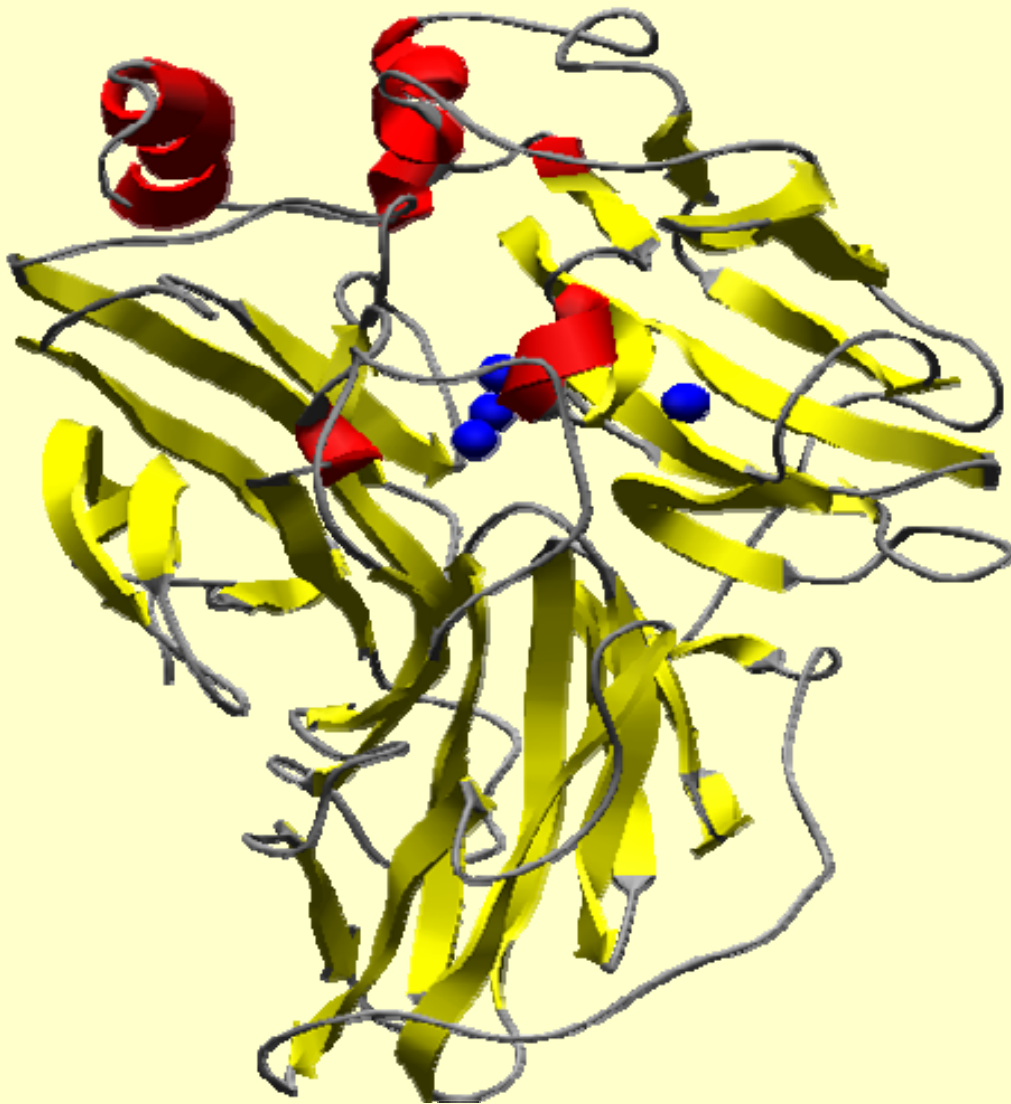


# UTILIZACIÓN DEL SISTEMA ENZIMA-MEDIADOR PARA LA ELIMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS EXTRAÍBLES Y LA LIGNINA EN LA INDUSTRIA DE PASTA Y PAPEL



**SETEFILLA MOLINA MANZANARES**

**DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFÍA, MINERALOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



# **UTILIZACIÓN DEL SISTEMA ENZIMA-MEDIADOR PARA LA ELIMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS EXTRAÍBLES Y LA LIGNINA EN LA INDUSTRIA DE PASTA Y PAPEL**

**Memoria que presenta:**

**Setefilla Molina Manzanares**

**Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC)**

**para optar al Diploma de Estudios Avanzados**

**Directores:**

**Dr. D. José C. del Río Andrade    Dra. Dña. Ana Gutiérrez Suárez**

**Tutor:**

**Esmeralda Morillo González**

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC) y ha sido financiado por el proyecto europeo: “White biotechnology for added value products from renewable plant polymers: Design of Taylor-made biocatalysts and new industrial bioprocesses (BIORENEW)” NMP2-CT-2006-026456 y un contrato I3P de postgrado.

Quiero expresar mi gratitud a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo:

A los Dres. José Carlos del Río y Ana Gutiérrez, directores de este trabajo, por sus conocimientos, enseñanzas y su imprescindible orientación en las investigaciones realizadas. A los dos le debo todos los resultados obtenidos, y quiero agradecerles muy especialmente su comprensión mostrada en todo momento y su apoyo en todas mis decisiones. Han sido los mejores directores que un aspirante a investigador pudiese tener.

A la empresa ENCE (Pontevedra) y especialmente al Dr. Javier Romero, por las muestras de pastas proporcionadas para este trabajo, y por su colaboración en la realización de algunos análisis.

A la Dra. Esmeralda Murillo, del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC), por actuar como tutora de este trabajo.

Al Prof. Ángel T. Martínez, del Centro de Investigaciones Biológicas en Madrid (CIB-CSIC), quien me ha aportado durante todo este trabajo sus ideas, sugerencias y enormes conocimientos.

A mis compañeros de laboratorio Jorge Rencoret y Gisela Márques, por toda su ayuda en los trabajos experimentales y sus colaboraciones. Quiero agradecerles la paciencia que tuvieron conmigo al principio de este trabajo y que siguen teniendo cada día.

A todo el personal del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, que me ha tratado siempre con mucho cariño y me ha ayudado en todo lo que he necesitado.

A mi hermana Rosa que colaboró en algunos de los experimentos de este trabajo, en su período de prácticas en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla.

A mi familia y a Ricardo, por su apoyo y comprensión, por estar siempre a mi lado, y aguantar las charlas sobre mis investigaciones aún siendo profanos en la materia.

## ABREVIATURAS

AAD	Aril-alcohol deshidrogenasa
AAO	Aril-alcohol oxidasa
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ACS	Acetosiringona
ALK	Alcano (alkane)
APC	Ácido <i>p</i> -cumárico
AQ	Antraquinona
BSTFA	N,O-bis-(trimetilsilil-)trifluoroacetamida
ECF	Secuencia de blanqueo libre de cloro elemental (elemental chlorine free)
EPA	Agencia de protección medioambiental de E.E.U.U.
FA	Ácido graso (fatty acid)
FID	Detector de ionización de llama (flame ionization detector)
GC	Cromatografía de gases (gas chromatography)
GC/MS	Cromatografía de gases/espectrometría de masas (gas chromatography/mass spectrometry)
HBT	1-Hidroxibenzotriazol
I.D.	Diámetro interno
ITD	Detector de trampa de iones (ion trap detector)
Lac	Lacasa
LiP	Lignina peroxidasa
MeS	Metilsiringato
MnP	Manganeso peroxidasa
<i>Mt</i>	<i>Myceliophthora thermophila</i>
P	Fase de peróxido
<i>Pc</i>	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
QR	Quinona reductasa
rpm	Revoluciones por minuto
SAD	Siringaldehído
SPE	Extracción en fase sólida (solid phase extraction)
TCF	Secuencia de blanqueo libre de cloro total (Totally chlorine free)
TMP	Pasta termomecánica

TMS	Trimetilsililo
TMSD	Trimetilsilildiazometano
U	Unidad de actividad enzimática
VP	Peroxidasa versátil

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN TEÓRICA</b> .....	1
<b>1. Estructura y composición de los materiales lignocelulósicos</b> .....	3
1.1. Celulosa .....	4
1.2. Hemicelulosas .....	5
1.3. Lignina .....	6
1.4. Compuestos extraíbles .....	9
<b>2. Proceso de obtención de la pasta de papel</b> .....	10
2.1. Pastas mecánicas.....	10
2.2. Pastas químicas.....	11
2.3. Pastas químico-mecánicas .....	12
2.4. Proceso de blanqueo de la pasta .....	12
<b>3. Problemas durante la producción de pasta de papel: lignina y lípidos</b> .....	13
<b>4. Soluciones biotecnológicas</b> .....	15
4.1. Biodegradación de la lignina.....	15
4.1.1. Hongos ligninolíticos .....	15
4.1.2. Enzimas ligninolíticas .....	16
4.1.3. Principales reacciones en la biodegradación de la lignina .....	19
4.2. Control del pitch .....	20
4.2.1. Almacenamiento al aire libre de la madera .....	20
4.2.2. Biocontrol con <i>Ophiostoma piliferum</i> y otros hongos ascomicetos.....	20
4.2.3. Biocontrol del pitch con hongos basidiomicetos seleccionados .....	21
4.2.4. Biocontrol con enzimas.....	22
4.2.5. Biocontrol con lacasas.....	23
<b>II. ANTECEDENTES DEL TRABAJO</b> .....	27
<b>1. Eliminación de los extractos lipofílicos en diferentes tipos de pastas usando el sistema lacasa-mediador</b> .....	27
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	37
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	41
<b>1. Materiales</b> .....	41
1.1. Pastas .....	41
1.2. Compuestos lipídicos modelo .....	41
1.3. Enzimas .....	41
1.4. Mediadores .....	41
<b>2. Métodos</b> .....	42
2.1. Tratamientos enzimáticos de pastas y compuestos modelo.....	42
2.1.1. Tratamientos con lacasa de <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> y HBT.....	42
▪ Tratamientos de pasta.....	42
▪ Reacciones con compuestos modelo.....	42
2.1.2. Tratamiento con lacasa de <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> y ácido violúrico.....	43
▪ Tratamientos de pasta.....	43
▪ Reacciones con compuestos modelo.....	43
2.1.3. Tratamientos con lacasa de <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> y mediadores naturales.....	43
▪ Tratamientos de pasta.....	43

▪ Reacciones con compuestos modelo.....	44
2.1.4. Tratamientos con lacasa de <i>Myceliophthora thermophila</i> y mediadores naturales.....	44
▪ Tratamientos de pasta.....	44
2.1.5. Tratamientos con lipoxigenasas de <i>Gaeumannomyces graminis</i> .....	45
▪ Tratamientos de pasta.....	45
▪ Reacciones con compuestos modelo.....	45
2.2. Métodos analíticos .....	46
2.2.1. Extracción de los compuestos extraíbles lipofílicos .....	46
2.2.2. Fraccionamiento de los compuestos extraíbles lipofílicos mediante extracción en fase sólida (SPE) .....	46
2.2.3. Saponificación de los ésteres de esteroides .....	46
2.2.4. Análisis mediante GC y GC/MS de los compuestos lipofílicos.....	48
2.2.5. Métodos de derivatización .....	49
2.2.6. Métodos de cuantificación .....	50
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>53</b>
<b>1. Sistema lacasa-mediador .....</b>	<b>53</b>
1.1. Lacasa de <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> y HBT .....	53
▪ Tratamientos de pasta.....	53
▪ Reacciones con compuestos modelo.....	53
1.2. Lacasa de <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> y ácido violúrico.....	64
▪ Tratamientos de pasta.....	64
▪ Reacciones con compuestos modelo.....	67
1.3. Lacasa de <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> y mediadores naturales.....	70
▪ Tratamientos de pasta.....	70
▪ Reacciones con compuestos modelo.....	76
1.4. Lacasa de <i>Myceliophthora thermophila</i> y mediadores naturales.....	82
▪ Tratamientos de pasta.....	82
<b>2. Lipoxigenasa de <i>Gaeumannomyces graminis</i> .....</b>	<b>89</b>
▪ Tratamientos de pasta.....	89
▪ Reacciones con compuestos modelo.....	92
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>95</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>99</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**



## I. INTRODUCCIÓN

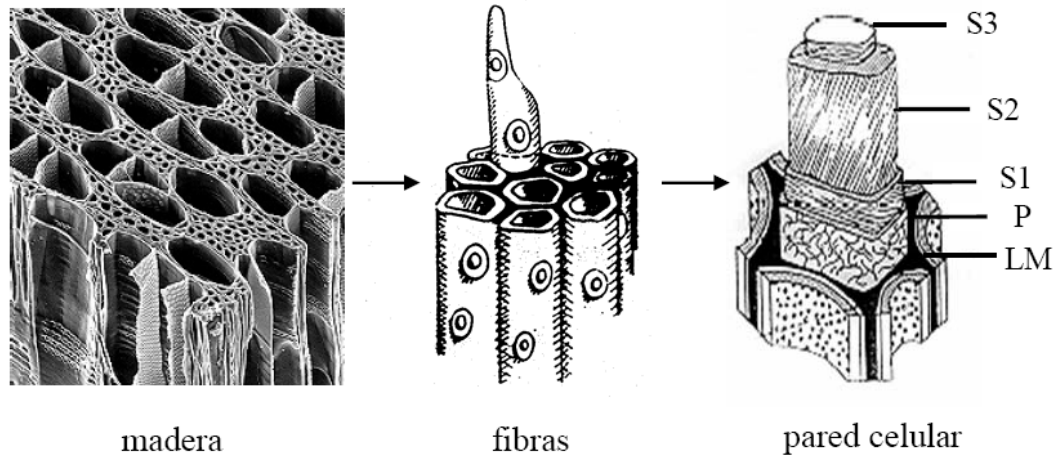
### 1. Estructura y composición de los materiales lignocelulósicos

La madera y otros materiales lignocelulósicos representan la mayor fuente de energía y materia orgánica renovables de la biosfera. La mayor parte de la biomasa del planeta está constituida por materiales lignocelulósicos, por lo que la degradación de estos compuestos representa el proceso biodegradativo más importante en el ciclo del carbono.

Los materiales lignocelulósicos incluyendo los productos de origen agrícola y forestal, están constituidos por tres polímeros estructurales- celulosa, hemicelulosa y lignina- y una serie de compuestos de bajo peso molecular solubles en agua o en solventes orgánicos, los denominados extraíbles. La celulosa es el componente mayoritario (alrededor de un 50%), seguida de la lignina (alrededor de un 20%) y de la hemicelulosa (15%) (Fengel y Wegener, 1984). También presentan pequeños contenidos de proteínas y sales minerales (estimadas como ceniza tras la combustión).

La madera es el más abundante de los materiales lignocelulósicos y su estructura y composición condiciona su utilización industrial y la posible aplicación de métodos biotecnológicos.

La pared celular de las plantas vasculares es una estructura compleja y semirrígida constituida por un entramado de microfibrillas cristalinas de celulosa, recubiertas por una matriz de hemicelulosa y lignina. La pared celular vegetal está constituida por la pared primaria y la pared secundaria (**Fig. 1**). Las paredes primarias de dos células adyacentes están unidas entre sí por lignina, denominándose a esta capa lámina media. La pared secundaria está constituida por tres capas que difieren en la orientación de las fibrillas de celulosa. En las capas exterior e interior ( $S_1$  y  $S_3$ ) las fibrillas están dispuestas formando un amplio ángulo con el eje de la célula, mientras que la disposición de las fibrillas en la capa intermedia gruesa ( $S_2$ ) es prácticamente paralela al eje. La pared secundaria, que es la capa más gruesa, presenta un cierto contenido de lignina, pero está principalmente constituida por celulosa y hemicelulosa. La lignina de la pared secundaria forma una matriz amorfa que protege a los polisacáridos frente a la degradación microbiana y a la hidrólisis enzimática. En la pared vegetal, entre los polímeros pueden darse enlaces directos, enlaces éter entre OH alcohólicos (de los polisacáridos) y fenólicos (de la lignina), o través de puentes formados por los ácidos *p*-hidroxicinámicos. Los ácidos *p*-hidroxicinámicos, son precursores de la lignina, pero en muchas plantas herbáceas se encuentran también en forma libre y formando puentes lignina-polisacáridos (Scalbert et al., 1985; Grabber et al., 2000; Bunzel et al., 2001; Lam et al., 2001; Sun et al., 2002).

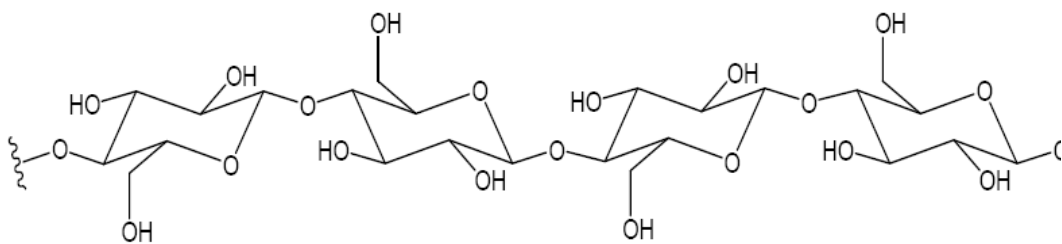


**Fig. 1.** Estructura de la madera y de la pared de las fibras vegetales (P: pared primaria, S1-S3: capas de la pared secundaria y LM: lámina media) adaptado de Kirk y Cullen (1998).

### 1.1. Celulosa

La celulosa es uno de los biopolímeros más abundante de la naturaleza, ya que se trata del principal componente estructural de las células vegetales. Comprende del 10% al 20% del peso seco de las hojas, del 50% del peso de la madera y la corteza de los árboles y aproximadamente el 90% del peso de las fibras de algodón (Streitwieser y Heathcok, 1983).

La celulosa está constituida por cadenas lineales de D-glucosa unida mediante enlaces glucosídicos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) dando lugar a la unidad de celobiosa que se repite exactamente en la cadena polimérica (**Fig. 2**). Dichas cadenas se unen mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, dando lugar a las denominadas fibrillas elementales. Éstas a su vez constituyen las microfibrillas, que se orientan de forma diferente en cada nivel de la pared secundaria para darle resistencia.



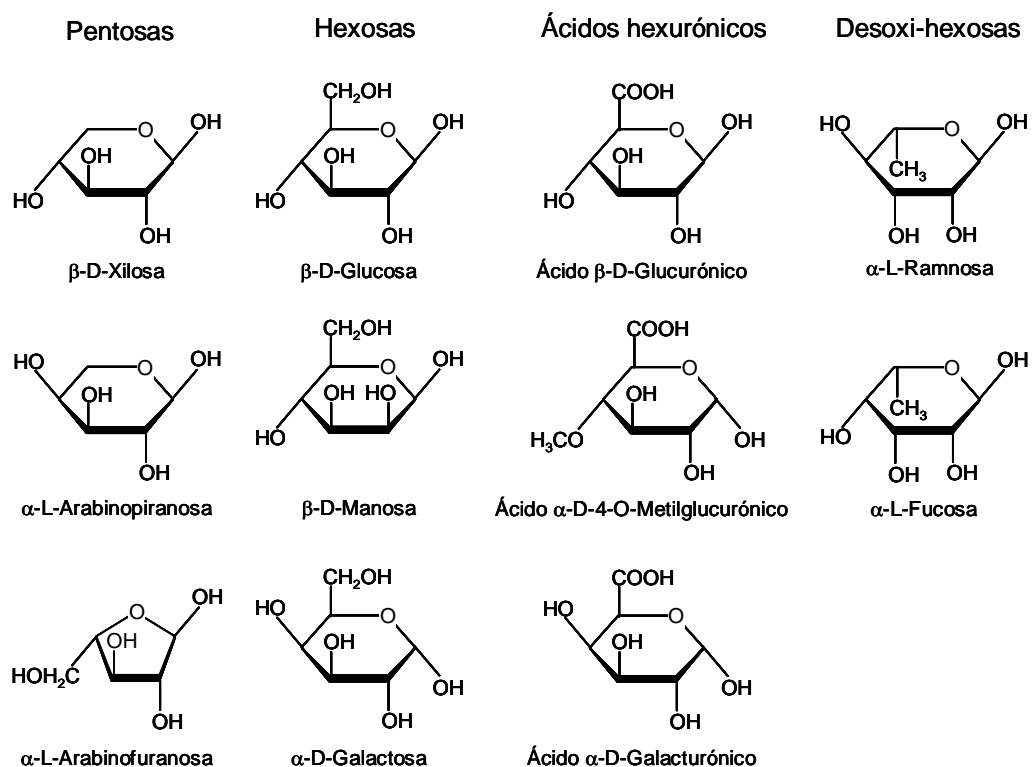
**Fig. 2.** Estructura de la celulosa.

