) -, where the HexA content has been accumulated as rather high and constant within at least 130 min (between 120 to 250 min). The quantitative kinetics for this model (Figure 4) suggest that no detectable amounts of HexA was formed from the unmethylated uronic acid, because, if formed, it*

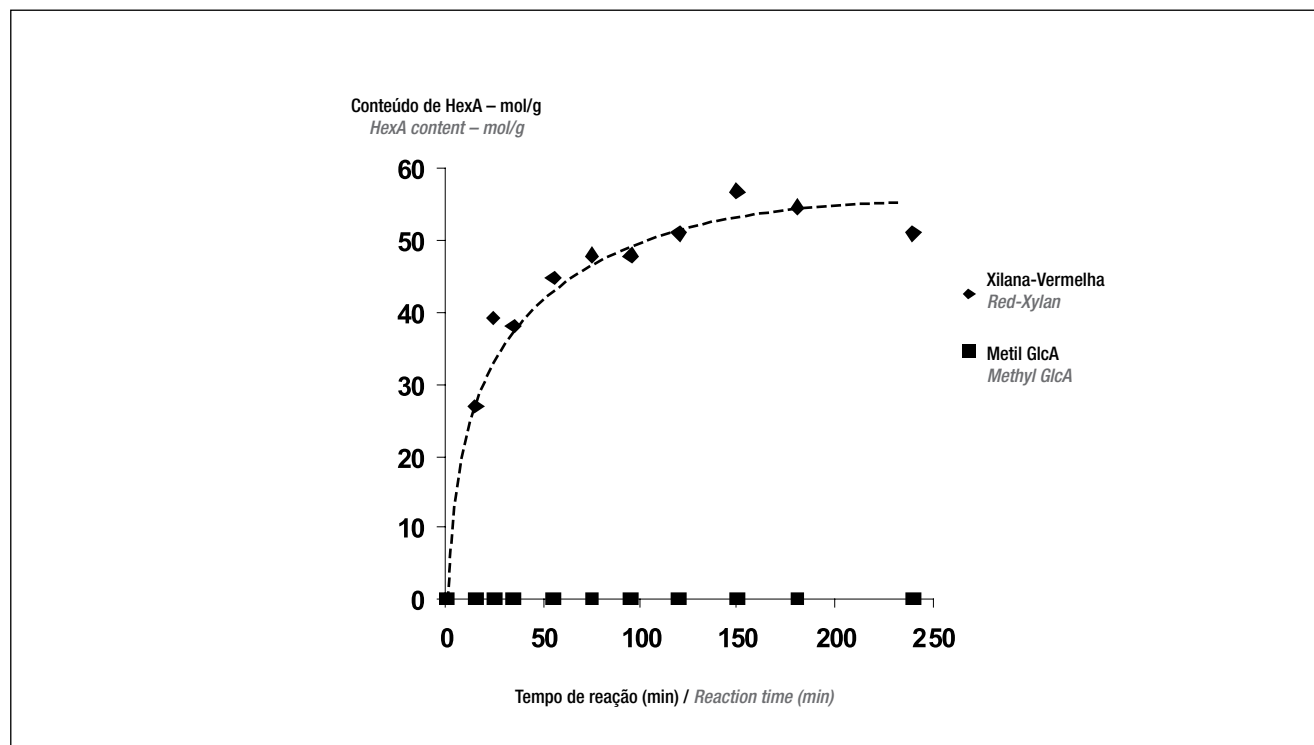


Figura 4. Cinéticas da formação de HexA. Formação de HexA a partir de xilana reduzida (Xilana-Vermelha) e de ácido 1-*O*-metil- β -glucurônico (Metil GlcA) / **Figure 4.** Kinetics of HexA formation. Formation of HexA from reduced xylan (Red-Xylan) and 1-*O*-methyl- β -glucuronic acid (Methyl GlcA)

formado, deveria ser estável e ter acumulado. Para ulterior verificação foi determinado o rendimento da recuperação da estrutura do modelo mediante GC subsequente à acetilação da amostra depois de 150 min de incubação. Foi constatado que >86% do modelo inicial continuava na solução. Em efeito, apenas uma pequena quantidade do material inicial foi considerado decomposto por via de outros trajetos de decomposição da estrutura.