## 1.2. Hemicelulosas

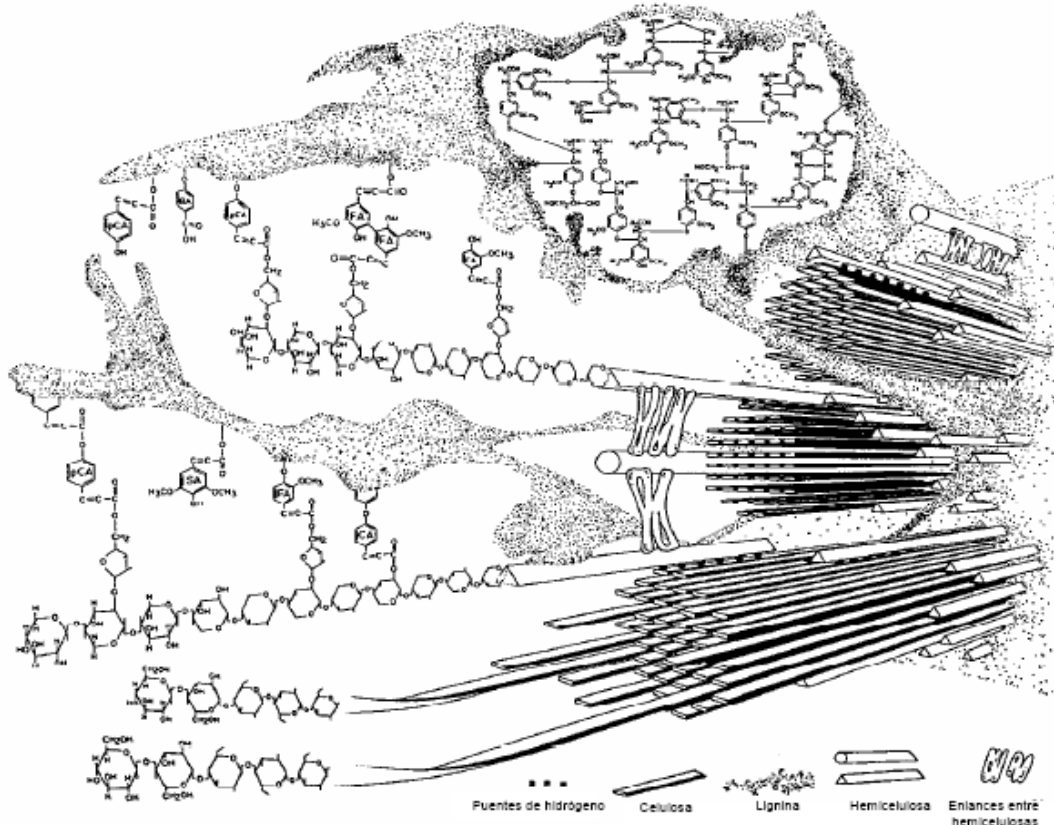
Las hemicelulosas son polisacáridos químicamente heterogéneos y ramificados, formados por una cadena lineal de monosacáridos unidos principalmente por enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (en algunos casos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3)), a la cual se unen cadenas laterales cortas a menudo de azúcares distintos a los de la cadena principal. Los residuos de monosacáridos incluyen pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), hexosas (D-glucosa, D-galactosa, L-galactosa, D-manosa, L-ramnosa y L-fucosa) y ácidos urónicos (ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico), que pueden encontrarse acetilados o en forma de ésteres metílicos. En la **Fig. 3** se muestran los monosacáridos constituyentes de las hemicelulosas.

Las hemicelulosas actúan junto con la lignina como matriz soporte para las microfibrillas de celulosa en la pared celular (**Fig. 4**). Son de menor peso molecular, más fácilmente degradables y más fáciles de disolver que la celulosa.

La estructura de la celulosa es la misma en los diferentes tipos de madera y otros materiales lignocelulósicos. Sin embargo, en las hemicelulosas existe una considerable variación entre las diferentes maderas y plantas herbáceas. Mientras que en las frondosas (maderas duras) se encuentran principalmente hemicelulosas con unidades de cinco carbonos (pentosanos), en las coníferas (maderas blandas) abundan más las hemicelulosas con unidades de seis carbonos (hexosanos). En las plantas herbáceas, las hemicelulosas presentan una gran variedad en composición según las diferentes especies, siendo en algunas predominantes la manosa y la galactosa (Morrison et al., 1999b) y en otras la xilosa (Neto et al., 1996).



**Fig. 3.** Monosacáridos componentes de las hemicelulosas (Fengel y Wegener, 1984).

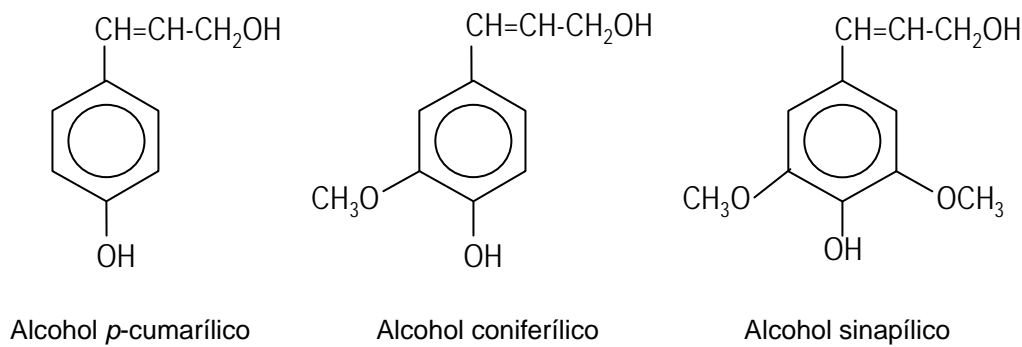


**Fig. 4.** Representación esquemática de las relaciones entre los principales constituyentes de la pared secundaria (celulosa, lignina y hemicelulosa) de una angiosperma herbácea. Se muestran las microfibrillas de celulosa inmersas en una matriz de lignina en la que también se incluye la hemicelulosa. Las uniones entre estos polímeros se completan mediante puentes intermoleculares formados por los ácidos *p*-hidroxicinámicos (Bidlack et al., 1992).

### 1.3. Lignina

La lignina es el segundo compuesto orgánico más abundante en la superficie de la Tierra. Representa más del 20% de la biomasa de las plantas, siendo una de las moléculas orgánicas más recalcitrantes. La lignina da soporte estructural a los tejidos de las plantas e impermeabilidad a los elementos vasculares, y proporciona resistencia frente al ataque de microorganismos y el estrés mecánico.

La lignina es un polímero aromático tridimensional sintetizado a partir de la fenilalanina a través de la ruta de los ácidos cinámicos (Higuchi, 1997; Boerjan et al., 2003). De esta forma se sintetizan los alcoholes, *p*-cumarílico (4-hidroxicinámico), coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinámico) y sinapílico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico), que actúan como precursores de la lignina (**Fig. 5**). Su polimerización deshidrogenativa da lugar respectivamente a las unidades 4-hidroxifenilpropano (H), guayacilpropano (G) y siringilpropano (S). Recientemente se ha descrito la existencia de otro tipo de monómeros, tales como los alcoholes *p*-hidroxicinámicos acetilados en el carbono- $\gamma$  de la cadena lateral (Lu y Ralph, 2002; del Río et al., 2004).



**Fig. 5.** Alcoholes *p*-hidroxicinamílicos.

En la polimerización de los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos participan peroxidadas y/o fenoloxidasas de la pared vegetal, a esta polimerización le siguen una serie de reacciones de condensación de radicales aromáticos y nuevas oxidaciones enzimáticas de los dímeros y oligómeros formados, hasta la formación del polímero de lignina.

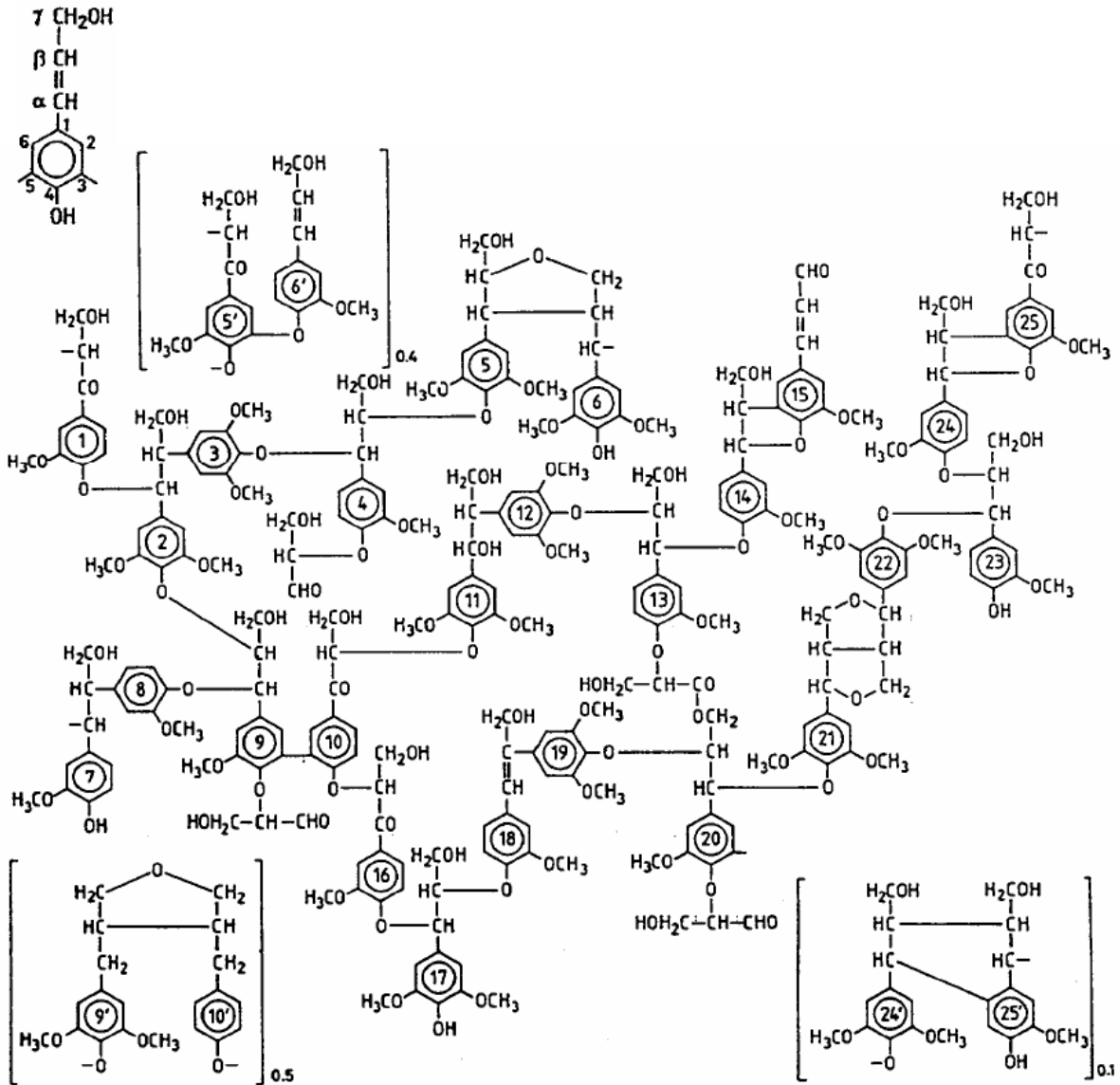
El tipo de unidades presentes en la lignina, así como los tipos de unión entre las mismas puede variar entre los distintos grupos de plantas. Incluso en una misma planta la composición de la lignina puede variar en los distintos tejidos y capas de la pared celular. La lignina de coníferas se forma mayoritariamente a partir del alcohol coniferílico (unidad G), mientras que la lignina de frondosas se sintetiza a partir de los alcoholes coniferílico y sinapílico (unidades G y S, respectivamente). La lignina de las plantas herbáceas está compuesta de unidades H procedentes del alcohol *p*-cumarílico, además de las unidades G y S en distintas proporciones.

En la composición de la pared celular de las plantas herbáceas participan los ácidos *p*-hidroxicinámicos (principalmente *p*-cumárico y ferúlico). Estos ácidos contribuyen a la unión de la lignina con la hemicelulosa mediante enlaces tanto éster como éter por reacción de sus grupos carboxilo e hidroxilo fenólico (**Fig. 4**) (Sun et al., 2002). En estas plantas el ácido ferúlico es el principal responsable de los puentes entre la lignina y los polisacáridos. De un 40 a un 70% del ácido ferúlico está eterificado con la lignina formando un puente de unión con los polisacáridos a los que se une por enlaces éster. Sin embargo, un 70% del ácido *p*-cumárico está solamente esterificado con la posición y de la cadena lateral de las unidades de la lignina.

Los primeros modelos de la estructura de la lignina de coníferas (Adler, 1977) y frondosas (Nimz, 1974), se publicaron en los años 70 (**Fig. 6**). Estos modelos incluyen más de doce tipos diferentes de enlaces (entre los que predominan los de tipo éter), dando lugar a diferentes subunidades. Entre estas subunidades, habría que mencionar una que contiene un anillo octogonal de dioxocina que ha sido identificada en ligninas de coníferas (Karhunen et al., 1995), frondosas (Ammalahti et al., 1998) y plantas anuales (Galkin et al., 1997). Hay que señalar que no existen modelos detallados de la lignina de las plantas herbáceas, excepto algunas aproximaciones (Sun et al., 1997).

La **Fig. 6**, muestra un modelo esquemático de lignina de frondosas con unidades S y G, formando diferentes estructuras diméricas mediante uniones  $\beta$ -O-4',  $\alpha$ -O-4',  $\beta$ -1',  $\beta$ -5' (fenilcumarano) y  $\beta$ - $\beta'$  (pino/siringa-resinol).

I. INTRODUCCIÓN

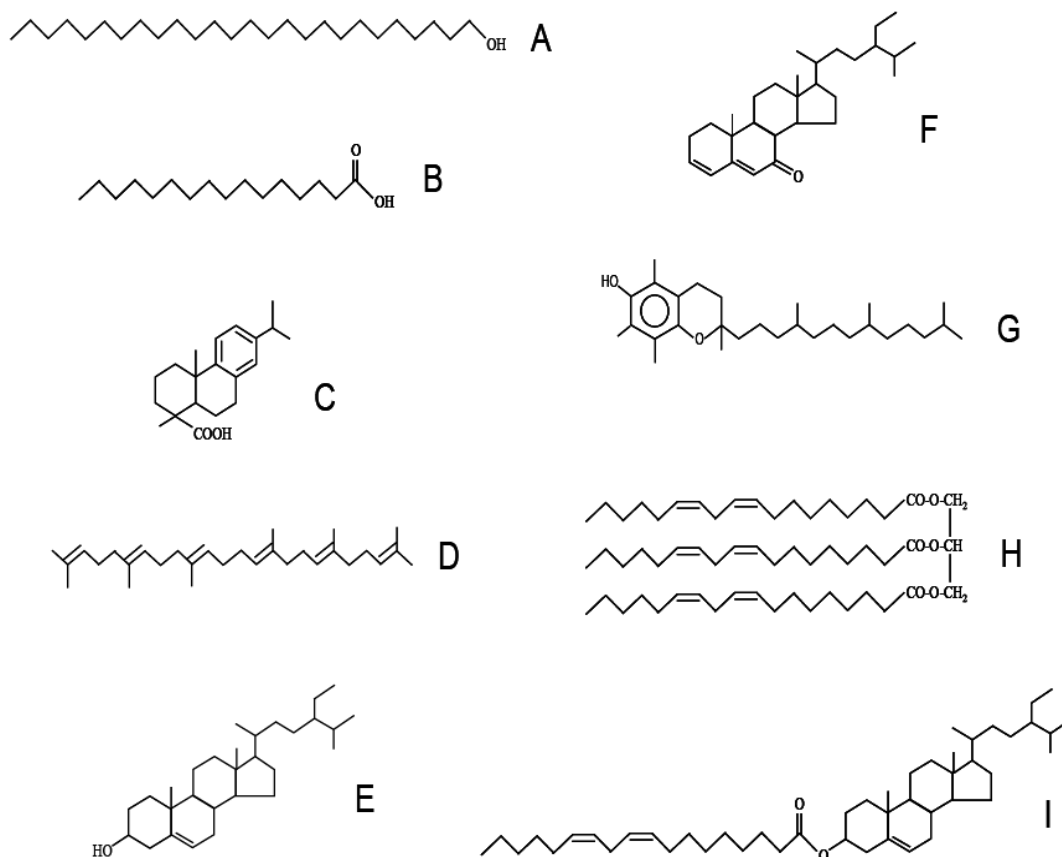


**Fig. 6.** Primer modelo estructural de lignina de angiospermas (haya), en el que se pueden observar diferentes tipos de uniones entre unidades:  $\beta$ -O-4' (entre 2 y 9);  $\alpha$ -O-4' (entre 1 y 2);  $\beta$ -1' (entre 7 y 8);  $\beta$ -5' y  $\alpha$ -O-4' (fenilcumarano) (entre 14 y 15);  $\beta$ - $\beta'$  y  $\alpha$ -O- $\gamma'$  (siringaresinol) (entre 21 y 22); 5-5' (entre 9 y 10) (Nimz, 1974). Se indica la nomenclatura de los distintos carbonos en la parte superior del modelo, a la izquierda.

### 1.4. Compuestos extraíbles

La biomasa vegetal incluye también una fracción de bajo peso molecular soluble en solventes orgánicos que engloba diferentes compuestos lipofílicos y polares. Una de las principales funciones de los compuestos extraíbles es la protección de la planta frente a agentes patógenos. La baja degradabilidad de muchos de estos compuestos contribuye a este fin, pero también origina problemas en ciertos aprovechamientos industriales de la biomasa vegetal.

Los extraíbles polares engloban diferentes compuestos fenólicos libres de bajo peso molecular, lignanos, taninos y flavonoides, entre otros. Los compuestos fenólicos libres incluyen precursores de la lignina (ácidos *p*-hidroxicinámicos y aldehídos *p*-hidroxicinámicos), ácidos bencenocarboxílicos relacionados, aldehídos y cetonas aromáticas.



**Fig. 7.** Estructuras de algunos extraíbles lipofílicos presentes en materiales lignocelulósicos: hexacosanol (A), ácido palmítico (B), ácido dehidroabiético (C), escualeno (D), β-sitosterol (E), estigmasta-3,5-dien-7-ona (F), α-tocoferol (G), trilinoleína (H) y sitosteril linoleato (I).

Muchas especies vegetales contienen cantidades significativas de extraíbles polares, sin embargo la fracción lipofílica es predominante en algunas de ellas. Además cuando estas especies vegetales se usan para la fabricación de pasta de papel, estos compuestos lipofílicos deben tenerse en cuenta ya que pueden deteriorar significativamente la calidad de la pasta. Entre estos compuestos se encuentran los ácidos grasos libres, alcoholes grasos libres, hidrocarburos, ceras, grasas, terpenos y esteroides (**Fig. 7**). Las ceras se definen como ésteres de ácidos grasos con alcoholes de cadena larga, mientras que las grasas son ésteres de ácidos grasos con glicerol. Los triglicéridos se encuentran entre los principales constituyentes de la fracción lipofílica de los extraíbles de muchas maderas. Los principales ácidos grasos esterificados en grasas y ceras son los ácidos oleico, linoleico y linolénico, junto con porcentajes muy inferiores de los ácidos palmítico y esteárico, entre otros. Entre los compuestos de tipo diterpeno se encuentran los ácidos resínicos que son muy abundantes en la madera de coníferas y están ausentes en las de frondosas. Los esteroides son los esteroides más abundantes en la madera pero también existen cetonas e hidrocarburos esteroidales. Los esteroides pueden encontrarse libres o esterificados con ácidos grasos, siendo en ambos casos el sitosterol el principal esteroide, tanto en coníferas como en frondosas. El sitosterol y los ésteres de sitosterol son compuestos de alto grado de “pegajosidad” por lo que a menudo se encuentran en el origen de los depósitos de “pitch” (brea), que se forma por la acumulación de extraíbles lipofílicos durante la fabricación de pasta de papel, tal como se describe en los siguientes apartados.

## 2. Proceso de obtención de la pasta de papel

En el proceso de elaboración de la pasta de papel se separan las fibras de celulosa del resto de los componentes de la madera, lignina fundamentalmente. El fundamento principal del proceso es la eliminación de la lignina afectando lo mínimo posible la pared secundaria de las fibras. El proceso de pasteado u obtención de una suspensión de fibras en agua, consta de varias fases:

- Preparación de la materia prima: son operaciones tales como el lavado de troncos, corte, descortezado y astillado que facilitan el tratamiento posterior.
- Obtención de la pasta: se realizan de diversas formas (por métodos químicos, mecánicos y químico-mecánicos), según la calidad que se desea obtener.
- Lavado: se realiza para eliminar las sustancias disueltas que acompañan la pasta.
- Depuración y acondicionamiento: las fibras se tratan para dejarlas sin sustancias extrañas y con un tamaño y espesor adecuado para procesos posteriores.
- Blanqueo: consiste en la eliminación de la lignina residual y componentes coloreados de la pasta.

### 2.1. Pastas mecánicas

El tratamiento mecánico tiene como objetivo la disgregación y separación física de las fibras. La lignina que une la celulosa a las hemicelulosas no se disuelve. Las especies más utilizadas para la fabricación de pasta mecánica son las maderas de coníferas, pero también se han usado frondosas. La fabricación de pastas mecánicas ofrece la ventaja de dar como resultado rendimientos elevados (90-95%).



## 2.2. Pastas químicas

En el pasteado o cocción química, la deslignificación se lleva a cabo con la ayuda de agentes químicos ácidos o básicos, en digestores o reactores a altas temperaturas y elevadas presiones. Se produce la disolución de la lignina que se encuentra entre las fibras del material lignocelulósico, sin dañar sustancialmente la celulosa. En el pasteado químico, ya que la lignina y las hemicelulosas se pierden, los rendimientos son normalmente de 40 a 60%, el producto es más resistente y de mejor calidad. Los métodos químicos se dividen en ácidos o alcalinos dependiendo del pH del reactivo.

### ▪ Proceso a la sosa

Es el más antiguo y el más simple de los procesos químicos alcalinos. El proceso de cocción se realiza con sosa cáustica y vapor a alta presión y temperatura. Esta operación se efectúa en digestores continuos. El hidróxido de sodio, o sosa cáustica, es un producto muy útil para la deslignificación de materias primas vegetales, principalmente de maderas, pajas de cereales y plantas fibrosas en general. Además de la sosa cáustica, en el proceso de cocción se usa antraquinona (AQ), proceso a la sosa-AQ, que funciona como catalizador. Este aditivo presenta dos efectos fundamentales como son la aceleración del proceso de deslignificación alcalino y la estabilización de los carbohidratos, mejorando además los rendimientos respecto al proceso convencional en las mismas condiciones de operación.

### ▪ Proceso kraft o al sulfato

El proceso kraft para la obtención de pasta de papel es un proceso químico alcalino que deriva del proceso a la sosa. En este proceso, además de hidróxido de sodio se utiliza el sulfuro sódico, siendo estos agentes de cocción conocidos como lejías blancas. El proceso se lleva a cabo en digestores que pueden ser tanto discontinuos como continuos, en los que se introducen las astillas junto a las lejías blancas llevándose a cabo la cocción a elevada temperatura (150-170°C) y presión. De un modo general el proceso tiene lugar con una concentración de reactivos del 16-20% (expresados como peso de Na<sub>2</sub>O, en relación al peso de la madera) y sus rendimientos varían entre un 40 y 60%. La ventaja de este proceso es que requiere tiempos de cocción relativamente bajos pues el sulfuro acelera la deslignificación reduciendo la degradación del material celulósico y produciendo así pastas de mejor calidad. La resistencia es su principal característica de donde deriva su nombre “kraft”, del alemán resistencia.

### ▪ Proceso al sulfito ácido

Este proceso se fundamenta en una deslignificación con sulfitos y bisulfitos, siendo el segundo grupo más utilizado en los procesos químicos de obtención de pasta de papel. Está limitado en cuanto a los tipos de madera que se pueden utilizar y por la contaminación creada al eliminar la lejía negra residual sin tratar (tratamiento muy caro). A pesar de ocurrir la digestión en medio ácido, existen variantes en las que se utilizan un medio neutro o un medio alcalino. La lejía de cocción es de ácido sulfuroso y bisulfito de calcio. En estos procesos también se degradan los hidratos de carbono por separación de los enlaces glicosídicos, lo que provoca una disminución del grado de polimerización todavía mayor que en los procesos kraft siendo la pasta resultante menos resistente, pero por lo contrario estas pastas son más fáciles de blanquear.

### 2.3. Pastas químico-mecánicas

Las pastas químico-mecánicas se obtienen por desfibrado de las maderas de frondosas o coníferas en desfibradores del tipo clásico, habiendo la madera sufrido previamente un tratamiento químico. La materia prima se introduce en autoclaves horizontales y se somete a la acción de productos químicos, siendo lo más usado una solución caliente de bisulfito sódico. La pasta pasa después por desfibradores, seguidamente se lava y se blanquea. La pasta resultante es semejante a la pasta mecánica, pudiéndose no obstante utilizar maderas de frondosas que no sirven como materia prima para la fabricación de pasta mecánica.

### 2.4. Proceso de blanqueo de la pasta

En el proceso de blanqueo se trata químicamente la pasta de celulosa para eliminar la lignina residual que queda después del proceso de cocción y que hace que la pasta presente un color oscuro como consecuencia de las reacciones de oxidación durante la cocción. Los componentes coloreados de la lignina son degradados, disueltos y/o decolorados. Todo el material coloreado, en el caso de las pastas químicas no puede ser eliminado en una sola etapa, se trata por tanto de un procedimiento multietapas. En este proceso se utilizan dos tipos de reactivos: oxidantes, que se emplean para degradar y decolorar la lignina; y el álcali, que se emplea para degradar la lignina, para hidrolizar y para facilitar su disolución posterior. El proceso de blanqueo se lleva a cabo hasta el punto de blancura que se pretende, por lo que el número de etapas dependerá de la calidad de la pasta que se desea obtener, utilizándose comúnmente cinco fases de blanqueo, donde entre cada dos fases de blanqueo hay una etapa de extracción donde se neutraliza la pasta. Los reactivos comerciales más utilizados para el blanqueo han sido el cloro gas, el hipoclorito, el peróxido de hidrógeno y el dióxido de cloro; y el único álcali utilizado comercialmente es el hidróxido de sodio que se usa en la operación de extracción alcalina.

El cloro es el mejor reactivo para eliminar la lignina, pero tiene problemas ambientales por la formación de compuestos organoclorados. En la actualidad, a causa de la imposición de límites estrictos en la emisión total de compuestos clorados orgánicos y dioxinas en los efluentes de las plantas de blanqueo, ya que son calificados como contaminantes prioritarios por la EPA, por su persistencia en el suelo y en el agua, se están imponiendo cada vez más las secuencias de blanqueo que eliminan parcialmente (ECF: Elementary-Chlorine Free) o totalmente (TCF: Totally Chlorine Free) el uso de compuestos clorados. Para esto se están usando procesos de blanqueo que utilizan dióxido de cloro, oxígeno, ozono y peróxido de hidrógeno.

#### **Blanqueo convencional:**

Utiliza  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{ClO}_2$ ,  $\text{NaOH}$  en diferentes secuencias y proporciones. Se generan compuestos organoclorados, incluyendo dioxinas. Éstas últimas no se generan cuando se usa  $\text{ClO}_2$ , en lugar de  $\text{Cl}_2$ .

#### **Blanqueo ECF (libre $\text{Cl}_2$ ):**

No utiliza  $\text{Cl}_2$ , es reemplazado por  $\text{ClO}_2$ . También se puede incluir  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ . Si se incluye una etapa de predesignificación, el consumo de  $\text{ClO}_2$  puede disminuir en un 40%. Los efluentes contienen AOX, pero no dioxinas.

**Blanqueo TCF (libre de Cl total):**

No utiliza cloro en ninguna forma. Las secuencias de blanqueo TCF incluyen combinaciones de algunos de los siguientes agentes de blanqueo  $H_2O_2$ ,  $O_2$ ,  $O_3$  y pueden incluir enzimas. Los efluentes no contienen organoclorados, pero sí otros compuestos fenólicos, y podrían ser recirculados al ciclo de recuperación de reactivos, descargando solamente aquellas líneas residuales de baja concentración orgánica.

**3. Problemas durante la producción de pasta de papel: lignina y lípidos**

La fabricación de pastas de papel mediante tecnologías menos contaminantes ha traído consigo nuevos problemas en el blanqueo de la pasta, que no se daban al utilizar reactivos más agresivos (aunque también más contaminantes) y/o en sistemas con un menor grado de cierre en los circuitos.

La acción deslignificante del oxígeno se conoce desde hace tiempo pero el desarrollo del blanqueo con oxígeno ha sido bastante lento por la degradación de la celulosa y demás polisacáridos de la madera. Como consecuencia, el blanqueo con oxígeno viene acompañado a menudo por pérdidas de rendimiento y viscosidad de la pasta. Las ventajas del peróxido se apoyan en su facilidad de aplicación, su versatilidad y la naturaleza relativamente inocua de los productos de la reacción. Uno de los problemas que ha surgido con la introducción de estos reactivos está relacionado con la blancura de las pastas, porque de momento ni el oxígeno ni la combinación de oxígeno y peróxido pueden igualar la eficacia de la cloración para la eliminación de los productos derivados de la lignina, responsable del color de la pasta. La modificación de los procesos de cocción, con objeto de obtener pastas con menores contenidos en lignina, representa otra alternativa para facilitar el blanqueo de las pasta.

Por otro lado, los extractos de la madera (aquellos compuestos que se extraen de la madera con disolventes orgánicos) causan problemas medioambientales y de producción, en las industrias de pasta y papel. Los compuestos lipofílicos, también llamados resinas de la madera, son los más problemáticos, y en ellos se incluyen los ácidos grasos libres, los ácidos resínicos, las ceras, alcoholes, esteroides, ésteres de esteroides, glicéridos, cetonas y otros compuestos oxidados (Hillis, 1962; Fengel y Wegener, 1984; Rowe, 1989; Gutiérrez et al., 1999), tal como se ha descrito anteriormente. La **Tabla 1** muestra la composición de los extractos lipofílicos de varias maderas de angiospermas (frondosas) y gimnospermas (coníferas). Además existen diferencias entre el contenido de resinas y su composición entre las diferentes partes del árbol, dependiendo de la edad del árbol, de las condiciones de crecimiento y de otros factores genéticos y medioambientales (Back, 2000).

Durante la producción y refinado de la pasta de papel, los compuestos lipofílicos de las células del parénquima y la resina de los canales de las coníferas, se liberan formando el llamado “pitch” coloidal. Estas partículas coloidales pueden unirse y formar gotas, que se depositan en la pasta o en la maquinaria, formando los “depósitos de pitch”, o pueden permanecer en suspensión en las aguas del proceso. Los depósitos de “pitch”, dan lugar a pastas de baja calidad y pueden obligar a realizar paradas técnicas en las máquinas de las industrias (Hillis, 1989). Los principales problemas que causa el “pitch” son las pérdidas económicas como resultado de las pastas contaminadas, las pérdidas de producción y el coste de los aditivos de control del “pitch” (Allen, 2000). Además, la necesidad de recircular el agua en los circuitos de las fábricas, conduce a un aumento en la concentración del “pitch”, cuyo resultado es un mayor número de depósitos. Muchos de estos compuestos estaban presentes en

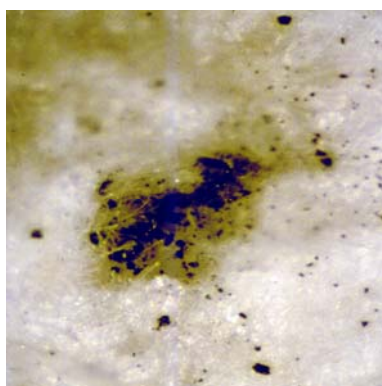
## I. INTRODUCCIÓN

concentraciones más bajas cuando se utilizaban volúmenes de agua mayores en el lavado de la pasta y menor grado de cierre en los circuitos.

**Tabla 1.** Composición de los extractos lipofílicos de la madera de pino, picea, abedul, álamo y eucalipto ( $\text{mg.g}^{-1}$ ). ( Gutiérrez et al., 2001)

	Coníferas		Frondosas		
	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Picea abies</i>	<i>Betula verrucosa</i>	<i>Populus tremula</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
Ácidos grasos libres	1.73	0.78	-	1.06	0.28
Ácidos resínicos	6.65	2.85	0.06	0.17	0
Hidrocarburos	0.74	0.19	0.40	1.14	0.17
Ceras y ésteres de esteroides	0.83	0.87	1.96	3.07	0.57
Monoglicéridos	0.18	0.55	2.24	1.18	0.02
Diglicéridos	0.32	0.55	1.72	0.58	0.02
Triglicéridos	8.74	1.94	8.10	10.37	0.13
Alcoholes y esteroides	1.39	1.00	1.56	2.40	0.68
Compuestos oxidados	0.43	1.36	2.94	1.53	0.22
Compuestos lipofílicos	22.9	10.4	20.3	22.7	2.60
Total del extracto de acetona	31.0	22.2	34.6	45.3	15.2

Generalmente el término “pitch” se aplica tanto a los extraíbles lipofílicos de la madera, como a los depósitos que estos lípidos causan durante el proceso de fabricación de la pasta y el papel (**Fig. 8**).



**Fig. 8.** Depósitos de “pitch” en una pasta de papel.

Además, algunos de los extractos de la madera podrían tener un impacto negativo sobre el medioambiente cuando son transportados en las aguas de lavado de las fábricas. Esto es especialmente importante en los modernos procesos de producción de pasta que intentan ser respetuosos con el medioambiente. En estos procesos, el blanqueo con cloro ha sido sustituido por blanqueo libre de cloro elemental (ECF) o por blanqueo libre de cloro total (TCF). En los procesos TCF, los ácidos grasos, los ácidos resínicos y los esteroides de la madera, están presentes en los líquidos de proceso, y se convierten en la primera fuente de toxicidad cuando se liberan al medioambiente (Leach y Thakore, 1976; Liss, 1997).

Los problemas de “pitch” dependen de los extractos en las diferentes tipos de madera y del tipo de proceso utilizado en la producción de la pasta y en el blanqueo. También habría que considerar la variabilidad de los problemas de “pitch” de una fábrica a otra, y también en las distintas zonas de una fábrica. Los depósitos de “pitch” en las pastas mecánicas, muestran una composición similar a los extractos lipofílicos de la madera usada como materia prima. En la pasta kraft, la cantidad total de extractos en la madera, podría no ser tan importante como la presencia de compuestos específicos que resisten las condiciones de cocción. Bajo estas condiciones, los ésteres de glicerol se saponifican y los ácidos grasos y resínicos se disuelven. Sin embargo, los ésteres de esteroides y las ceras, se saponifican más lentamente que los ésteres de glicerol. Los ésteres de esteroides, las ceras y los esteroides libres no forman jabones solubles como hacen los ácidos libres, si no que por el contrario, tienen tendencia a depositarse.

El blanqueo ECF de pastas químicas, puede reducir los problemas de “pitch” asociados con resinas cloradas, producidas durante el blanqueo con cloro (Brush et al., 1994). Sin embargo, muchos de los extractos que se degradan en el tratamiento con dióxido de cloro, representan una fuente específica de problemas de pitch en el blanqueo TCF, porque no se ven afectados por el peróxido de hidrógeno. Durante el blanqueo TCF de la pasta kraft de eucalipto, se encontró que el sitosterol y los ésteres del sitosterol, eran los principales compuestos responsables de la formación de los depósitos de “pitch”.

## **4. Soluciones biotecnológicas**

### **4.1. Biodegradación de la lignina**

La lignina es uno de los compuestos orgánicos naturales más recalcitrante a la biodegradación. Cuando las plantas mueren, su biomasa se incorpora al suelo, y este material debe ser biodegradado y reciclado por los microorganismos, para mantener el ciclo natural del carbono (Crawford, 1981; Eriksson et al., 1990; Kirk y Cullen, 1998; Pérez et al., 2002; Martínez et al., 2005; Goodell et al., 2006). Por esta razón los organismos ligninolíticos deben ser tenidos en cuenta, para el desarrollo de nuevas tecnologías que no degraden el medioambiente, en la fabricación de pasta de papel.

#### **4.1.1. Hongos ligninolíticos**

Los hongos son organismos heterótrofos que se alimentan por absorción. Para la obtención de nutrientes, liberan al medio enzimas extracelulares, hidrolíticas y oxidativas, que degradan parcialmente los diferentes constituyentes de la lignocelulosa para ser incorporados al interior de las células y metabolizados.

## I. INTRODUCCIÓN

Los hongos ligninolíticos son los únicos organismos capaces de despolimerizar y mineralizar el polímero de lignina (Crawford, 1981; Hammel, 1997). Se clasifican en cuatro grupos diferentes, atendiendo al tipo de degradación que ejercen sobre el sustrato colonizado (Zabel y Morrel, 1992; Schwarze et al., 2000; Martínez et al., 2005):

### **Hongos de podredumbre blanca**

Este tipo de podredumbre es realizada por hongos basidiomicetos y algunos ascomicetos, y es la podredumbre más frecuente en la degradación de la madera. Estos hongos degradan la lignina, la celulosa y la hemicelulosa. Los hongos de podredumbre blanca realizan dos tipos de degradaciones diferentes, pueden degradar la lignina de forma selectiva o simultáneamente con la celulosa (Otjen y Blanchette, 1986).

### **Hongos de podredumbre parda**

Son fundamentalmente basidiomicetos que degradan principalmente madera de coníferas, que adquiere un aspecto cuarteado (cúbico). Estos hongos atacan principalmente los polisacáridos de la madera, con una mínima degradación de la lignina. La madera toma un color marrón debido a la presencia de lignina oxidada.

### **Hongos de podredumbre blanda**

Este grupo está formado por ascomicetos y deuteromicetos, que colonizan y degradan la madera en contacto con el suelo, en procesos generalmente asociados a bacterias. Degradan principalmente los polisacáridos con una alteración mínima de la lignina.

### **Hongos que tiñen la madera**

Este grupo de hongos está formado por una serie de ascomicetos (pertenecientes a los géneros *Ophiostoma* y *Ceratocystis*, entre otros), y deuteromicetos (pertenecientes a los géneros *Aureobasidium*, *Phialophora* y *Trichoderma*, entre otros), estos hongos utilizan generalmente los nutrientes de reserva, almacenados en las células de las plantas, pero no producen una degradación significativa de la pared celular. Degradan principalmente los lípidos, los azúcares y el almidón de la madera, con una mínima degradación de la lignina. La madera degradada adquiere diferentes colores, normalmente negro en maderas de angiospermas y azul en el caso de las gimnospermas (Blanchette et al., 1990). Investigaciones más recientes (Encinas et al., 1998), señalan que algunos de estos hongos ocasionan mayor grado de degradación en la pared celular y por lo tanto cambios en las propiedades de resistencia de la madera.

## **4.1.2. Enzimas ligninolíticas**

Los hongos ligninolíticos han desarrollado un sistema bastante inespecífico, extracelular y de naturaleza oxidativa para la degradación de la lignina. Este proceso se ha descrito como una “combustión enzimática” (Kirk y Farrel, 1987). El sistema incluye diferentes tipos de enzimas: peroxidasas de elevado potencial rédox (lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y peroxidasa versátil), lacasas con actividad fenoloxidasa y oxidasas que aportan peróxido de hidrógeno, junto con compuestos de bajo peso molecular que actúan como mediadores rédox, entre otras funciones (Hatakka, 2001; Higuchi, 2004; Cullen y Kersten, 2004; Martínez et al., 2005).

### **Lignina peroxidasa (LiP) y Manganese peroxidasa (MnP)**

La lignina peroxidasa fue descubierta a mediados de los ochenta en *P.chrysosporium* y descrita como verdadera ligninasa a causa de su alto potencial rédox (Gold et al., 2000; Martínez, 2002). La lignina peroxidasa es una hemoproteína de alto potencial rédox, capaz de catalizar la oxidación de la lignina tras la activación del hierro del grupo hemo por el peróxido de hidrógeno. La LiP degrada las unidades de las ligninas fenólicas o no fenólicas (más del 90% del polímero), mientras que la MnP genera  $Mn^{3+}$ , los cuales actúan como oxidantes de las unidades de lignina fenólicas y en algunos casos es capaz de actuar sobre las unidades no fenólicas, vía reacciones de peroxidación de lípidos (Jensen et al., 1996).

Más recientemente, la peroxidasa versátil (VP) (**Fig. 9A**) se ha descrito en *Pleurotus* (Martínez et al., 1996; Ruiz et al., 1999) y otros hongos, como un tercer tipo de enzima ligninolítica, que combina las propiedades catalíticas de la LiP, MnP y las peroxidases de plantas y microorganismos que oxidan a los compuesto fenólicos (Heinfling et al., 1998). La VP fue descrita por primera vez en *Pleurotus eryngii*, un hongo caracterizado por su capacidad para deslignificar diferentes materiales lignocelulósicos (Martínez et al., 1994a), pero posteriormente se ha encontrado también en otras especies de los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera*. Esta nueva peroxidasa constituye un interesante modelo de estudio en el que se han identificado las bases estructurales de la oxidación de diferentes sustratos (Ruiz-Dueñas et al., 1999; Camarero et al., 1999; Banci et al., 2003; Pérez-Boada et al., 2005; Pogni et al., 2006).

### **Lacasas**

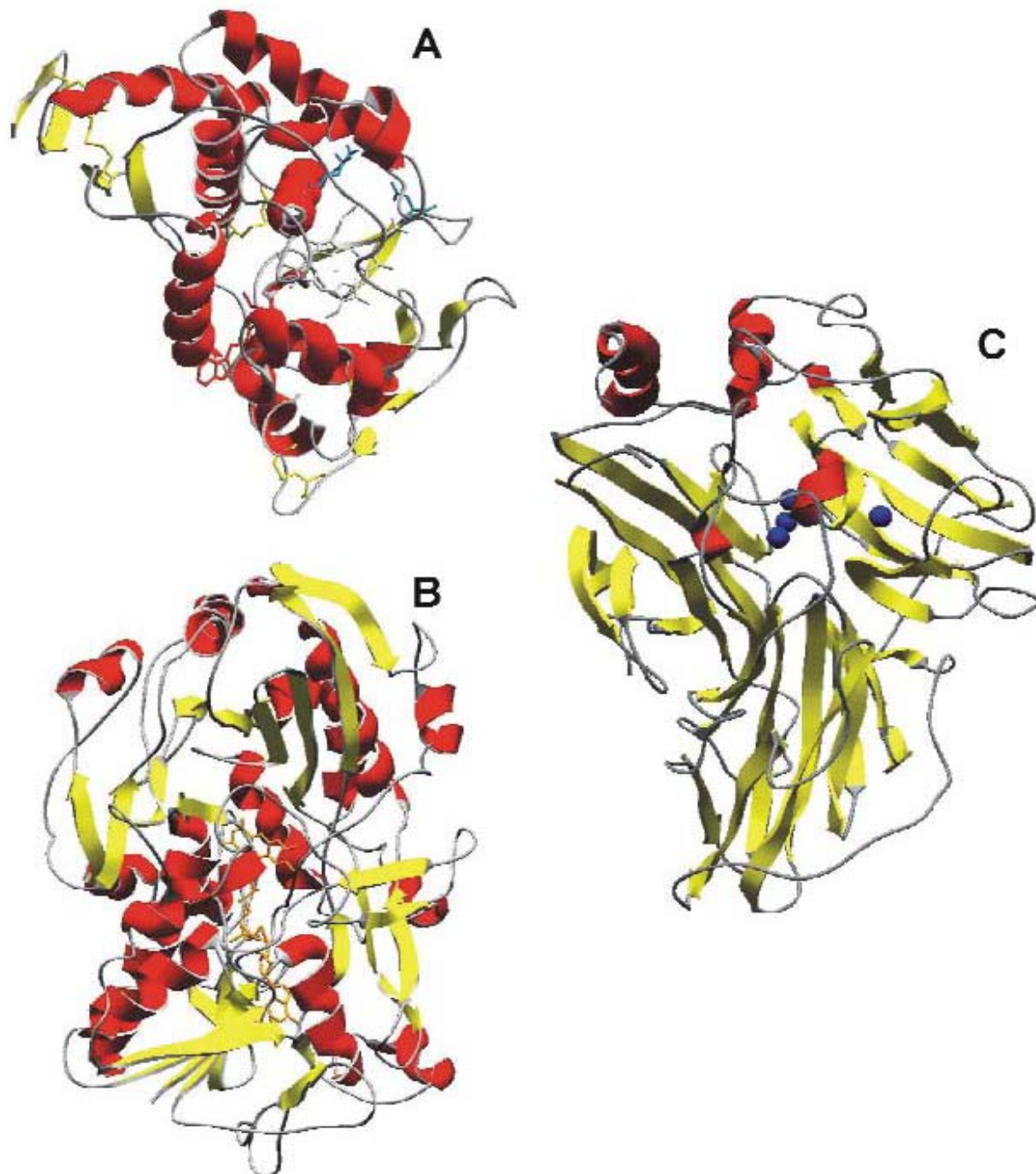
Las lacasas (**Fig 9C**) se conocen desde hace muchos años en plantas, hongos e insectos, donde desarrollan una gran variedad de funciones, incluyendo la síntesis de pigmentos, la morfogénesis de la fruta y la detoxificación (Mayer y Staples, 2002). Su presencia constituye una característica típica de los hongos de podredumbre blanca (Käärik, 1965). Son fenoloxidasas que tienen un bajo potencial rédox, que permite sólo la oxidación directa de las unidades fenólicas de la lignina, que constituyen menos del 10% del polímero. El interés por las aplicaciones biotecnológicas de las lacasas aumenta, cuando se descubre su capacidad de oxidar sustratos de alto potencial rédox, en presencia de mediadores rédox, que se comportan como transportadores de electrones difusibles entre la lignina y la enzima (Bourbonnais y Paice, 1990), lo que permite la degradación de compuestos xenobióticos (Rodríguez et al., 2004) y el blanqueo libre de cloro de la pasta de papel (Camarero et al., 2005).