O fato de não haver HexA detectável originado do ácido glucurônico, ao qual faltava um grupo metóxi no carbono-4, parece confirmar a correção de nossa hipótese, ou seja, que a formação de HexA por íon hidróxido na qualidade de grupo sainte do ácido glucurônico é menos eficiente do que a formação de HexA por íon metóxi como grupo sainte do ácido 4-*O*-metil-glucurônico (Figura 1), como exposto anteriormente. Deve ser observado que o sistema de modelo utilizado nesta experiência compara modelo de composto monomérico com grupos laterais em um polímero (Figura 2). Isso é certamente uma deficiência, mas deve ser observado que nossa composição de modelo não pode passar por mutarotação por ter terminal redutor bloqueado (Figura 2b), e que é geralmente admitido que substâncias de baixo peso molecular em sistemas químicos reagem mais rapidamente, por ter taxa de difusão mais alta (Kramers, 1940). É portanto plausível que a menor formação de HexA a partir do modelo não metilado não se deva a seu menor peso molecular. E mais, nossas condições são comparáveis àquelas do cozimento kraft. Visto que as cinéticas da formação de HexA a partir da xilana reduzida foram muito semelhantes àquelas do cozimento kraft (mencionado acima), as grandes diferenças em nosso estudo entre ácido glucurônico metilado e não metilado (Figuras 3, 4) significam que a presença do grupo β -metóxi parece estimular fortemente a formação de HexA durante o cozimento kraft. Portanto, um processo tecnicamente importante seria a conversão de resíduos de ácido 4-*O*-metil-glucurônico em resíduos de ácido glucurônico não metilado. Essencialmente, isso poderia ser feito mediante demetilação específica, o que é todavia difícil por meio de tratamento químico tradicional. Pode haver enzimas de, por exemplo, organismos degradadores de biomassa que poderiam catalisar essa reação; a bactéria *Bacillus stearothermophilus* produz uma variedade de enzimas envolvidas na degradação da xilana e de seus grupos laterais de ácido 4-*O*-metil-glucurônico (Shulami *et al.*, 1999). Contudo, um sério problema desse tratamento seria o fato de a reação dever ser feita antes da polpação, e tratamento enzimático de madeira intacta é muito ineficiente, pois madeira é de tal modo compacta que as enzimas, no tamanho de enzimas, não podem penetrar na madeira (Blanchette *et al.*, 1997). Melhor estratégia poderia ser a manipulação genética da árvore, de modo a suprimir a eterificação do metanol do ácido glucurônico mediante a supressão da expressão genética

should be stable and have accumulated. To further verify this, the recovery yield of the model structure was determined by GC subsequent to acetylation of the sample after 150 min of incubation. It has been found that >86% of the starting model still remained in the solution. Practically, only a small amount of the starting material has been considered decomposed via other possible decomposition pathways of the structure.

*The fact that there is no detectable HexA obtained from the glucuronic acid, which lacked a methoxy group at the 4-carbon, seems to confirm that our hypothesis is right; that formation of HexA by hydroxide ion as a leaving group from glucuronic acid, is less efficient than the formation of HexA by methoxy ion as a leaving group from 4-O-methyl-glucuronic acid (Figure 1), as discussed above. It should be noted that the model system used in this experiment compares a monomeric model compound with side groups on a polymer (Figure 2). This is of course a drawback, but it shall be noted that our model compound cannot undergo mutarotation, since the reducing end is blocked (Figure 2b), and that low molecular weight substances is generally believed to react faster in chemical systems, since they have higher diffusion rate (Kramers, 1940). Therefore, it is likely that the lower HexA formation from the non-methylated model compound is not due to its lower molecular weight. Furthermore, our conditions are comparable to the ones in a kraft cook. Since the kinetics of HexA formation from the reduced xylan were very similar to those in kraft cooking (mentioned above), the very large differences between methylated and non-methylated glucuronic acid in our study (Figures 3, 4) implies that the presence of β -methoxy group seems to strongly stimulate HexA formation during kraft cooking. Hence, a technically important process should be to convert 4-O-methyl glucuronic acid residues to unmethylated glucuronic acid residues. Principally, this could be done with a specific demethylation, which is however difficult by performing a traditional chemical treatment. There might be enzymes from, for instance, biomass degrading organisms that could catalyze this reaction; the bacterium *Bacillus stearothermophilus* produces several enzymes involved in the degradation of xylan and its side group 4-O-methyl-glucuronic acid (Shulami *et al.*, 1999). However, a serious problem with such a treatment is that the reaction needs to be preformed prior to the pulping, and enzymatic treatment of intact wood is very inefficient, because the wood is so compact that enzymes, in the size of enzymes, cannot penetrate into the wood (Blanchette *et al.*, 1997). A better strategy might be to perform genetically manipulation of a tree, in order to suppress the methanol etherification of the glucuronic acid by suppression of expression of the enzyme(s)*

da(s) enzima(s) que realiza tal reação ou alternativamente, introduzir na planta uma enzima que remova por hidrólise o metanol do ácido 4-*O*-metil-glucurônico.

Pergunta: seria possível obter *in vivo* uma estrutura de xilana alterada mediante modificação do código genético em enzimas que efetuam tal metilação? A resposta depende de pelo menos dois fatores: se uma xilana polimérica com resíduos de ácido glucurônico em vez do ácido 4-*O*-metil-glucurônico poderia ser sintetizada pela planta, e se tal polímero poderia continuar desempenhando as funções biológicas da hemicelulose, de modo a produzir árvore saudável. A hemicelulose é sintetizada no dispositivo Golgi por condensações de derivados termodinamicamente ativados (fosfatos, nucleótido difosfato, etc.) de monossacarídeos ou polímeros/oligômeros e outros componentes controlados por enzimas específicas/complexos de enzimas, síntese de hemicelulose (Brown *et al.*, 2007; Driouich *et al.*, 1993; Tenhaken e Thulke, 1996; Grant Reid, 2000; Lerouxel, *et al.*, 2006; Takeshi, 2008; York e O'Neill, 2008). Segundo nosso conhecimento, não há certeza se a eterificação do 4-*O*-metanol ocorre em ácido glucurônico monomérico/ácido glucurônico nucleótido difosfato ou em resíduos de ácido glucurônico previamente existentes como grupos laterais na xilana. Se a eterificação do metanol for realizada depois da polimerização, as possibilidades de obtenção de polímero com ácido glucurônico parecem boas; se a eterificação do metanol for realizada em monômeros, para o sucesso da estratégia a enzima que acopla o resíduo/derivado do resíduo à cadeia principal da xilana deve aceitar ácido glucurônico não metilado.

Ainda que tal estrutura modificada de xilana possa ser sintetizada *in vivo*, esta hemicelulose modificada deve continuar capaz de realizar sua função na planta. Isso propõe a questão quanto às funções biológicas da eterificação do metanol. Tem sido proposto que modificações de resíduos de monossacarídeos em hemiceluloses, tais como acetilações, aumentam a resistência da parede da célula contra degradação microbiana. Outra possibilidade, talvez mais provável, seria que o bloqueio dos grupos hidroxila aumenta a hidrofobicidade do polissacarídeo e reduz a possibilidade de as ligações de hidrogênio tornarem a cristalização mais difícil e as hemiceluloses mais amorfas (Walker, 2006). Sob qualquer circunstância, a remoção do grupo metila dos resíduos do ácido 4-*O*-metil-glucurônico parece ser mudança relativamente menor na estrutura da xilana. Em apoio daquela xilana com esta modificação há o fato de que ambas podem ser sintetizadas e também cumprir com suas funções biológicas; ao menos até um nível aceitável, certas plantas, inclusive a *Arabidopsis thaliana* e culturas de células de plantas, são informadas como tendo metilação incompleta dos resíduos de ácido glucurônico em sua xilana (Brown *et al.*, 2007; Mellinger *et al.*, 2005; Darvil *et al.*, 1980).