### **Oxidasas productoras de $H_2O_2$**

Las oxidasas constituyen una fuente de  $H_2O_2$ , que se forma en los procesos reductores de su ciclo catalítico. Se ha sugerido que la glucosa oxidasa, metanol oxidasa o piranosa oxidasa, podrían aportar el  $H_2O_2$  requerido por las peroxidases ligninolíticas (Cullen y Kersten, 2004). Sin embargo la mayor parte de los estudios sobre producción de  $H_2O_2$  en *P. chrysosporium*, se han centrado en la enzima extracelular glioxal oxidasa (Kersten y Kira, 1987). Esta enzima, parece que no la producen varios hongos que degradan activamente la lignina, incluyendo las especies de los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera*, mencionados anteriormente como productores de VP. En su lugar estos hongos producen otra oxidasa extracelular llamada aril-alcohol oxidasa (AAO) (Guillén et al., 1992) (**Fig. 9B**). Mientras que en la glioxal oxidasa el cofactor es un ión cobre

## I. INTRODUCCIÓN

(Whittaker et al., 1996), en la AAO es una molécula de flavina (Ferreira et al., 2005). La enzima fúngica aril-alcohol deshidrogenasa (AAD) y la quinona reductasa (QR), participan también en la degradación de la lignina (Guillén et al., 1997; Gutiérrez et al., 1997).

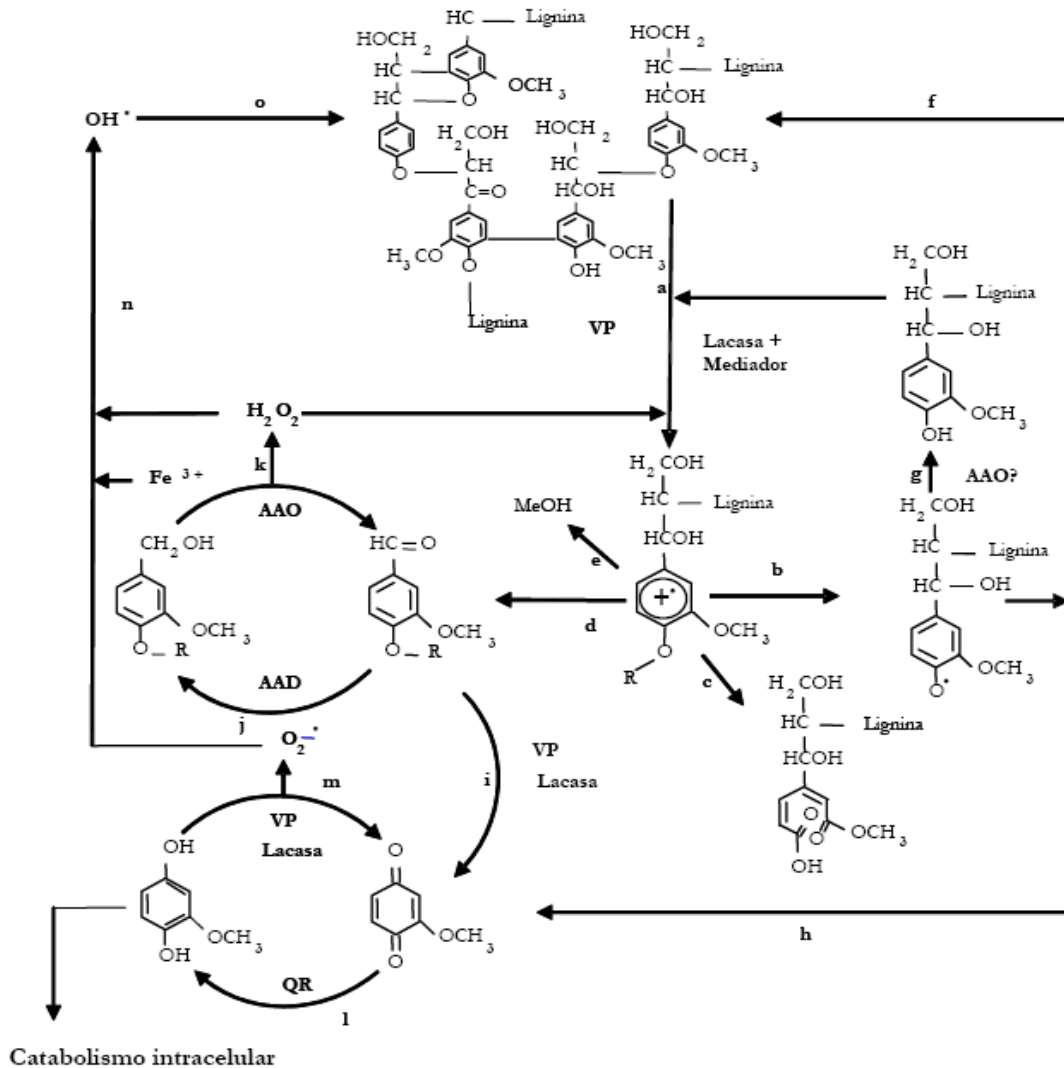


**Fig. 9.** Estructuras moleculares de las enzimas que actúan en la biodegradación de la lignina. (A) Estructura cristalina de la peroxidasa versátil a 1.13Å de resolución, incluyendo el cofactor Hemo, el catión  $Mn^{2+}$  (a la derecha), y el sustrato aromático (a la izquierda), en los sitios de oxidación. (B) Modelado molecular por homología de AAO, una flavoenzima que proporciona  $H_2O_2$  a las peroxidases ligninolíticas. (C) Estructura cristalina de la lacasa activa, a 1.90 Å de resolución, con sus tres cobres catalíticos (Martínez et al., 2005).



### 4.1.3. Principales reacciones en la biodegradación de la lignina

Como se muestra en la **Fig. 10**, (a) las lacasas o las peroxidadas ligninolíticas (LiP, MnP y VP), oxidan las unidades de lignina (no fenólicas); (b) rotura del enlace éter en el C4 formándose un radical fenoxilo; (c) apertura del anillo aromático; (d) rotura C $\alpha$ -C $\beta$ , formándose un grupo carbonilo; (e) reacciones de desmetilación / desmetoxilación; (f) repolimerización de radicales aromáticos; (g) reducción de radicales fenoxilos; (h-i) formación de quinonas / hidroquinonas; (j) reducción de aldehídos aromáticos por AAD; (k) oxidación de alcoholes aromáticos por la AAO con producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (l) reducción de quinonas por quinonas reductasas (QR); (m) oxidación de quinonas o hidroquinonas por lacasa o VP vía semiquinonas con reducción del O<sub>2</sub> a anión superóxido O<sub>2</sub><sup>•-</sup>; (n) generación de OH<sup>•</sup> por reacción de Fenton; (o) ataque no enzimático a la lignina por el OH<sup>•</sup>, cuando las enzimas ligninolíticas no pueden penetrar en la pared celular debido a los impedimentos estéricos que presenta su estructura compacta.



**Fig. 10.** Esquema de la degradación de la lignina por *Pleurotus* y otros hongos (Martínez et al., 2005).

## 4.2. Control del pitch

### 4.2.1. Almacenamiento al aire libre de la madera

Tradicionalmente, los depósitos de “pitch” en las industrias de pasta de papel, se han reducido por almacenamiento al aire libre de los troncos (con corteza o sin corteza) o de las astillas. Se sabe que el almacenamiento reduce el contenido en resinas de la madera y permite cambios en el estado de las mismas. Durante el almacenamiento, algunos extractos se pierden por procesos oxidativos, y por hidrólisis realizadas por las enzimas de las plantas, también por la acción de los organismos colonizadores. Se han estudiado las reacciones de los componentes de la resina de la madera durante el almacenamiento, para varios tipos de maderas incluyendo la del eucalipto (Ekman, 2000; Gutiérrez et al., 1998a). Se reduce más rápido el contenido de resinas, cuando la madera se almacena en forma de astillas, porque las transformaciones químicas y biológicas ocurren más rápido, al aumentar el área superficial (Hillis y Sumimoto, 1989). Por lo tanto, el almacenamiento de la madera puede reducir los problemas de “pitch” considerablemente, pero depende de las condiciones en las que se realice. Además, los almacenajes prolongados de la madera, pueden producir una disminución en el rendimiento del papel y papel de baja calidad por la acción de los organismos de podredumbre. La ventaja que tiene el almacenamiento, que es la disminución de los problemas de “pitch”, tendrá que ser valorada con las desventajas como son la pérdida de la calidad de la pasta.

### 4.2.2. Biocontrol con *Ophiostoma piliferum* y otros hongos ascomicetos

Se ha sugerido el tratamiento biológico de la madera con hongos, para eliminar los extractos antes de la producción de las pasta y se ha probado en las industrias como una alternativa a los métodos tradicionales para el control del pitch. Se ha comercializado desde 1991 un producto fúngico para la degradación del pitch en la madera (Cartapip®). El pretratamiento biológico, es similar a un proceso del almacenamiento controlado, que se mejora y acelera, usando hongos de la madera seleccionados.

La primera patente sobre biocontrol del pitch, describe el uso de los hongos de los géneros *Penicillium*, *Trichoderma* y *Gliocladium* (Nilsson y Asserson, 1966), pero no aporta información sobre la eficacia en la eliminación de los extractos. Otra patente describe el tratamiento de la madera con ascomicetos del género *Ophiostoma* y *Ceratocystis*. Además de la eliminación de los extractos, se observó una disminución en la blancura debida a la producción de pigmentos oscuros por los hongos. Para solucionar este problema, se usaron unas cepas no pigmentadas de *Ophiostoma piliferum*, que se obtuvieron usando técnicas de genética clásica. El uso de estos hongos que no producían color para el control del pitch, se recogió en varias patentes (Farrell et al., 1992; Farrell et al., 1995), y comercializado por el grupo Clariant, bajo el nombre de Cartapip®.

Para el control del “pitch”, es importante analizar no sólo la eliminación de extracto total, sino también la eliminación de cada uno de los tipos de lípidos. Por ejemplo Cartapip® elimina hasta el 50% de los extractos de eucalipto, pero esto no hace disminuir el pitch durante el proceso kraft, debido a que los compuestos lipofílicos responsables de los depósitos, no son degradados eficientemente. Los triglicéridos son los compuestos más problemáticos en los procesos mecánicos y de sulfito ácido en las pastas de la madera de pino y otras maderas de coníferas. Una disminución del 90% de

estos compuestos, puede obtenerse con el tratamiento de Cartapit<sup>®</sup> en la madera de pino, un porcentaje significativamente más alto que el que se obtiene después del almacenaje (Farrell et al., 1993). Sin embargo, el contenido de ácidos resínicos, ésteres de esteroides y ceras después de dos semanas tratando esta madera con Cartapit<sup>®</sup> es similar al que se obtiene después de almacenaje al aire libre, con las mismas condiciones (Farrell et al., 1993; Chen et al., 1994). A pesar de esta limitación, Cartapit<sup>®</sup> proporciona un control eficiente en los depósitos de pitch en las pastas mecánicas y de sulfito ácido. Este producto abrió el campo del control microbiológico del pitch y los nuevos productos que se tienen que desarrollar para afrontar otros problemas que produce el pitch. Además, en recientes estudios se han encontrado algunas cepas de hongos que presentan mejor rendimiento que Cartapit<sup>®</sup> para eliminar el pitch en las maderas de coníferas.

#### **4.2.3. Biocontrol con hongos basidiomicetos seleccionados**

Los triglicéridos y ácidos grasos son degradados por una gran variedad de hongos, pero los ácidos resínicos, los esteroides libres, los ésteres de esteroides y las ceras, son más recalcitrantes para la degradación microbiológica (Leone y Breuil, 1998; Martínez-Íñigo et al., 2000). Como se ha descrito anteriormente, varias cepas de hongos eliminan algunos de los principales constituyentes de los extractos de la madera de coníferas, sin embargo los mejores resultados en la degradación de los ácidos resínicos, se han obtenido con algunos hongos basidiomicetos de podredumbre blanca (Leone y Breuil, 1998; Martínez-Íñigo et al., 2000; Martínez-Íñigo et al., 1999). Estos hongos degradan a la vez los efluentes del tratamiento de la pasta mecánica, que podrían ser tóxicos. Resultados parecidos se han obtenido en un reciente estudio sobre la biodegradación de los esteroides responsables de los depósitos de “pitch” en las industrias de producción de pasta de eucalipto. Se han estudiado un gran número de especies de hongos (21 ascomicetos, 33 basidiomicetos y 19 hongos conidiales), incluyendo cepas aisladas de la madera de eucalipto (Martínez et al., 1999). Se estudiaron los patrones de degradación de los diferentes compuestos lipofílicos por los hongos (Gutiérrez et al., 1999) y se siguió el tiempo que los hongos tardaban en eliminar estos compuestos, para optimizar el tiempo de duración del tratamiento (Martínez-Íñigo et al., 2000).

En este estudio se probaron varios tipos de hongos ascomicetos, incluyendo Cartapit<sup>®</sup>, sin resultado para el control del “pitch” en la pasta de eucalipto, ya que disminuía la cantidad de ésteres de esteroides, pero aumentaban los esteroides libres. La disminución de los ésteres de esteroides está relacionada con la actividad esterasa producida por estos hongos (Brush et al., 1999). Sin embargo, se seleccionaron varios hongos basidiomicetos por su eficacia en la eliminación de los esteroides y los ésteres de esteroides responsables de los depósitos de “pitch” en el blanqueo TCF. Estos hongos son también capaces de degradar otros esteroides que resisten el tratamiento con dióxido de cloro y son responsables de la formación de los depósitos de “pitch” en el blanqueo ECF (del Río et al., 1998). Se trató madera de eucalipto con basidiomicetos seleccionados y se fabricó pasta de papel con estas maderas tratadas. Las “biopastas” obtenidas contenían un 60-70% menos de sitosterol y ésteres del sitosterol y mantenían sus propiedades ópticas y mecánicas. Los pretratamientos de la madera con estos basidiomicetos, también disminuyen el contenido en lignina. Se ha sugerido la posibilidad de combinar la eliminación de los extractos y de la lignina en el tratamiento biológico de las pastas de madera con hongos de podredumbre blanca (Behrendt y Blanchette, 1997; Blanchette et al., 1998; Messner, 1998). Además, se ha demostrado que el pretratamiento con hongos de la madera, disminuye la posible toxicidad de los

efluentes, debido a la eliminación biológica de algunos de los extractos (Dorado et al., 2000; Martínez et al., 1999; Gutiérrez et al., 1999; Brush et al., 1999; Gutiérrez et al., 2000).

De esta forma, las estrategias para la producción de “biopastas”, incluyen los siguientes objetivos:

- 1) Controlar los depósitos de “pitch”.
- 2) Ahorrar reactivos químicos y energía durante los procesos de producción de la pasta y blanqueo.
- 3) Reducir el impacto medioambiental.
- 4) Mejorar las propiedades ópticas y/o mecánicas de las pastas.

### 4.2.4. Biocontrol con enzimas

El uso de enzimas en las industrias de pasta y de papel ha aumentado rápidamente desde mediados de los ochenta. Aunque muchas de estas aplicaciones están aún en estado de investigación y desarrollo, otras han comenzado ya a aplicarse en las industrias. Uno de los mejores ejemplos del control enzimático del pitch en las pastas mecánicas de coníferas es el uso de lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3), que se puso en práctica a gran escala, en los procesos de producción de papel como una operación de rutina, a comienzo de los noventa. Sin embargo, es importante resaltar que la adición de lipasas a la pasta, constituye una medida preventiva para evitar la formación de depósitos pero no es una medida efectiva para eliminar los depósitos de pitch formados con anterioridad.

Las lipasas son un grupo de hidrolasas que se han caracterizado en una gran variedad de organismos. Son de interés en la formulación de detergentes, en la industria de pasta de papel y en otras aplicaciones industriales (Björkling et al., 1991; Seitz, 1974; Svendsen et al., 1997). El tratamiento de la pasta de papel con lipasas, se comenzó en Japón usando la enzima aislada de una cepa de *Candida cylindracea* (Irie, 1990). Los estudios sobre el tratamiento con la enzima, se continuaron con ensayos en las fábricas, usando una preparación de las lipasas mejoradas, comercializada por Novo Nordisk (actualmente Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca), bajo el nombre de Resinasa<sup>®</sup>; una lipasa recombinante expresada en *Aspergillus oryzae*. La Resinasa<sup>®</sup> hidroliza el 95% de los triglicéridos en la pasta mecánica de pino (*Pinus densiflora*). Además el tratamiento con Resinasa<sup>®</sup> reduce el número de depósitos, disminuye el número de puntos y agujeros en el papel, reduce la dosis de talco para el control de los depósitos de “pitch” y permite el uso de una mayor cantidad de madera fresca. Durante los años siguientes, varias industrias de papel en Japón y China, han introducido la tecnología de control del pitch, basada en las lipasas, en las pastas mecánicas (Hata et al., 1996; Fujita et al., 1992). En Europa, los ensayos a escala piloto para el control del “pitch” en pastas de sulfito de madera de coníferas, usando Resinasa<sup>®</sup>, han proporcionado buenos resultados (Fischer et al., 1993; Fischer y Messberm 1992). Sin embargo, el tratamiento con lipasas aún no se ha aplicado con éxito en la industria papelera de Estados Unidos, en la que el porcentaje de madera de la cual se obtiene pasta mecánica, es menor que en Europa.

Además de la Resinasa<sup>®</sup>, se han investigado para el control del “pitch”, otras lipasas, tales como Lipidasa 10000 (American Lab.Inc.) y lipasas de *Candida* y *Aspergillus* (Hata et al., 1996; Fujita et al., 1992; Fleet y Breuil, 1998; Qin y Chen, 1997; Mustranta et al., 1995). Todas estas enzimas de tipo lipasa, actúan en los glicéridos, pero no degradan otros compuestos que forman depósitos de “pitch”. Por esa razón, se intenta buscar un grupo de enzimas que actúen en un amplio rango de sustratos.

Otro tipo de enzimas estudiadas son las esteroles esterasas (esteril-éster acilhidrolasas, E.C. 3.1.1.13), que podrían considerarse importantes para el control del “pitch” porque los esteroles ésteres son a menudo el origen de estos depósitos, debido a su resistencia a la cocción kraft. Estas enzimas son producidas por los tejidos de los mamíferos, varios hongos y bacterias, pero ninguna de ellas se ha llegado a producir industrialmente (Okawa y Yamaguchi, 1997; Gandarias et al., 1987; Rahim y Sih, 1969; Sih et al., 1963; Kaiser et al., 1994; Madhosingh y Orr, 1981; Taketani et al., 1981). Estas enzimas al hidrolizar los ésteres de esteroles liberan esteroles libres, y se tendría que conseguir la degradación de los esteroles libres porque son tan problemáticos en la formación del “pitch” como los ésteres de esteroles.

#### **4.2.5. Biocontrol con lacasas**

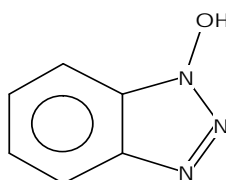
Recientemente, se ha descrito la modificación de algunas sustancias coloidales en las aguas del proceso y en las pastas mecánicas de maderas de coníferas, usando lacasas (Buchert et al., 2002; Zhang et al., 2000; Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2002). Las lacasas (EC 1.10.3.2) son unas polifenoles oxidasas producidas por la mayoría de las especies de hongos de podredumbre blanca de las plantas superiores. Las lacasas típicas de los hongos son metaloproteínas que contienen cuatro átomos de cobre por molécula. Las lacasas presentan una gran multifuncionalidad, incluyendo la participación en la biosíntesis de la lignina y en la degradación (O'Malley et al., 1993) metilación y desmetilación de los compuestos fenólicos (Leonowicz et al., 1985; Leonowicz et al., 1979), etc. Este grupo de enzimas oxidativas es de gran interés para el desarrollo de las tecnologías respetuosas con el medioambiente (Mayer y Staples, 2002). Además el uso de lacasas en presencia de un mediador rédox, aumenta en gran medida su potencial en la degradación de la lignina y otros compuestos aromáticos (Bourbonnais y Paice, 1990). Existen numerosos trabajos sobre el uso del sistema lacasa–mediador para la deslignificación y el blanqueo de diferentes pastas de papel (Call y Mücke, 1997; Paice et al., 1995; Sigoillot et al., 2005). Recientemente, nuestro grupo ha descrito por primera vez la acción del sistema lacasa-mediador sobre los compuestos lipofílicos, tal como se describe en el siguiente apartado de este trabajo.

## **II. ANTECEDENTES DEL TRABAJO**

## II. ANTECEDENTES DEL TRABAJO

### 1. Eliminación de los extractos lipofílicos en diferentes tipos de pastas usando el sistema lacasa-mediador

El grupo describió por primera vez la gran eficacia del sistema lacasa-mediador para la eliminación de los extractos lipofílicos en diferentes tipos de pastas, y se ha patentado dicho procedimiento (ref. 200501648), la patente se ha licenciado a Novozymes, empresa líder mundial en la producción de enzimas industriales. En los trabajos realizados, se trataron con lacasa de alto potencial redox del basidiomiceto *Pycnoporus cinnabarinus* en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HBT) (**Fig. 11**) como mediador redox, tres pastas de papel sin blanquear de frondosas (eucalipto), de coníferas (picea) y no madereras (lino), cuyos procesos de producción fueron kraft, TMP (termomecánica) y sosa-AQ, respectivamente. Se mostró que el sistema lacasa-mediador afecta a la mayoría de los lípidos que se encuentran en los distintos tipos de pastas, como revela la comparación de las pastas tratadas con los controles que se muestran a continuación (Gutiérrez et al., 2006a).



**Fig. 11.** Estructura química del mediador 1-hidroxibenzotriazol (HBT).

#### **▪ Tratamiento de la pasta kraft de eucalipto con lacasa-mediador**

La composición de los principales compuestos lipofílicos presentes en la pasta de eucalipto control (*E. globulus*) y la pasta tratada con el sistema lacasa-mediador se muestra en la **Tabla 2**. Los esteroides libres y conjugados (como glicósidos y ésteres) eran los compuestos mayoritarios. Algunos hidrocarburos esteroidales y cetonas esteroidales, tales como las estigmasta-3,5-dien-7-ona y el 7-oxositosterol y una serie de ácidos grasos libres, también estaban presentes aunque en menor proporción.

La **Tabla 2** y la **Fig. 12** muestran que el tratamiento con lacasa-mediador casi elimina completamente los esteroides libres, los ésteres de esteroides y el sitosteril-3- $\beta$ -D-glucopiranosido. El sitosterol representa el 80% de los ésteres libres en la pasta de eucalipto, que se eliminaron completamente, y sólo queda en la pasta tratada una pequeña cantidad de estigmastanol (esterol saturado). Por otro lado, se observa un aumento en la cantidad de estigmasta-3,5-dien-7-ona, estigmastan-3-ona y especialmente 7-oxositosterol, después del tratamiento con lacasa-mediador en la pasta. Junto con el 7-oxositosterol (el 72% de las cetonas esteroidales de la pasta tratada), se observa también un aumento considerable de la correspondiente cetona di-insaturada (estigmasta-3,5-dien-7-ona) y glicósido (7-oxositosteril 3- $\beta$ -D-glucopiranosido).

## II. ANTECEDENTES DEL TRABAJO

**Tabla 2.** Composición de los extractos lipofílicos de la pasta kraft control y tratada con el sistema lacasa-mediador de eucalipto (mg/Kg de pasta).

	Pasta eucalipto control	Pasta eucalipto tratada con sistema lacasa-mediador
<b><u>Ácidos grasos totales</u></b>	48.5	27.9
FA-14	2.1	1.7
FA-16	4.8	4.8
FA-18:2	2.9	0.7
FA-18:1	1.4	1.1
FA-18	2.7	2.1
FA-20	2.1	0.7
FA-22	6.9	3.4
FA-24	9.4	4.2
FA-26	9.2	5.3
FA-28	7.0	3.9
<b><u>Hidrocarburos esteroidales totales</u></b>	14.2	4.9
<b><u>Esteroles libres totales</u></b>	140.3	5.5
Sitosterol	111.0	-
Estigmastanol	25.8	5.5
Fucoesterol	3.5	-
<b><u>Cetonas esteroidales totales</u></b>	9.0	97.2
Estigmastan-3-ona	0.6	3.6
Estigmasta-3,5-dien-7-ona	2.9	24.1
7-oxositosterol	5.5	69.5
<b><u>Esteril glicósidos totales</u></b>	17.1	6.9
Sitosteril 3-β-D-glucopiranósido	17.1	-
7-oxositosteril 3-β-D-glucopiranósido	-	6.9
<b><u>Ésteres de esteroides totales</u></b>	95.4	-

### ▪ **Tratamiento de la pasta termomecánica (TMP) de *picea* con lacasa-mediador**

En la **Tabla 3** se muestran los principales compuestos lipofílicos presentes en la pasta control de *picea* (*P. abies*) y en la pasta TMP tratada con el sistema lacasa-mediador. En la pasta TMP de *picea*, la composición de los extractos lipofílicos es diferente a la composición en la pasta de eucalipto, con la presencia de gran cantidad de triglicéridos, ésteres de esteroides y ácidos resínicos. Además están presentes pequeñas cantidades de ácidos grasos y esteroides libres (campesterol y sitosterol), junto con una menor cantidad de los alcoholes, cetonas esteroidales y glicósidos esteroidales.

La **Tabla 3** muestra que el tratamiento enzimático elimina la mayoría de los triglicéridos, ésteres de esteroides y glicósidos esteroidales. También el sistema lacasa-mediador elimina en gran parte, los ácidos resínicos y los esteroides libres. Por último, los alcoholes y los ácidos grasos, son eliminados en menor medida que los otros compuestos lipofílicos. Los compuestos oxidados como 7-oxositosterol y 7-oxocampesterol y sus respectivas cetonas diinsaturadas estigmasta-3,5-dien-7-ona y ergosta-3,5-dien-7-ona, aumentan después del tratamiento lacasa-mediador, como ocurría en la pasta de eucalipto (**Fig. 13**). El ácido 7-oxodehidroabiético aparece en la pasta de *picea* tratada, aunque no fue cuantificado por separado.

La capacidad del sistema lacasa-mediador para eliminar los compuestos lipofílicos en el proceso TMP de *picea*, se comprobó por el análisis de los líquidos del tratamiento enzimático, además del análisis de las pastas. Estos análisis muestran que sólo un pequeño porcentaje de los lípidos de las pastas se liberan en el líquido del tratamiento del control sin lacasa (5% del sitosterol, 4% de los ésteres de esteroides, y 4% de los triglicéridos), y que además estos lípidos se degradan durante el tratamiento enzimático.



Se obtuvieron resultados similares con los líquidos del tratamiento de la pasta de eucalipto y de lino, que tiene un menor contenido de compuestos lipofílicos.

**Tabla 3.** Composición de los extractos lipofílicos de la pasta TMP control y tratada con el sistema lacasa-mediador de *picea* (mg/Kg de pasta).

	Pasta <i>picea</i> control	Pasta <i>picea</i> tratada con sistema lacasa-mediador
<b>Ácidos grasos totales</b>	116.1	68.3
FA-16	26.6	21.5
FA-17	21.0	14.1
FA-18:2	33.7	6.0
FA-18:1	23.1	21.4
FA-18	11.7	5.3
<b>Ácidos resínicos totales</b>	1278.4	400.9
<b>Alcoholes grasos totales</b>	18.6	14.9
FAL-24	17.2	13.7
FAL-26	0.4	0.3
FAL-28	1.0	0.9
<b>Esteroles libre totales</b>	120.5	41.4
Campesterol	30.4	8.0
Sitosterol	90.1	33.4
<b>Cetonas esteroidales totales</b>	7.0	67.0
Ergosta-3,5-dien-7-ona	2.0	8.0
Estigmasta-3,5-dien-7-ona	3.3	27.0
Estigmasta-4-en-3-ona	1.7	1.7
7-oxocampesterol	-	8.3
7-oxositosterol	-	22.0
<b>Esteril glicósidos totales</b>	4.5	tr
Campesteril 3-β-D-glucopiranosido	0.7	-
Sitosteril 3-β-D-glucopiranosido	3.8	-
7-oxocampesteril-3-β-D-glucopiranosido	-	tr
7-oxositosteril-3-β-D-glucopiranosido	-	tr
<b>Ésteres de esteroides totales</b>	1274.6	218.3
<b>Triglicéridos totales</b>	1982.5	151.2

#### ▪ **Tratamiento de la pasta sosa-AQ de lino con lacasa- mediador**

En la **Tabla 4** se muestra el contenido de los compuestos lipofílicos presentes en la pasta sosa-AQ de lino (*Linum usitatissimum*) control y en la tratada con el sistema lacasa-mediador. La composición de la fracción lipídica de las pasta de lino es diferente de las otras dos pastas analizadas. La mayoría de los compuestos son alcoholes (desde el docosanol hasta el dotriacontanol). También se encontraron grandes cantidades de esteroides libres y glicósidos esteroidales, y una menor cantidad de cetonas esteroidales y ceras (ésteres de ácidos grasos con alcoholes).

La **Fig. 14** muestra que el sistema lacasa-mediador elimina completamente los tres esteroides libres (sitosterol, campesterol y estigmasterol) que estaban presentes inicialmente en la pasta, mientras que aparecían cantidades de los correspondientes compuestos oxidados (7-oxositosterol, 7-oxocampesterol, 7-oxoestigmasterol y sus respectivas cetonas diinsaturadas ergosta-3,5-dien-7-ona y estigmasta-3,5-dien-7-ona) en las pastas tratadas con el sistema lacasa-mediador. Además los tres glicósidos esteroidales iniciales (sitosteril, campesteril y estigmasteril 3-β-D-glucopiranosidos) se eliminaron completamente, y apareció una menor cantidad del correspondiente 7-oxosterol glucósido. Los alcoholes y *n*-alcanos, se degradaron en una cantidad

## II. ANTECEDENTES DEL TRABAJO

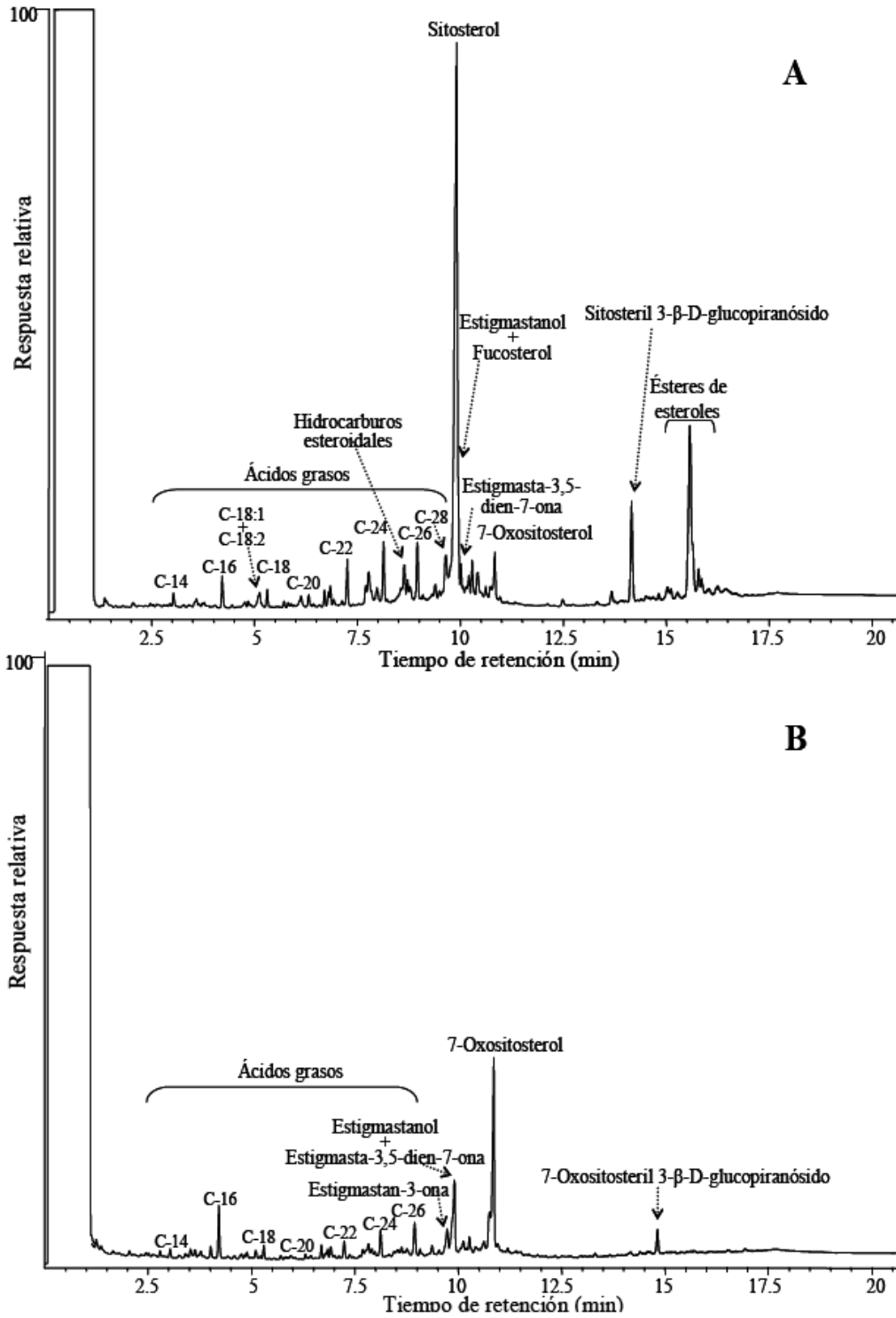
considerable, aunque son más resistentes a la acción del sistema lacasa-mediador que los otros compuestos lipofílicos presentes en la pasta.

Por otro lado, también se observó que el sistema lacasa-mediador actuó sobre los restos del antiespumante (utilizado en el proceso) que quedaban en la pasta y que se ha observado que interviene en la formación de los depósitos de “pitch”.

**Tabla 4.** Composición de los extractos lipofílicos de la pasta sosa-AQ control y tratada con el sistema lacasa-mediador de lino (mg/Kg de pasta).

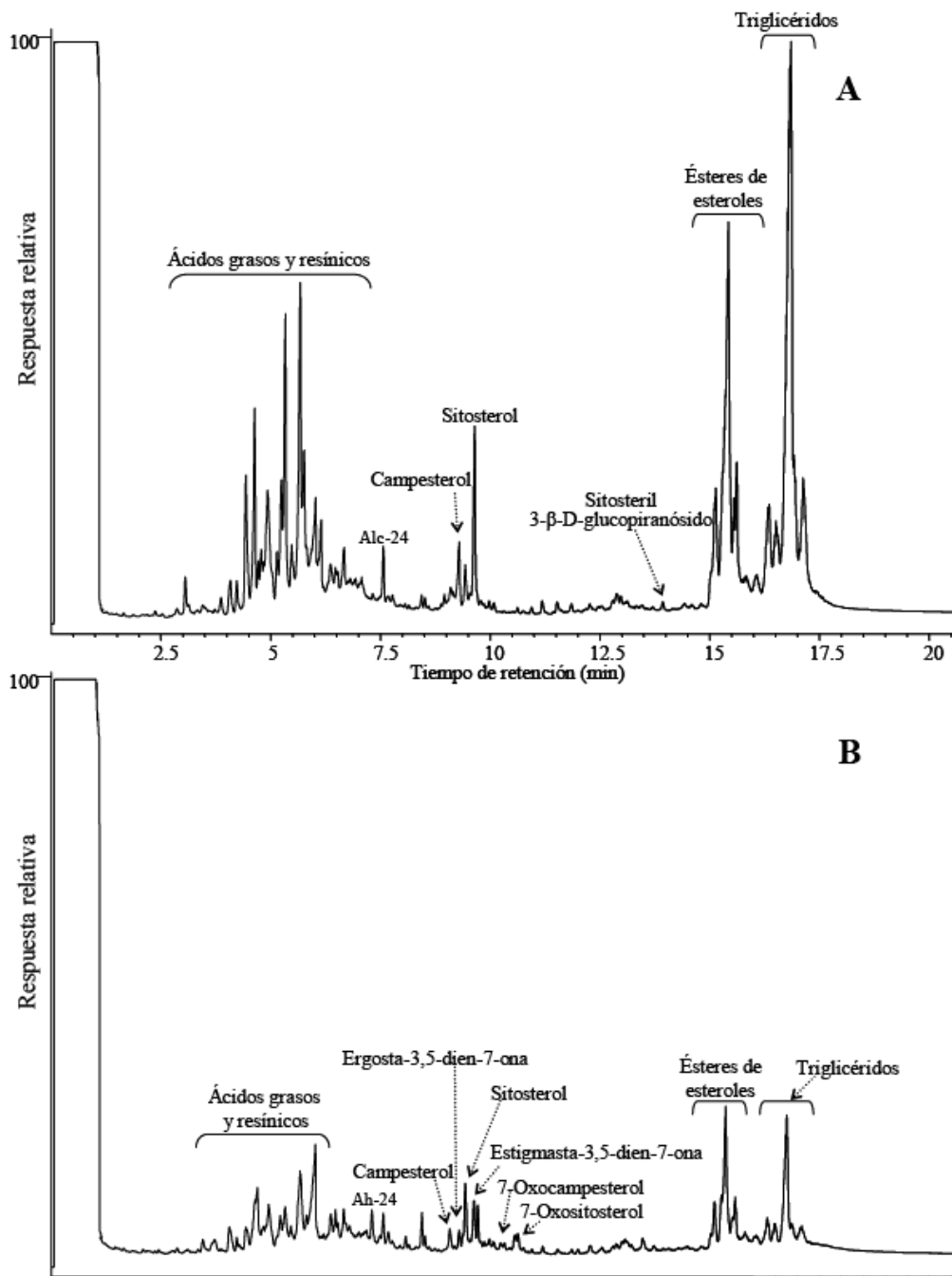
	Pasta lino control	Pasta lino tratada con sistema lacasa-mediador
<b><u>Antiespumante</u></b>	849.5	125.2
<b><u>Alcoholes grasos totales</u></b>	121.3	49.7
FAL-22	3.8	1.8
FAL-24	4.0	1.5
FAL-26	25.6	9.6
FAL-28	70.8	29.0
FAL-30	15.0	7.8
FAL-32	2.1	-
<b><u>Alcanos totales</u></b>	12.8	8.0
ALK-27	2.7	1.5
ALK-29	8.1	5.5
ALK-31	2.0	1.0
<b><u>Esteroles libre totales</u></b>	81.5	-
Campesterol	11.6	-
Estigmasterol	3.7	-
Sitosterol	66.2	-
<b><u>Cetonas esteroideas totales</u></b>	2.4	19.1
Ergosta-3,5-dien-7-ona	0.4	1.4
Estigmasta-3,5-dien-7-ona	2.0	6.0
7-oxocampesterol	-	2.9
7-oxoestigmasterol	-	tr
7-oxositosterol	-	8.8
<b><u>Esteril glicósidos totales</u></b>	14.0	5.4
Campesteril 3- $\beta$ -D-glucopiranosido	2.4	-
Estigmasteril 3- $\beta$ -D-glucopiranosido	0.8	-
Sitosteril 3- $\beta$ -D-glucopiranosido	10.8	-
7-oxocampesteril-3- $\beta$ -D-glucopiranosido	-	0.9
7-oxoestigmasteril 3- $\beta$ -D-glucopiranosido	-	tr
7-oxositosteril-3- $\beta$ -D-glucopiranosido	-	4.5
<b><u>Ceras totales</u></b>	2.6	0.6

Con este trabajo del grupo, se muestra que el sistema lacasa-mediador puede eliminar eficazmente la mayor parte de los lípidos presentes en las pastas de papel de distintos orígenes. Este es un resultado sorprendente, porque la capacidad del tratamiento enzimático para actuar sobre los lípidos recalcitrantes de las plantas aún no se conocía.

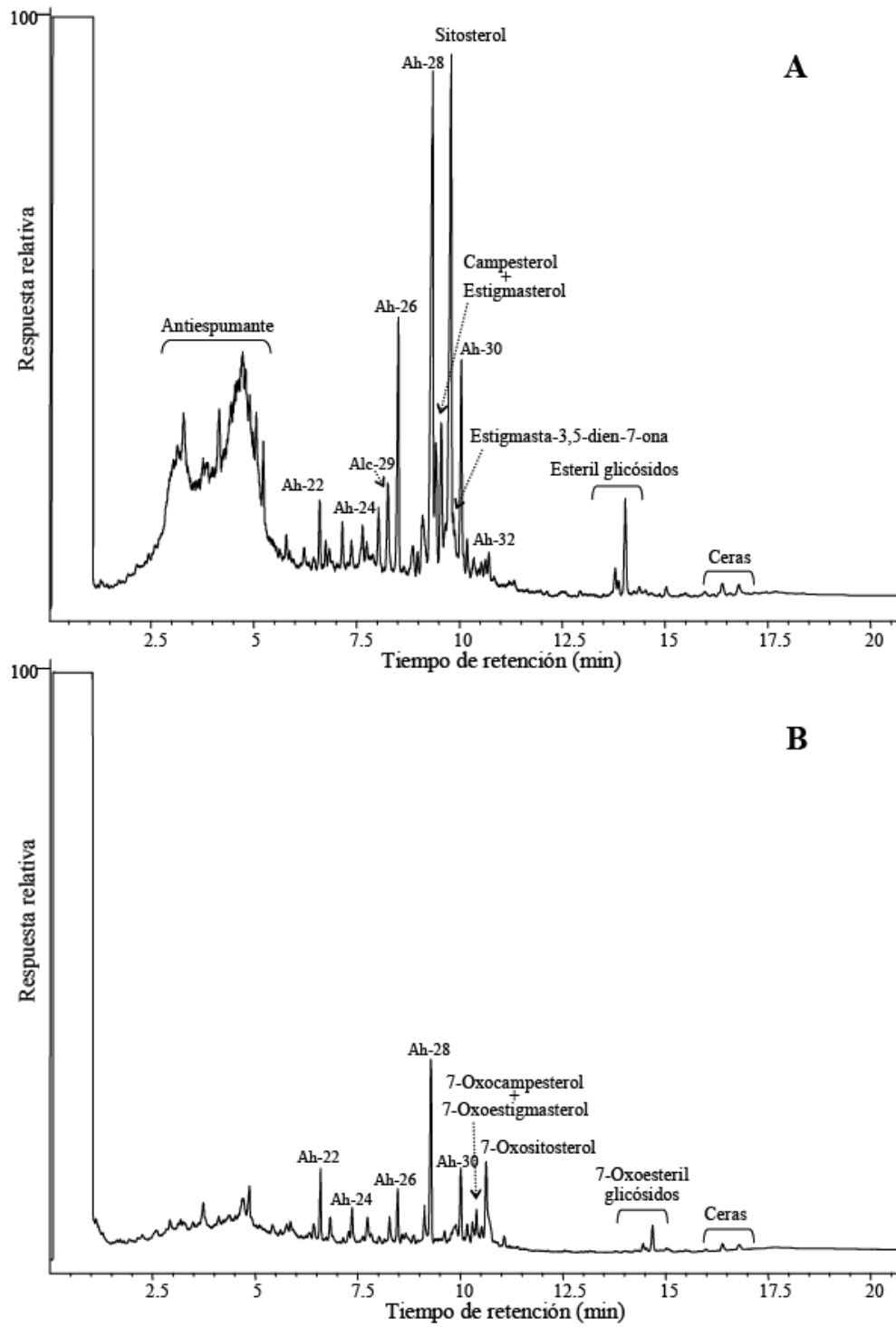


**Fig. 12.** Cromatogramas de los extraíbles lipofílicos de la pasta de eucalipto control (A) y con sistema lacasa-mediador (B).