Se é possível, através de modificação genética, fazer com

performing this reaction or, alternatively, introducing an enzyme in the plant that removes methanol by hydrolysis from 4-O-methyl glucuronic acid.

*Should it be possible to obtain an altered xylan structure in vivo by suppression of genes encoding for enzymes that perform this methylation? The answer is dependent on at least two factors: whether a polymeric xylan with glucuronic acid residues instead of 4-O-methyl glucuronic acid can be synthesized by the plant, and if such a polymer can still carry out the biological functions of the hemicellulose, thereby giving a healthy tree. Hemicellulose is synthesized in the Golgi apparatus by condensations of thermodynamically activated derivatives (phosphates, nucleotide diphosphate, etc.) of monosaccharides or polymers/oligomers and other components controlled by specific enzymes/enzyme complexes, hemicellulose synthetases (Brown *et al.*, 2007; Driouich *et al.*, 1993; Tenhaken and Thulke, 1996; Grant Reid, 2000; Lerouxel *et al.*, 2006; Takeshi, 2008; York and O'Neill, 2008). To our knowledge, it is not known with certainty whether the 4-O-methanol etherification is carried out on monomeric glucuronic acid/ glucuronic acid nucleotide diphosphate, or on glucuronic acid residues already present as side groups on xylan. If the methanol etherification is performed after the polymerization, the possibilities to obtain a polymer with glucuronic acid appear to be good; if the methanol etherification is carried out on monomers, the enzyme that couples the residue/residue derivative to the xylan main chain must accept non-methylated glucuronic acid for success of the strategy.*

*Even if such a modified xylan structure could be synthesized in vivo, this modified hemicellulose must still be able to perform its task in the plant. This raises the question about the biological functions of the methanol etherification. It has been suggested that modifications of monosaccharide residues in hemiceluloses, such as acetylations, increase the resistance of a cell wall against microbial degradation. Another maybe more probable possibility is that blocking of hydroxyl groups increase the hydrophobicity of the polysaccharide and lowers the possibility for hydrogen bonding making crystallization more difficult, and the hemiceluloses more amorphous (Walker, 2006). Under all circumstances, a removal of the methyl group from the 4-O-methyl glucuronic acid residues appears to be a relatively minor change to the structure of xylan. In support of that xylan with this modification can both be synthesized and fulfill its biological functions, at least to an acceptable level, certain plants including thale cress (*Arabidopsis thaliana*) and plant cell cultures are reported to have incomplete methylation of the glucuronic acid residues in their xylan (Brown *et al.*, 2007; Mellinger *et al.*, 2005; Darvil *et al.*, 1980).*

que uma planta, por exemplo uma folhosa de crescimento rápido como o *Eucalyptus grandis*, produza xilana com exclusivamente ácido glucurônico sem metilação como grupos laterais, os dados deste trabalho indicam que nenhum ou pouco HexA seria formado durante a polpação kraft. Isso poderia levar a uma celulose com número kappa muito menor após a polpação kraft do que aquele de polpa semelhante produzida com madeira convencional, polpa que pode ser branqueada com consumo de químicos menor, com os decorrentes benefícios econômicos e ambientais. Além disso, pode ser também obtida celulose branqueada com densidade de carga mais alta e maior estabilidade de alvura em comparação a celuloses produzidas com madeiras convencionais, pois cargas serão obtidas como resíduos de ácido glucurônico quimicamente estáveis na hemicelulose. Uma celulose tão altamente carregada pode ser bem interessante na fabricação de papel e em outras aplicações técnicas.