## II. ANTECEDENTES DEL TRABAJO



**Fig. 13.** Cromatogramas de los extraíbles lipofílicos de la pasta de *picea* control (A) y con sistema lacasa-mediador (B).



**Fig. 14.** Cromatogramas de los extraíbles lipofílicos de la pasta de lino control (A) y con sistema lacasa-mediador (B).

### **III. OBJETIVOS**

### III. OBJETIVOS

El objetivo de este proyecto es buscar una solución enzimática a los problemas que los lípidos y la lignina de las materias primas lignocelulósicas causan durante la producción de pasta y papel, especialmente cuando se introducen tecnologías menos contaminantes en estos procesos. El proyecto plantea la utilización de oxidorreductasas como biocatalizadores industriales que resuelvan de forma simultánea ambos problemas. Estas enzimas oxidativas son capaces de oxidar compuestos recalcitrantes incluyendo los extraíbles lipofílicos y el polímero de lignina, tal como ha demostrado recientemente por primera vez el grupo de investigación.

En este proyecto se han escogido dos tipos de oxidorreductasas: lacasas (fenoloxidasas) y lipoxigenasas. Las lacasas de plantas y hongos se conocen desde hace años, pero su interés industrial se incrementó tras descubrir su capacidad de oxidar compuestos aromáticos en presencia de mediadores rédox. Estas oxidasas multicobre contienen un átomo de Cu de tipo-1, cuyo potencial rédox determina los sustratos a oxidar, y otros tres átomos de Cu que transfieren los electrones al O<sub>2</sub> (que se reduce a H<sub>2</sub>O). Por otro lado, las lipoxigenasas incorporan O<sub>2</sub> a los ácidos grasos poliinsaturados y promueven la generación de radicales lipídicos. Los radicales alcoxilo y peroxilo resultantes de la peroxidación de los lípidos son oxidantes potentes, cuyo potencial industrial está aún por explorar. En el presente proyecto, se han utilizado varias lacasas (de alto y bajo potencial rédox) y se han probado varios mediadores (compuestos sintéticos y naturales). Por otro lado, también se han utilizado lipoxigenasas fúngicas.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**



## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales

#### 1.1. Pastas

**Pasta eucalipto:** Pasta kraft sin blanquear de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) suministrada por la fábrica ENCE de Pontevedra.

#### 1.2. Compuestos lipídicos modelo

Se han usado varios lípidos modelo, incluyendo alcanos (octadecano), alcoholes (1-hexadecanol), ácidos grasos (ácidos palmítico, oleico y linoleico), ácidos resínicos (ácido abiético), esteroides libres (sitosterol), ésteres de esteroides (colesteril palmitato, colesteril oleato y colesteril linoleato) y triglicéridos (triheptadecanoína y trilinoleína). El sitosterol fue suministrado por Calbiochem y los demás compuestos por Sigma-Aldrich.

#### 1.3. Enzimas

**Lacasas:** Se usaron en los experimentos dos tipos de lacasas. El primer tipo fue suministrado por Beldem (Andenne, Bélgica). Se obtuvo de una cepa hiperproductora del hongo *Pycnoporus cinnabarinus* (Herpoël et al., 2000), y la electroforesis de gel de dodecilsulfatosódico-poliacrilamida, muestra una única banda de proteína, que se corresponde con la lacasa. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que transforma 1  $\mu$ mol del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) por min al correspondiente radical catiónico ( $\epsilon_{436}$  29300 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) en tampón acetato sódico 0,1 M (pH 5) a 24°C.

El segundo tipo de lacasa usado fue proporcionado por Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca) y se obtuvo del hongo *Myceliophthora thermophila*.

**Lipoxigenasas:** Las lipoxigenasas fueron suministradas por la empresa Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca), se obtuvieron del hongo *Gaeumannomyces graminis*. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que provoca un aumento en la absorbancia a A<sub>234</sub>, de 0.001 por minuto a pH 7 y 30°C, cuando se usa el ácido linoleico como sustrato (volumen de reacción = 1.0 ml y camino óptico = 1 cm).

#### 1.4. Mediadores

Los mediadores sintéticos 1-hidroxibenzotriazol (HBT) y ácido violúrico fueron proporcionados por Sigma-Aldrich y Fluka respectivamente.

Los mediadores naturales: siringaldehído (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído), acetosiringona (4-hidroxi-3,5-dimetoxifeniletanona), ácido *p*-cumárico (ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico), suministrados por Sigma-Aldrich y metilsiringato (metil-3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoato), suministrado por Alfa Aesar (VWR).

## 2. Métodos

### 2.1. Tratamientos enzimáticos de pastas y compuestos modelo

#### 2.1.1. Tratamientos con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* y HBT

##### ▪ Tratamientos de pasta

Los tratamientos de las pasta, se realizaron por duplicado, usando 10 g de pasta kraft de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) seca, al 3% de consistencia (peso/peso) en tampón de tartrato sódico 50 mM, a pH 4, usando 200 U de lacasa, una concentración 3,33 mM de HBT. Los tratamientos se realizaron en matraces de 500 ml con burbujeo de oxígeno, en un baño térmico de agitación, con una velocidad de 170 rpm y una temperatura de 50°C, durante 12 horas.

Después de este tratamiento, las pastas al 5% de consistencia, se sometieron a:

- Una extracción alcalina usando NaOH al 1,5% (peso/peso) referida al peso de la pasta seca, a 60°C durante 1 hora.
- Una etapa de blanqueo con peróxido, usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (peso/peso) y NaOH 1,5% (peso/peso), ambos referidos al peso de la pasta seca, a 90°C durante 2 horas. Se realizó en unas bolsitas selladas de plástico termorresistente.

Los controles que se realizaron incluían lacasa sin mediador, sólo mediador y lacasa desnaturalizada (calentada durante 30 min a 100°C).

##### ▪ Reacciones con compuestos modelo

Se realizaron cinco réplicas del tratamiento enzimático de cada uno de los compuestos lipídicos modelo. De cada compuesto modelo se usó 1 mg, a los que se añadió 0.5 U lacasa/mg lípido, y HBT 1 mg/mg de lípido, y tween 20 como dispersante (1% V/V). El tratamiento se realizó a pH 4 (usando tampón tartrato) y 50°C, a diferentes tiempos de reacción (5, 15, 30 min, 1, 2, 8 h). Se burbujeó oxígeno dentro de los matraces de reacción, y la reacción se llevó a cabo en un baño con agitación a una velocidad de 100 rpm. En los controles de los experimentos, los lípidos se someten a las mismas condiciones de reacción, sin lacasa y sin mediador. También se incluyeron otros controles sólo con lacasa y sin mediador, y controles con lacasa desnaturalizada.

Las mezclas de los lípidos saturados (octadecano, 1-hexadecanol, ácido palmítico y triheptadecanoína) con ácido linoleico o con colesteril linoleato se trataron durante dos horas con lacasa-HBT en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Después de los tratamientos enzimáticos, las dispersiones de los lípidos se secaron en el rotavapor, y los productos de reacción se recogieron con cloroformo-metanol (1:1), se secaron con nitrógeno y se redisolviaron en cloroformo para su análisis mediante GC GC/MS. Cuando fue necesario, se silanizaron las muestras con BSTFA en presencia de piridina, para formar trimetilsilil derivados, antes y después de reducir con borohidruro sódico.

### 2.1.2. Tratamiento con lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* y ácido violúrico

#### ▪ Tratamientos de pasta

Los tratamientos de las pasta se realizaron usando 10 g de pasta seca, al 3% de consistencia (peso/peso) en tampón de tartrato sódico 50 mM, a pH 4, usando 20 U lacasa/g pasta, una concentración 6,75 mM de ácido violúrico, que equivale a 3.8% en peso respecto a la pasta seca. Los tratamientos se realizaron en matraces de 1l con burbujeo de oxígeno, en un baño térmico de agitación, con una velocidad de 170 rpm y una temperatura de 50°C, durante 12 horas.

Después de este tratamiento, las pastas al 5% de consistencia, se sometieron a:

- Una extracción alcalina usando NaOH al 1,5% (peso/peso) referida al peso de la pasta seca, a 60°C durante 1 hora.
- Una etapa de blanqueo con peróxido, usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (peso/peso) y NaOH 1,5% (peso/peso), ambos referidos al peso de la pasta seca, a 90°C durante 2 horas. Se realizó en unas bolsitas selladas de plástico termorresistente.

Los controles para la evaluación de la acción del sistema lacasa-ácido violúrico, se trataron bajo las mismas condiciones pero sin lacasa ni mediador. También se realizaron otros controles adicionales con tratamientos sólo con enzima (sin mediador).

#### ▪ Reacciones con compuestos modelo

De cada compuesto modelo se usó 1 mg, a los que se añadió lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* 0.5 U lacasa/mg lípido, 6,75 mM de ácido violúrico y tween 20 como dispersante (1% V/V). El tratamiento se realizó a pH 4 (usando tampón tartrato) y 50°C, a 3 y 6 horas. Se burbujeó oxígeno dentro de los matraces de reacción, y la reacción se llevó a cabo en un baño con agitación a una velocidad de 100 rpm. En los controles de los experimentos, los lípidos se someten a las mismas condiciones de reacción, sin lacasa y sin mediador. También se incluyeron otros controles sólo con lacasa y sin mediador.

En algunos experimentos después del tratamiento enzimático, se realizó una fase de peróxido, en la que se añadía a cada matraz de reacción 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (p/v) y 37,5 µl de NaOH 5N, se tapaban los matraces y se colocaban en el baño térmico de agitación, a 90°C y 100 rpm, durante 2 horas.

Después de los tratamientos enzimáticos, las dispersiones de los lípidos se secaron en el rotavapor, y los productos de reacción se recogieron con cloroformo-metanol (1:1), se secaron con nitrógeno y se redisolviaron en cloroformo para su análisis mediante GC y GC/MS.

### 2.1.3. Tratamientos con lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* y mediadores naturales

#### ▪ Tratamientos de pasta

Los tratamientos de las pasta, se realizaron por duplicado, usando 10 g de pasta kraft de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) seca, al 3% de consistencia (peso/peso) en tampón de tartrato sódico 50 mM, a pH 4, usando 200 U de lacasa, una concentración 6,75 mM de siringaldehído, acetosiringona y ácido *p*-cumárico. Los tratamientos se realizaron en

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

matraces de 500 ml con burbujeo de oxígeno, en un baño térmico de agitación, con una velocidad de 170 rpm y una temperatura de 50°C, durante 12 horas.

Después de este tratamiento, las pastas al 5% de consistencia, se sometieron a:

- Una extracción alcalina usando NaOH al 1,5% (peso/peso) referida al peso de la pasta seca, a 60°C durante 1 hora.
- Una etapa de blanqueo con peróxido, usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (peso/peso) y NaOH 1,5% (peso/peso), ambos referidos al peso de la pasta seca, a 90°C durante 2 horas. Se realizó en unas bolsitas selladas de plástico termorresistente.

Los controles que se realizaron incluían lacasa sin mediador, sólo mediador y lacasa desnaturalizada (calentada durante 30 min a 100°C).

#### ▪ **Reacciones con compuestos modelo**

De cada compuesto modelo se usó 1mg, a los que se añadió 0.5 U lacasa/mg lípido, 6,75 mM de siringaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico o de 4-hidroxibenzaldehído), y tween 20 como dispersante (1% V/V)., y tween 20 como dispersante (1% V/V). La lacasa usada provenía del hongo *Pycnoporus cinnabarinus*. El tratamiento se realizó a pH 4 (usando tampón tartrato) y 50°C, durante 3, 6 y 8 horas. Se burbujeó oxígeno dentro de los matraces de reacción, y la reacción se llevó a cabo en un baño con agitación a una velocidad de 100 rpm. En los controles de los experimentos, los lípidos se someten a las mismas condiciones de reacción, sin lacasa y sin mediador. También se incluyeron otros controles sólo con lacasa y sin mediador, y controles con lacasa desnaturalizada.

En algunos experimentos después del tratamiento enzimático, se realizó una fase de peróxido, en la que se añadía a cada matraz de reacción 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (p/v) y 37,5 µl de NaOH 5 N, se tapaban los matraces y se colocaban en el baño térmico de agitación, a 90°C y 100 rpm, durante 2 horas.

Después de los tratamientos enzimáticos, las dispersiones de los lípidos se secaron en el rotavapor, y los productos de reacción se recogieron con cloroformo-metanol (1:1), se secaron con nitrógeno y se redisolviaron en cloroformo para su análisis mediante GC y GC/MS.

#### **2.1.4. Tratamientos con lacasa de *Myceliophthora thermophila* y mediadores naturales**

##### ▪ **Tratamientos de pasta**

Los tratamientos de la pasta, se realizaron usando 12,5 g de pasta kraft de eucalipto seca, al 3% de consistencia (peso/peso) en tampón de dihidrogeno fosfato sódico 50 mM, a pH 6,5. Se añadió lacasa (20 U/g de pasta), y siringaldehído a una concentración 6,75 mM, que equivale 3,3% (peso) respecto al peso de la pasta; o el otro mediador metilsiringato a una concentración 6,75 mM, que equivale 4,6% (peso) respecto al peso de la pasta. Los tratamientos se realizaron en matraces de 1l con burbujeo de oxígeno, en un baño térmico de agitación, con una velocidad de 170 rpm y una temperatura de 50°C, durante 12 horas.

Después de este tratamiento, las pastas al 5% de consistencia, se sometieron a:

- Una extracción alcalina usando NaOH al 1,5% (peso/peso) referida al peso de la pasta seca, a 60°C durante 1 hora.

- Una etapa de blanqueo con peróxido, usando  $H_2O_2$  al 3% (peso/peso) y NaOH 1,5% (peso/peso), ambos referidos al peso de la pasta seca, a 90°C durante 2 horas. Se realizó en unas bolsitas selladas de plástico termorresistente.

Los controles para la evaluación de la acción del sistema lacasa-mediador natural, se trataron bajo las mismas condiciones pero sin lacasa ni mediador. También se realizaron otros controles adicionales con tratamientos sólo con enzima (sin mediador).

### 2.1.5. Tratamientos con lipoxigenasas de *Gaeumannomyces graminis*

#### ▪ Tratamientos de pasta

Se realizaron los ensayos con 1 ó 2 de pasta seca, al 1% consistencia (peso/peso) en tampón dihidrogeno fosfato sódico 100 mM. Se han ido variando las dosis de enzima y las condiciones de reacción para optimizar el proceso. El pH se ha probado a 7, 9 y 10; la dosis de enzima 10 mg lipoxigenasa/g de pasta y 20 mg de lipoxigenasa/g de pasta; la temperatura a 30 y 50°C; la velocidad de agitación 170 y 200 rpm; se ha probado a realizar el experimento con y sin burbujeo de oxígeno en los matraces de reacción; y a 4 y 8 horas. También se ha utilizado otro tampón formado por ácido fosfórico, ácido acético y ácido bórico, para ajustar el pH hasta valores alcalinos.

Los tratamientos se realizaron en matraces de 1l, en un baño térmico de agitación. En algunos de los experimentos, después del tratamiento con lipoxigenasas, las pastas al 5% de consistencia, se sometieron a:

- Una extracción alcalina usando NaOH al 1,5% (peso/peso) referida al peso de la pasta seca, a 60°C durante 1 hora.
- Una etapa de blanqueo con peróxido, usando  $H_2O_2$  al 3% (peso/peso) y NaOH 1,5% (peso/peso), ambos referidos al peso de la pasta seca, a 90°C durante 2 horas. Se realizó en unas bolsitas selladas de plástico termorresistente.

Los controles para la evaluación de la acción de la lipoxigenasa, se trataron bajo las mismas condiciones pero sin enzima.

#### ▪ Reacciones con compuestos modelo

De cada compuesto modelo se usó 1mg, y se añadió 0,1 mg de lipoxigenasa, es decir (11,5 µl de la disolución de la enzima, cuya densidad es 8,7 mg/ml) y tween 20 como dispersante (1% V/V). El tratamiento se realizó a pH 7, usando tampón dihidrogeno fosfato sódico 100 mM, durante 2 horas. Se burbujeó oxígeno dentro de los matraces de reacción, y la reacción se llevó a cabo en un baño con agitación a una velocidad de 100 rpm. En los controles de los experimentos, los lípidos se someten a las mismas condiciones de reacción, sin lipoxigenasa.

En algunos experimentos después del tratamiento enzimático, se realizó una fase de peróxido, en la que se añadía a cada matraz de reacción 50 µl de  $H_2O_2$  al 30% (p/v) y 37,5 µl de NaOH 5N, se taparon los matraces y se colocaron en el baño térmico de agitación, a 90°C y 100 rpm, durante 2 horas.

Después de los tratamientos enzimáticos, las dispersiones de los lípidos se secaron en el rotavapor, y los productos de reacción se recogieron con cloroformo-metanol (1:1), se secaron con nitrógeno y se redisolviaron en cloroformo para su análisis mediante GC y GC/MS.

## 2.2. Métodos analíticos

### 2.2.1. Extracción de los compuestos extraíbles lipofílicos

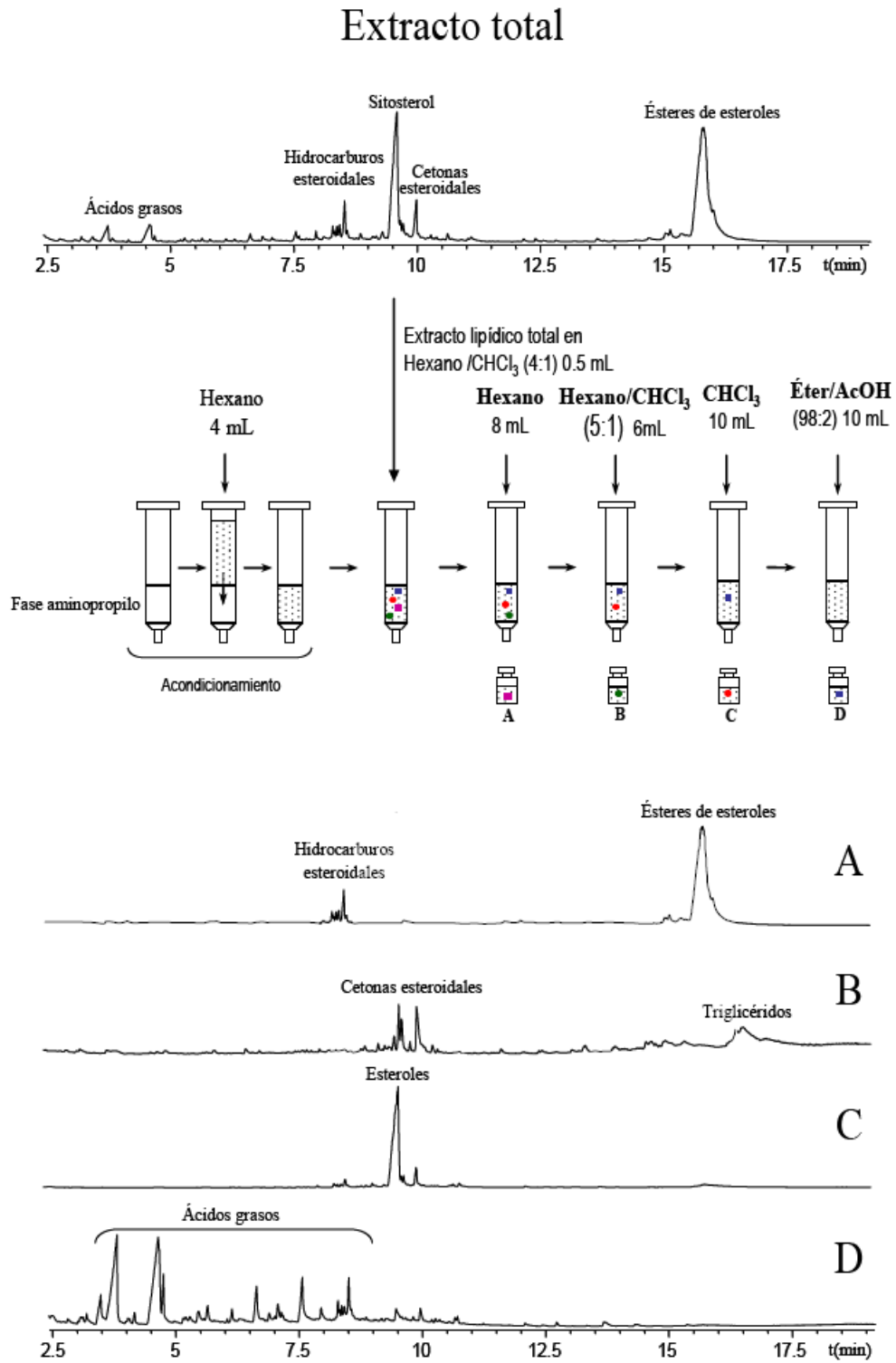
Para el análisis de los compuestos extraíbles lipofílicos es necesario su previo aislamiento. Por ello, los compuestos extraíbles lipofílicos de las pastas, se extrajeron con acetona en un extractor de tipo Soxhlet durante seis horas. Este extractor está constituido por un condensador, un tubo de extracción y un matraz, donde la extracción se lleva a cabo por contacto continuo de un solvente con la muestra sólida (que se encuentra en el interior de un cartucho de celulosa propio para la extracción). El disolvente se evaporó a sequedad en un rotavapor. La cantidad de extracto se determinó por gravimetría. Los extractos lipofílicos se redisolviaron en cloroformo para su posterior análisis por GC y GC/MS.

### 2.2.2. Fraccionamiento de los compuestos extraíbles lipofílicos mediante extracción en fase sólida (SPE)

Para llevar a cabo una caracterización más detallada de algunos compuestos presentes en los extractos, los extraíbles lipofílicos se separaron en distintas fracciones por elución en una columna en orden creciente de polaridad (Gutiérrez *et al.*, 1998b). La columna consiste en un cartucho con fase de aminopropilo (500 mg) Millipore, Milford, MA, USA. Se utilizó una cantidad de extracto lipofílico total entre 5-20 mg que se redisolvió en una cantidad mínima (< 0,5mL) de hexano-cloroformo (4:1). La columna se acondicionó previamente con hexano (4 mL), **Fig. 15.**, la primera fracción se eluyó con 8 mL de hexano (fracción A, contiene los compuestos más apolares como ésteres de esteroides, ceras e hidrocarburos), la segunda con 6 mL de una solución de hexano-cloroformo (5:1) (fracción B, rica en triglicéridos y cetonas esteroidales), la tercera con 10 mL de cloroformo (fracción C, contiene principalmente esteroides libres y alcoholes) y la cuarta fracción con 10 mL de una solución de éter etílico-ácido acético (98:2) (fracción D, contiene ácidos grasos). Cada fracción aislada se secó con nitrógeno, se pesó y se procedió a su análisis por GC y GC/MS.

### 2.2.3. Saponificación de ésteres de esteroides

La identificación completa de la estructura de los ésteres de esteroides requiere una rotura previa del enlace éster, ya que los espectros de masas de estos compuestos se caracterizan por ser similares a los del esteroides libres que lo componen, no apareciendo generalmente ningún fragmento correspondiente al ión molecular (Lusby *et al.*, 1984; Evershed *et al.*, 1989). Para el análisis de los ésteres de esteroides, se hidrolizaron a reflujo con una disolución de KOH 0,5 M al 90% en etanol durante 8 h (Gutiérrez *et al.*, 1999a). Una vez finalizada la saponificación, se realiza una extracción líquido-líquido con hexano, extrayéndose la fracción neutra (que contenía los esteroides libres), la cual se secó en el rotavapor. Por otro lado, la fase acuosa se acidificó con HCl 6 M y la fracción ácida (que contenía los ácidos grasos libres) se extrajo con hexano y se secó en el rotavapor. Ambas fracciones se analizaron por GC y GC/MS.



**Fig. 15.** Fraccionamiento de los compuestos extraíbles lipofílicos mediante extracción en fase sólida (SPE) (Gutiérrez *et al.*, 1998b).

#### **2.2.4. Análisis mediante GC y GC/MS de los compuestos lipofílicos**

La cromatografía de gases se utiliza para separar compuestos que se encuentran en mezclas complejas y como método de identificación y determinación cuantitativa de cada uno de esos componentes. En este tipo de cromatografía la fase móvil es un gas inerte y la fase estacionaria es líquida depositada en un soporte sólido apropiado, donde su principio de operación envuelve la volatilización de la muestra, la separación de cada componente en la columna y la detección de los diferentes componentes por el detector. En el análisis de lípidos por GC y GC/MS, es muy importante las características de las columnas cromatográficas, que permitan separar e identificar compuestos de alto peso molecular como ceras, ésteres de esteroides, triglicéridos, etc. Se han realizado estudios sobre procedimientos para el análisis de los extractos lipofílicos de las maderas (Gutiérrez *et al.*, 1998b, 2004) por GC y GC/MS, en donde se usaron diversas columnas de diferente longitud y diferentes programas de temperatura. En estos estudios, las columnas capilares seleccionadas para el análisis de lípidos por GC fueron cortas (de 5 m) ya que proporcionan una conveniente elución y separación de lípidos de alto peso molecular (Wakeham y Frew, 1982; Lusby *et al.*, 1984; Evershed *et al.*, 1989; Sitholé *et al.*, 1992; Örså y Holmbom, 1994), además de que el análisis transcurre en un corto período de tiempo (20 min). Columnas menores de 5 m no son convenientes ya que no proporcionan la resolución necesaria para análisis cuantitativos. En el caso de los análisis por GC/MS, los cromatogramas obtenidos tienen que ser reproducibles con los obtenidos por GC usando columnas capilares de 5 m para identificar los diferentes compuestos. No obstante, en el sistema GC/MS no se pueden usar columnas tan cortas, usándose normalmente columnas de 10-15 m. Esta longitud de columna es apropiada para el análisis de lípidos de alto peso molecular por GC/MS proporcionando resultados en un corto período de tiempo (30 min), incrementando para esto la temperatura final a 380°C.

##### **Cromatografía de gases (GC)**

Los análisis cromatográficos de los extractos se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent (Hewlett-Packard, Hoofddorp, Netherlands) equipado con un detector de ionización de llama (FID, flame ionization detector) y una columna capilar corta de alta temperatura de sílice fundida (DB-5HT J&W; 5 m × 0,25 mm I.D., con 0,1 µm de espesor de película) para análisis por GC. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron a 300°C y 350°C, respectivamente. Se utilizó Helio como gas portador y la inyección se realizó en modo splitless. El programa de temperaturas del horno fue de 100°C (1 min) a 350°C (3 min) a 15°C/min, manteniendo la temperatura final por 5 minutos.

##### **Cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS)**

La combinación de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas resulta en una técnica analítica muy útil para el análisis de mezclas de compuestos orgánicos volátiles o semi-volátiles, siendo por lo tanto útil en la identificación de cada uno de los componentes existentes en los extractos lipofílicos. Para la separación e identificación de los compuestos se usó un cromatógrafo de gases Varian Star 3400 acoplado a un detector de trampa de iones (ITD, Varian Saturn 2000) usando una columna capilar de 15 m × 0,25 mm DB-5HT (0,1 µm, J&W Scientific). Se utilizó Helio como gas portador y la inyección se realizó en modo splitless. Las muestras se inyectaron con un inyector



automático (Varian 8200). La temperatura del inyector durante la inyección fue de 120°C y 0,1 min después de la inyección se programó a 380°C (10 min) a una velocidad de 200°C/min. El horno se programó a 120°C durante 1 min y a 380°C durante 5 min a 10°C/min. Las temperaturas del ITD y de la línea de transferencia fueron de 200°C y 300°C respectivamente. La identidad de cada componente se determinó por comparación de sus espectros de masas con los espectros existentes en las librerías (Wiley y NIST) y con espectros publicados anteriormente, por sus fragmentaciones y cuando fue posible por sus patrones.

### 2.2.5. Métodos de derivatización

Para el análisis por GC/MS es esencial que los compuestos existentes en la muestra sean suficientemente volátiles a presión atmosférica para pasar a través del cromatógrafo de gases, por lo que es necesario recurrir a métodos de derivatización cuando los compuestos a analizar no son volátiles, esto es, métodos de conversión de ciertos compuestos en otros que sean compatibles con el método analítico de GC/MS.

▪ **Silanización con N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA):** Compuestos como alcoholes, esteroides y otros con grupos funcionales polares pueden ser derivatizados para conferirles estabilidad térmica y química, además de la volatilidad necesaria. Para esto, se le pueden introducir grupos trimetilsililo (TMS) formando así éteres de trimetilsililo que presentan características de fragmentación más favorables para la identificación de los compuestos por sus espectros de masas. Varios reactivos pueden ser usados para la preparación de los derivados TMS, pero en este caso se ha utilizado el N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) en presencia de piridina. Una vez secada la muestra, se añade 200 µl de BSTFA y 50 µl de piridina. A continuación se calienta a 70°C durante 2 h y se evapora la mezcla con nitrógeno hasta sequedad. Posteriormente, se redisuelve en cloroformo para ser analizada por GC/MS.

▪ **Metilación con (trimetilsilil)diazometano:** Los grupos carboxilos de los ácidos grasos libres e hidroxiácidos, además de los grupos fenólicos se metilaron con trimetilsilildiazometano (TMSD) en metanol. Para ello, a la muestra seca se le añadió 0,1 ml de metanol y 30 µl de una solución 2 M de trimetilsilildiazometano en hexano y se mantuvo durante 20 minutos en el baño de ultrasonido. Después se secó la muestra con nitrógeno, y se resuspende en cloroformo para ser analizada por GC/MS.

▪ **Acetilación:** Con anhídrido acético y piridina en proporción 1:1. Después se seca en el rotavapor, limpiando con etanol para eliminar la piridina.

▪ **Reducción con borohidruro sódico (NaBH<sub>4</sub>):** La reducción con borohidruro sódico se ha utilizado para reducir hidroperóxidos, y otros compuestos como aldehídos y cetonas, a alcoholes (Hamberg y Samuelsson, 1967). Se secó la muestra previamente con nitrógeno, y después se resuspende en unos mililitros de una disolución de borohidruro sódico en metanol 10mg/ml. Se deja 20 min a 0°C (tapando el matraz con un tapón de vidrio) y 40 min a temperatura ambiente. Después se acidifica con HCl hasta pH 1-2. Se seca en el rotavapor, lavando varias veces con metanol para eliminar el ácido clorhídrico. Se resuspende en cloroformo para ser analizada por GC/MS.

### **2.2.6. Métodos de cuantificación**

Los picos cromatográficos correspondientes a los extraíbles lipofílicos se cuantificaron a partir de sus áreas en los cromatogramas. Se utilizó una mezcla de compuestos patrones suministrados por Sigma-Aldrich (octadecano, hexadecanol, ácido palmítico, sitosterol, 7-oxocholesterol, sitosteril 3 $\beta$ -D-glucopiranosido, colesteril oleato y triheptadecanoína) en la obtención de la recta de calibrado utilizada para la cuantificación de los extraíbles lipofílicos, con un rango de concentración comprendido entre 0.1 y 1 mg/ml. En todos los casos se obtuvo un coeficiente de correlación mayor de 0.99.

### **2.2.7. Determinación del índice Kappa de la pasta**

El procedimiento estándar utilizado en la industria para determinar el grado de deslignificación en una pasta, es el cálculo del índice Kappa por la norma TAPPI T 236cm-85 (volumen en ml de una disolución de KMnO<sub>4</sub> 0,1 N consumido por gramo de pasta). La lignina de la pasta reacciona con el permanganato y la cuantificación del permanganato consumido se realiza por titulación con tiosulfato de sodio.

Todas las medidas de índices Kappa de las pastas fueron realizadas en la industria papelera ENCE de Pontevedra.

### **2.2.8. Determinación de la viscosidad intrínseca de la pasta**

La viscosidad de las pastas está directamente relacionada con el grado de polimerización de las moléculas de celulosa y por lo tanto con la resistencia de las fibras. Se determinó la viscosidad intrínseca de las pastas mediante la norma SCAN-CM 15:85. Este método permite determinar la viscosidad de las pastas celulósicas solubles en una disolución de cobre (II)-etilendiamina (CED), con un viscosímetro capilar.

Todas las medidas de viscosidades intrínsecas de las pastas fueron realizadas en la industria papelera ENCE de Pontevedra.

### **2.2.9. Determinación de la blancura ISO de la pasta**

Esta norma especifica un método para medir el factor de reflectancia difusa en azul (grado de blancura ISO) de pasta para papel y cartones.

El alcance de esta norma está restringido a pasta para papel cartones blancos o casi blancos. Se pueden medir los materiales que presenten una fluorescencia que fomente la aparición de blancura, pero si se desea logra una estandarización y concordancia entre los instrumentos, el nivel de energía ultravioleta de la iluminación se debe ajustar usando un patrón de calibración de fluorescencia.

Todas las medidas de blancura en % ISO de las pastas fueron realizadas en la industria papelera ENCE de Pontevedra.

## **V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Sistema Lacasa-mediador

#### 1.1. Lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* y HBT

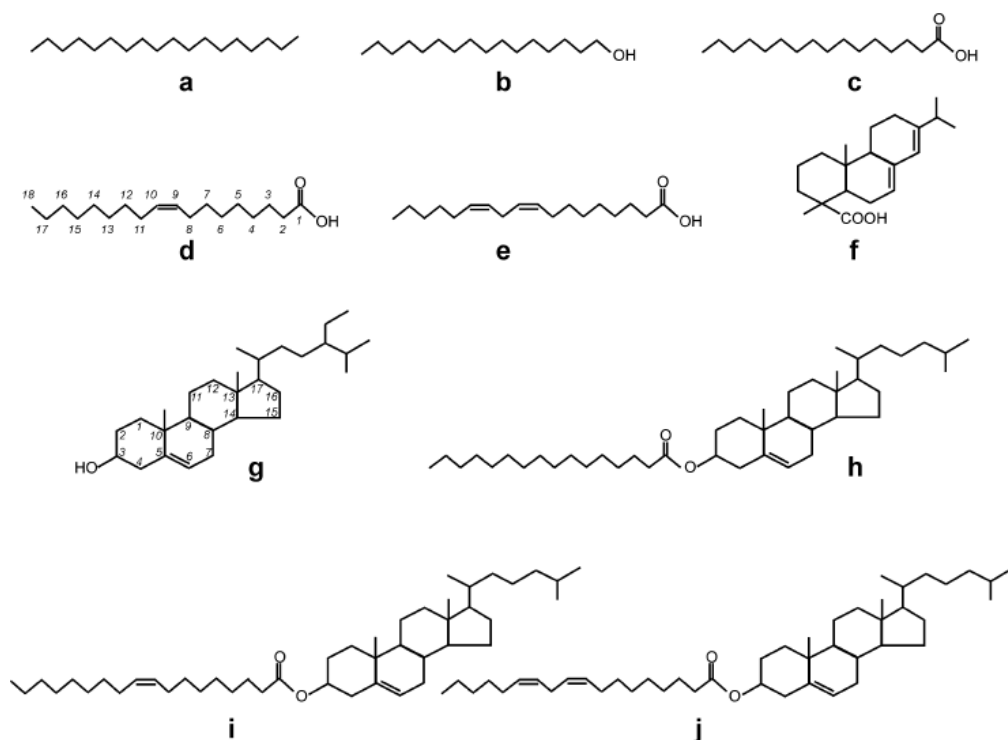
##### ▪ Tratamientos de pasta

Tras los resultados obtenidos por el grupo en el tratamiento de diversas pastas con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HBT) como mediador, descritos en el apartado de “Antecedentes del trabajo”, el siguiente paso fue profundizar en las reacciones con lacasa y HBT, en cada uno de los tipos de lípidos para intentar comprender sus mecanismos.

##### ▪ Reacciones con compuestos modelo

##### Reactividad de diferentes lípidos modelo con lacasa-HBT y con lacasa sin mediador

Se trataron doce compuestos lipídicos modelo (**Fig. 16**) representativos de los extractos lipofílicos presentes en diferentes pastas de coníferas, frondosas y no madereras, con la lacasa de alto potencial rédox, del hongo *Pycnoporus cinnabarinus*, en presencia de HBT (**Fig. 11**) como mediador, para intentar comprender el mecanismo de las reacciones. La reactividad de los diferentes lípidos, se estudió por GC y GC/MS.



**Fig. 16.** Estructuras químicas de los lípidos modelo representativos de la mayoría de los extractos lipídicos de las pastas de papel, usados en las reacciones enzimáticas: **a)** Octadecano; **b)** 1-hexadecanol; **c)** ácido palmítico; **d)** ácido oleico; **e)** ácido linoleico; **f)** ácido abiético; **g)** sitosterol; **h)** colesteril palmitato; **i)** colesteril oleato; **j)** colesteril linoleato; **k)** triheptadecanoína; y **l)** trilinoleína.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, las reacciones con lacasa se realizaron con todos los compuestos modelo durante 2 horas, en presencia y en ausencia del mediador. Los análisis cromatográficos muestran el diferente grado en que se modifican los lípidos por la acción de lacasa-HBT y de lacasa sola (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Efectos del sistema lacasa-mediador en los 12 lípidos modelo a los distintos tiempos de reacción (porcentaje de reducción de la concentración).

	Lacasa	Lacasa - HBT				
	2 h	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h
<b><u>Alcanos:</u></b>						
Octadecano (a)	0	0	0	0	0	0
<b><u>Alcoholes:</u></b>						
1-hexadecanol (b)	0	0	0	0	0	0
<b><u>Ácidos grasos:</u></b>						
Ácido palmítico (c)	0	0	0	0	0	0
Ácido oleico (d)	25	25	38	58	69	88
Ácido linoleico (e)	22	51	93	97	100	100
<b><u>Ácidos resínicos:</u></b>						
Ácido abiético (f)	95	100	100	100	100	100
<b><u>Esteroles libres:</u></b>						
Sitosterol (g)	0	4	31	54	75	100
<b><u>Ésteres de esteroles:</u></b>						
Colesteril palmitato (h)	0	16	18	39	55	60
Colesteril oleato (i)	32	57	90	100	100	100
Colesteril linoleato (j)	38	95	99	100	100	100
<b><u>Triglicéridos:</u></b>						
Triheptadecanoína (k)	0	0	0	0	0	0
Trilinoleína(l)	37	100	100	100	100	100

Se observa que el octadecano (a), 1-hexadecanol (b), ácido palmítico (c) y triheptadecanoína (k), no se modifican después del tratamiento de 2 horas ni con lacasa sola ni con lacasa – HBT. No se observa ninguna disminución de la cantidad de estos compuestos saturados, incluso cuando se realiza el tratamiento enzimático durante 8 horas. Sin embargo, disminuye entre 60–100% de la cantidad inicial de los ácidos oleico (d), linoleico (e), y abiético (f); sitosterol (g); colesteril palmitato (h); colesteril oleato (i); colesteril linoleato (j) y trilinoleína (l), durante el tratamiento de 2 horas con lacasa y HBT. Además se observa una disminución de 20-40% de los lípidos insaturados, después del tratamiento con lacasa sola (sin mediador), excepto en el ácido abiético que disminuye un 95%, y en el colesteril palmitato y sitosterol que no disminuyen con el tratamiento de lacasa sin mediador.

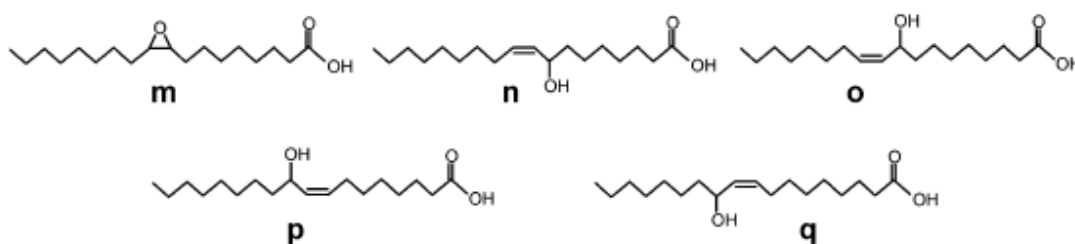
Se realizaron tratamientos a tiempos más cortos (60, 30, 15, 5 minutos) y se observaron diferentes reactividades en los compuestos (**Tabla 5**). Sólo 30 minutos de tratamiento con lacasa y HBT, fueron suficientes para reducir entre 40 y 100% de todos los lípidos insaturados. El ácido abiético y la trilinoleína, se oxidaron completamente después de sólo 5 minutos de tratamiento enzimático. Para la máxima reducción del colesteril linoleato ( $\geq 95\%$ ) sólo se necesitaron 5 min de tratamiento enzimático, mientras que para el colesteril oleato y ácido linoleico, fueron necesarios 30 min. Más del 75% de reducción del sitosterol se obtuvo después de 1 h de tratamiento, y la completa transformación de este esteroles se obtiene a las 2 h de tratamiento. Por lo tanto, el sitosterol junto con el colesteril palmitato y el ácido oleico, fueron los más resistentes

al tratamiento con lacasa y HBT, de los lípidos insaturados que se han usado en los experimentos.

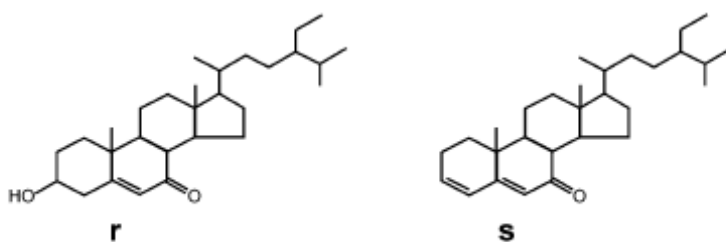
#### Productos de reacción de los tratamientos enzimáticos de los lípidos modelo insaturados

Se han analizado los productos de las reacciones de los lípidos después del tratamiento con lacasa-HBT a los diferentes tiempos de reacción, usando GC y GC/MS, con columnas de longitud corta y media. Las columnas más largas, con un programa diferente de temperatura, se usaron para estudiar los compuestos de bajo peso molecular. Las estructuras químicas de los diferentes productos de reacción que se identificaron a partir de las reacciones de los ácidos grasos, esteroides y ésteres de esteroides, se muestra en la **Fig. 17**, incluyendo épidos (m) e hidroxil-ácidos grasos (n-q), oxoesteroides (r-t), esteroles ésteres oxidados en el esteroles (u y v), o en el ácido graso (w), o en ambos sitios a la vez (x). La disminución de seis de los compuestos modelo iniciales y la formación de nuevos compuestos oxidados durante las 2 h de tratamiento con lacasa y HBT, se muestra en la **Fig. 18**.