Portanto, nossa recomendação é que sejam iniciados projetos que objetivem a supressão de códigos genéticos de enzimas que realizam a eterificação do metanol em resíduos de ácido glucurônico da xilana de árvores importantes como matéria-prima para a indústria de celulose e papel, tais como os gêneros *Eucalyptus*-, *Acacia*-, *Populus*- e *Pinus*. São conhecidos alguns genes para a biossíntese da xilana, mas a função exata de cada gene ainda não é completamente conhecida (Takeshi, 2008). Espera-se que mais pesquisas levem à identificação do gene certo. Podem também ser introduzidos genes para codificação de enzimas capazes de remover grupos metila do ácido 4-*O*-metil-glucurônico, caso tais enzimas possam ser encontradas.

CONCLUSÕES

Cadeias laterais de ácido glucurônico não metilado na xilana parecem gerar, sob condições alcalinas semelhantes àquelas do cozimento kraft, quantidade de ácido glucurônico muito menor do que resíduos de ácido 4-*O*-metil-glucurônico. Isso pode ser devido ao fato de íons metóxi sob essas condições serem melhor grupo saínte do que o de íons hidroxilas. Resulta, portanto, que uma possível estratégia para o melhoramento genético de árvores seria reprimir a expressão da(s) enzima(s) responsável pela metilação dos resíduos de ácido glucurônico na xilana ou, alternativamente, introduzir gene(s) que programem novas enzimas capazes de remover esse grupo. Árvores geneticamente modificadas dessa forma poderiam produzir celulose com número kappa pós polpação mais baixo, o que permitiria branquear para um baixo número kappa e alta estabilidade de alvura com consumo de químicos menor do que aquele das polpas atuais, e que poderia associar elevada carga superficial com a boa estabilidade de alvura.

Agradecimentos

Este trabalho foi patrocinado pela Wood and Pulp Chemistry Research Network (WPCRN) e pelo Wallenberg

*If it is possible by genetically modifying a tree, for instance, a fast growing hardwood such as *Eucalyptus grandis*, make it to produce xylan with exclusively glucuronic acid without methylation as side groups, the data in this work suggest that no or little HexA would be formed during kraft pulping. That might lead to a pulp with much lower kappa number after kraft pulping than a similar pulp made from conventional wood, which can be bleached with much lower consumption of chemicals, providing economical and environmental benefits. Furthermore, a bleached pulp with higher charge density and increased brightness stability may also be obtained compared with pulps made of conventional woods, since charges will be obtained as chemically stable glucuronic acid residues in the hemicellulose. Such a highly charged pulp may be very interesting in papermaking and other technical applications.*


*Thus, our recommendation is that projects are initiated to suppress genes encoding for enzymes performing methanol etherification of glucuronic acid residues in xylan in trees with importance as raw material for the pulp and paper industry, such as *Eucalyptus*-, *Acacia*-, *Populus*- and *Pinus* genus. Several genes for xylan biosynthesis are known, but the exact role of the individual genes is still not totally understood (Takeshi, 2008). Further research will hopefully identify the right gene. Genes for encoding enzymes able to remove methyl groups from 4-*O*-methyl glucuronic acid might also be introduced, if such enzymes can be found.*


CONCLUSIONS

*Unmethylated glucuronic acid side chains on xylan seem to create much less hexenuronic acid, under alkaline conditions similar to the ones in kraft cook, than 4-*O*-methyl glucuronic acid residues. This may be due to that methoxy ions under these conditions are a better leaving group than hydroxyl ions. Thus, one possible strategy for genetic improvement of trees should, therefore, be to repress expression of enzyme(s) responsible for the methylation of the glucuronic acid residues in xylan, or alternatively introduce gene(s) encoding for novel enzyme(s) that remove this group. Such genetically modified trees may produce a pulp with lower kappa number after kraft pulping, that may be possible to bleach to low kappa number and high brightness stability with a lower consumption of chemicals than today's pulps, and that may be able to combine high surface charge with good brightness stability.*

Acknowledgments

This work was supported by Wood and Pulp Chemistry Research Network (WPCRN) and Wallenberg

Wood Science Centre (WWSC). Agradecemos ao Professor Gösta Brunow, da Universidade de Helsinque, e ao Professor Vincent Bulone, do Real Instituto de Tecnologia – KTH – pelas proveitosas discussões, e ao Dr. Stacy Tray, KTH, pela revisão linguística. 

Wood Science Centre (WWSC). We thank Professor Gösta Brunow, Helsinki University and Professor Vincent Bulone at Royal Institute of Technology, KTH, for fruitful discussions, and Dr Stacy Tray, KTH, for linguistic revision. 

REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Blanchette, R.A.; Krueger, E.W.; Haight, J.E.; Akhtar, M.; Akin, D.E. (1997): *Cell wall alteration in loblolly pine wood decayed by the white rot fungus, Ceriporiopsis subvermispora*, *J. Biotechnol.* 53(2-3) 203-213
2. Brown, D.M.; Goubet, F.; Wong, V.W.; Goodacre, R.; Stephens, E.; Dupree, P.; Turner, S.R. (2007): *Comparison of five xylan synthesis mutants reveals new insights into the mechanisms of xylan synthesis*, *The Plant J* 52, 1154 - 1168
3. Chen C.; Baucher M.; Christensen, J.H.; Boerjan, W. (2001): *Biotechnology in trees: Towards improved paper pulping by lignin engineering*, *Euphytica* 118, 185–195
4. Darvill, J.E.; McNeil M.; Darvill, A.G.; Albersheim, P. (1980): *The structure of plant cell walls. 11Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell wall of suspension-cultured sycamore cells*, *Plant Physiol.* 66, 1135-1139
5. Driouich, A.; Faye, L.; Staehelin, L.A. (1993): *The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins* *Trends Biochem Sci.* 18, 210 - 214
6. Gellerstedt, G.; Li, J. (1996): *An HPLC method for the quantitative determination of hexenuronic acid groups in chemical pulps*, *Carbohydr. Res.* 294, 41-51.
7. Gierer, J. (1980): *Chemical aspects of kraft pulping*, *Wood Sci. Technol.* 14, 241–266
8. Grant Reid, J.S. (2000): *Cementing the wall: cell wall polysaccharide synthesizing enzymes*, *Curr. Opin. Plant Biol.* V3(6), 512-516
9. Kramers, H.A. (1940): *Brownian motion in a Field of Force and the Diffusion Model of Chemical Reactions* *Physica* 7, 287- 304
10. Laine, J.; Stenius, P. (1997): *Effect of charge on the fibre and paper properties of bleached industrial kraft pulps*, *Paperi ja Puu* V79(4) 257–266
11. Lerouxel, O.; Cavalier, D.M.; Liepman, A.H.; Keegstra, K. (2006): *Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides – a complex process*, *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 621-630
12. Li, J.; Gellerstedt, G. (1997): *The contribution to kappa number from hexenuronic acid groups in pulp xylan*, *Carbohydr. Res.* 302(3-4) 213-218
13. Li, J.; Kisara, K.; Danielsson, S.; Lindström, M. E.; Gellerstedt, G. (2007): *An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides*, *Carbohydr. Res.*, 342(11) 1442-1449.
14. Mellinger, C.G.; Carbonerom E.R.; Cipriani T.R.; Gorin, P.A.J.; Iacomini M. (2005): *Xylans from the medical herb Phyllanthus niruri*, *J. Nat. Prod.* 68 129-132
15. Pilate, G.; Guiney, E.; Holt, K.; Petit-Conil, M.; Lapierre, C.; Leplé, J.-C.; Pollet, B.; Mila, I.; Webster, E.A.; Marstorp, H.G.; Hopkin, D.W.; Jouanin, L.; Boerjan, W.; Schuch, W.; Cornu, D.; Halpin, C. (2002): *Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignifications*, *Nature Biotechnol.* V20 607-612
16. Peña, L.; Séguin, A. (2001): *Recent advances in the genetic transformation of trees*. *Trends Biotechnol.* V19(12) 500–506

17. Ralph, J.; Brunow, G.; Harris, P. J.; Dixon, R. A.; Schatz, P. F.; Boerjan, W. (2008): *Lignification: Are lignins biosynthesized via simple combinatorial chemistry or via proteinaceous control and template replication?* In: Daayf, F., El Hadrami, A., Adam, L., and Ballance, G. M. (eds). *Recent Advances in Polyphenol Research*, Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, UK. pp 36-66
18. Ragnar, M.; Lindström, M.E. (2002): *A comparison of emerging technologies: hot chlorine dioxide bleaching versus hot acid treatment*, Paperi ja Puu 86(1) 39-44
19. Simeonova, G.; Sjö Dahl, R.; Ragnar, M.; Lindström, M.E.; Henriksson, G. (2007): *On the Effect of a Xylanase Post-Treatment as a Means of Reducing the Yellowing of Bleached Hardwood Kraft Pulp*. Nordic Pulp. Pap. Res. J. 22(2) 172–176
20. Sevastyanova, O.; Li, J.; Gellerstedt, G. (2006): *Influence of various oxidable structures on the brightness stability of fully bleached chemical pulps*. Nordic Pulp Pap. Res. J. 21 49–53
21. Shulami, S.; Gat, O.; Sonenshein A.L.; Shoham Y. (1999): *The glucuronic acid utilization gene cluster from Bacillus stearothermophilus T-5*. J. Bacteriol. V181(12) 3695 - 3704
22. Sjöström, E. (1992): *Wood chemistry. Fundamentals and applications*. 2nd ed., Academic Press: New York, USA
23. Takeshi, I (2008): *Progress toward understanding xylan biosynthesis*. Trends Glycosci. Glycotechnol. V20(113) 171 - 172
24. Teleman, A.; Harjunpää, V.; Tenkanen, M.; Buchert, J.; Hausalo, T.; Drakenberg, T.; Vuorinen, T. (1995): *Characterization of 4-deoxy-L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid attached to xylan in pine kraft pulp and pulping liquor by 1H and 13C NMR spectroscopy*, Carbohyd. Res. 272 55-71
25. Tenhaken, R.; Thulke, O. (1996): *Cloning of an Enzyme That Synthesizes a Key Nucleotide-Sugar Precursor of Hemicellulose Biosynthesis from Soybean:UDP-Glucose Dehydrogenase*. Plant Physiol., V112(3), 1127-1134
26. Theander, O. and Westerlund, E.A. (1986): *Studies on dietary fiber. 3. Improved procedures for analysis of dietary fiber*” J. Agric. Food Chem. 34, 330-336.
27. Törngren, A.; Gellerstedt, G. (1997): *The nature of organic bound chlorine from ECF-bleaching found in kraft pulp*, Proc. 9th Intl. Symp. Wood Pulping Chem., Tech. Sect., CPPA, Montreal, p M2-1
28. Viikari, L., Sundquist, J.; Kettunen, J. (1991): *Xylanase enzymes promote pulp bleaching*, Paperi Ja Puu V73(5) 384-389
29. Vuorinen, T.; Buchert, J.; Teleman, A.; Tenkanen, M.; Fagerström, P. (1996): *Selective Hydrolysis of Hexenuronic Acid Groups and Its Application in ECF and TCF Bleaching of Kraft Pulps*, Proc. 1996 Intl. Pulp Bleaching Conf., TAPPI Press, Atlanta, p.43
30. Vuorinen, T., Fagerström, P., Räsänen, E.; Vikkula, A. (1997): *Selective Hydrolysis of Hexenuronic Acid Groups Opens New Possibilities for Development of Bleaching Processes*, Proc. 9th Intl. Symp. Wood Pulping Chem., Tech. Sect., CPPA, Montreal, p.M4-1
31. Walker, J.C.F. (2006): *Primary wood processing: principles and practice*. Springer Publishing Company, New York, NY, USA p 41
32. York, W.S.; O'Neill, M.A. (2008): *Biochemical control of xylan biosynthesis – which end is up?* Curr Opin Plant Biol. 11, 258 - 265
33. Young, R.A. (1990): *Introduction to Forest Science*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA ISBN 978-0471856047