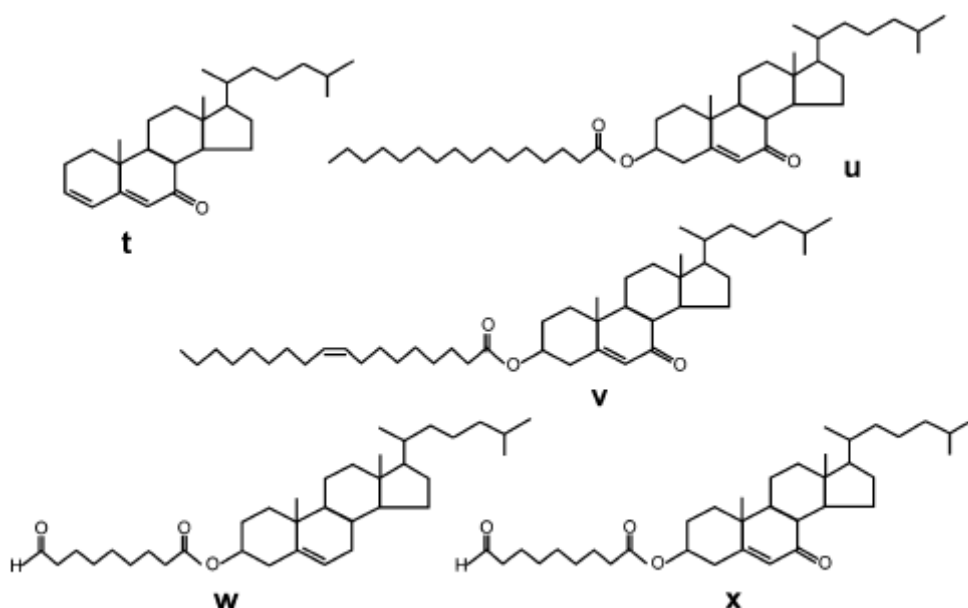
Productos de oxidación del ácido oleico:



Productos de oxidación del sitosterol:



Productos de oxidación de los ésteres de esteroides (ésteres del colesterol):



**Fig. 17.** Estructuras químicas de los productos de oxidación, identificados después de las reacciones con lacasa y HBT de los ácidos grasos, esteroides y ésteres de esteroides: **m)** ácido *cis*-9,10-epoxioctadecanoico; **n)** ácido 8-hidroxi-9-octadecenoico; **o)** ácido 9-hidroxi-10-octadecenoico; **p)** ácido 10-hidroxi-8-octadecenoico; **q)** ácido 11-hidroxi-9-octadecenoico; **r)** 7-oxositosterol; **s)** estigmasta-3,5-dien-7-ona; **t)** colestá-3,5-dien-7-ona; **u)** 7-oxocolesteril palmitato; **v)** 7-oxocolesteril oleato; **w)** colesteril 9-oxononanoato; y **x)** 7-oxocolesteril 9-oxononanoato.

Los ácidos abiético (f) y linoleico (e), se degradaron completamente (más del 90%), después de 5 y 15 min de tratamiento con lacasa-HBT respectivamente, pero no apareció ningún producto de degradación. Lo mismo ocurrió con la trilinoleína (l), que no se pudo detectar ningún producto de reacción, a pesar de que este triglicérido insaturado desaparece totalmente después de 5 min de reacción. Del mismo modo, no se observa ningún pico cromatográfico correspondiente a productos de degradación en las reacciones con lacasa sola.

En el tratamiento con lacasa-HBT del ácido oleico se identificaron por GC y GC/MS varios compuestos oxidados (**Fig. 19**). Los compuestos oxidados que se identificaron después de reducir con borohidruro sódico y formar los trimetilsilil éter derivados, incluyen un epoxi-ácido (las formas *cis* y *trans* del ácido 9,10-epoxioctadecanoico; m) y cuatro hidroxí-ácidos (ácido 8-hidroxi-9-octadecenoico, ácido 9-hidroxi-10-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-8-octadecenoico, ácido 11-hidroxi-9-octadecenoico; n-q), que se han cuantificado juntos, y cuya concentración final es similar a la que queda de ácido oleico al final del tratamiento (**Fig. 18b**).

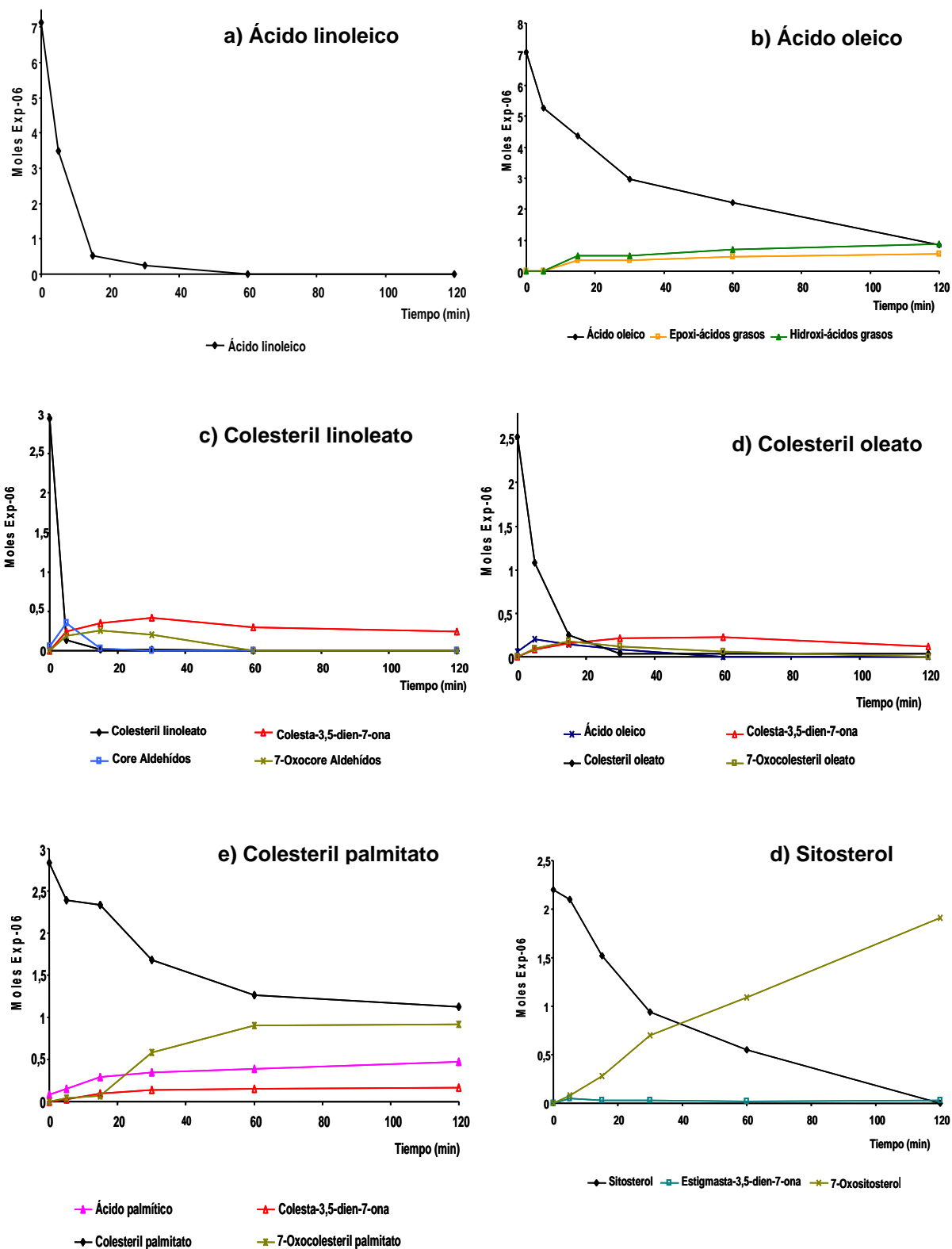
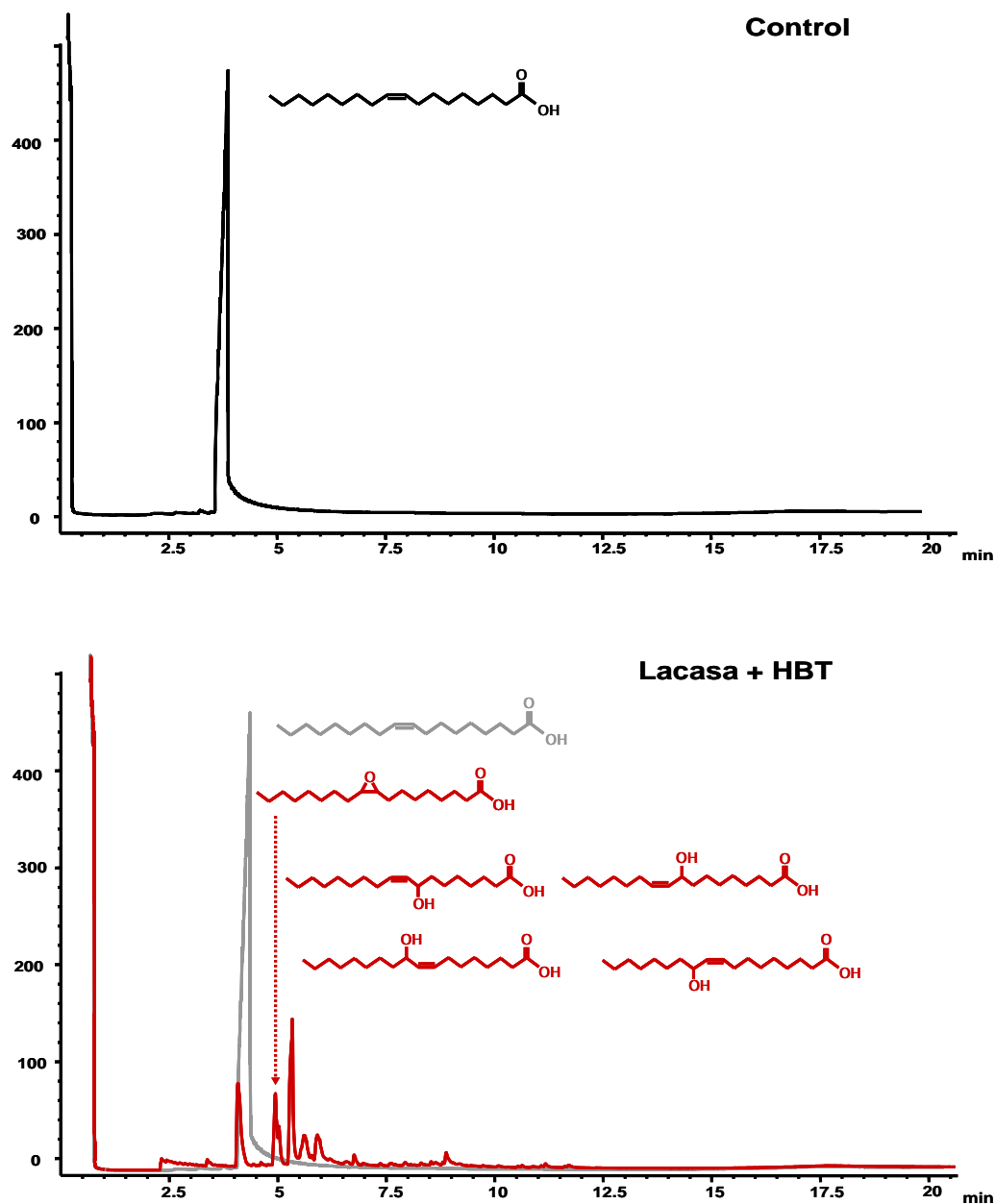


Fig. 18. Eliminación de seis de los lípidos modelos y formación de los productos de oxidación durante las reacciones de lacasa-HBT.



## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el tratamiento del sitosterol libre (g) con lacasa-HBT (**Fig. 18d**), los nuevos compuestos identificados son 7-oxositosterol (r), junto con una menor cantidad estigmasta-3,5-dien-7-ona (s). Mientras que la cantidad de estigmasta-3,5-dien-7-ona apenas varía durante todo el tiempo de reacción, la cantidad de 7-oxositosterol aumenta progresivamente (más del 85% del esteroi inicial), de forma paralela a la disminución de sitosterol, que desaparece totalmente al final de la reacción (**Fig. 20**). También se detectaron trazas de  $7\alpha$  y  $7\beta$ -hidroxisitosterol. No se detecta ninguno de los compuestos oxidados anteriores cuando la reacción se realiza con lacasa sola.



**Fig. 19.** Cromatogramas del control y de la reacción del ácido oleico con lacasa y HBT (2 h).

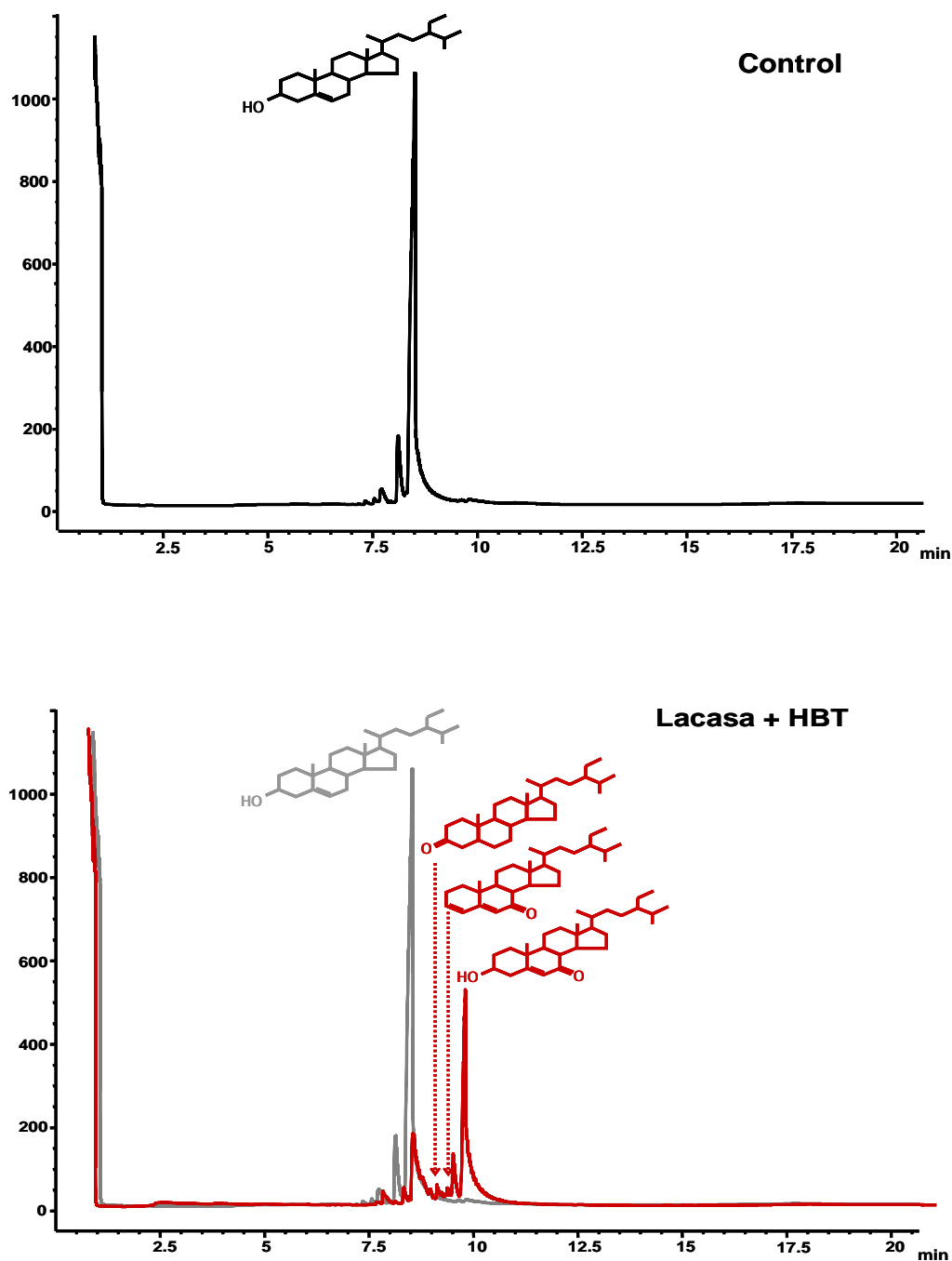


Fig. 20. Cromatogramas del control y de la reacción del sitosterol con lacasa y HBT (2 h).

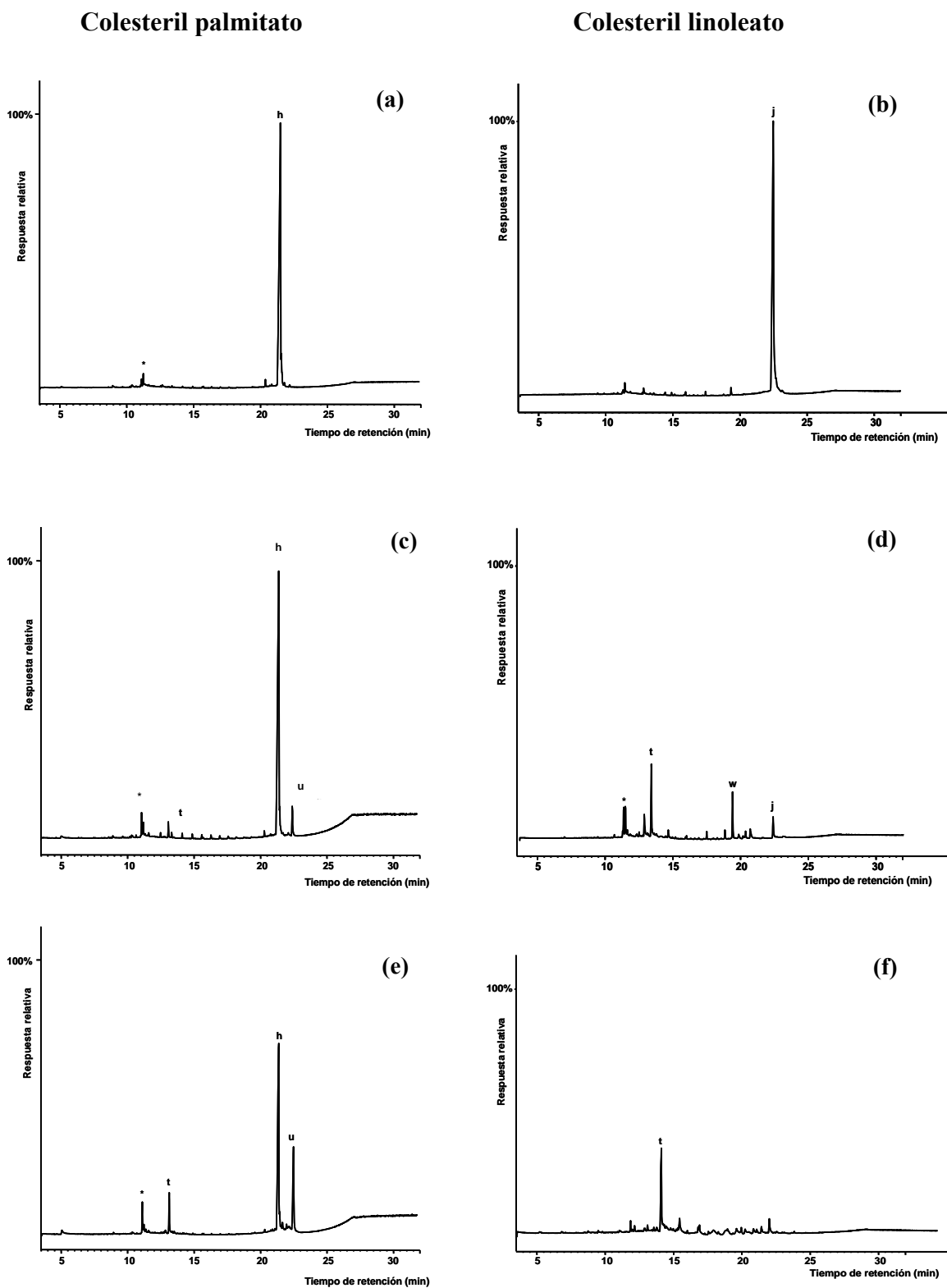
Los tratamientos con lacasa-HBT producen diferentes resultados en los distintos ésteres de esteroides, obteniéndose diferentes cromatogramas, como se muestra en la **Fig. 21**, para dos de ellos, a distintos tiempos de reacción. El colesterol palmitato (h) se oxida principalmente durante la primera hora del tratamiento, y al final de la reacción queda el 40% del éster inicial sin degradar (**Fig. 18e**). El compuesto que se forma mayoritariamente es el 7-oxocolesterol palmitato (u; **Fig. 21c, e**). También se forma una pequeña cantidad de colest-3,5-dien-7-ona (t) y trazas de  $7\alpha$  y  $7\beta$ -hidroxicoolesterol

palmitato. El colesteryl oleato (i) y linoleato (j), presentan señales cromatográficas similares después del tratamiento enzimático, ya que ambos patrones se degradan totalmente después de 15-30 min de reacción (**Fig. 18c, d**). La colestesta-3,5-dien-7-ona (t), se produce en ambos ésteres, siendo el producto mayoritario al finalizar las reacciones, como muestra la **Fig. 18** para el colesteryl linoleato y oleato. El compuesto 7-oxocolesteryl oleato (v) sólo se forma a partir del colesteryl oleato. Otros productos se identificaron en los primeros 15 minutos de la reacción, incluyendo ácido oleico libre (d) a partir del colesteryl oleato y varios compuestos nuevos a partir del colesteryl linoleato. (**Fig. 21d**). Estos compuestos son colesterol o 7-oxocolesterol ésteres que tienen cadenas de ácidos grasos de diferentes longitudes, incluyendo los que tentativamente se han identificado como colesteryl (w) y 7-oxocolesteryl éster core aldehídos (x). Durante los estados iniciales de transformación del colesteryl linoleato por lacasa y HBT, se han identificado trazas de colesterol y 7-oxocolesterol. Se pueden formar pequeñas cantidades de colestesta-3,5-dieno y colestesta-3,5,7-trieno (\*) mediante reacciones de deshidratación en el inyector del cromatógrafo de gases. Sin embargo, no aparecen productos de degradación después del tratamiento de colesteryl oleato y colesteryl linoleato sólo con lacasa, a pesar que se elimina el 32 y 38% de los compuestos iniciales respectivamente, en las 2 horas de tratamiento.

### Acción del sistema lacasa-HBT en mezcla de lípidos modelo

Durante el tratamiento con lacasa y HBT de los patrones individuales, los lípidos saturados tales como el octadecano, 1-hexadecanol, ácido palmítico y triheptadecanoína no se modificaron. Sin embargo todos los tipos de lípidos, incluyendo alcoholes, alcanos y los ácidos grasos saturados libres y esterificados, se degradan durante el tratamiento de las pastas con lacasa y HBT. Con el propósito de estudiar si la degradación de los lípidos saturados está influenciada por la presencia de otros compuestos lipofílicos, se realizaron reacciones de 2 horas de lacasa y HBT con los lípidos saturados en presencia de otros lípidos insaturados como el ácido linoleico y el colesteryl linoleato y los resultados se muestran en la **Tabla 6**. Se observa que el 1-hexadecanol disminuye casi el 25% con el tratamiento de lacasa y HBT en presencia de los lípidos insaturados. Además el octadecano disminuye un 52% y un 26% con lacasa y HBT en presencia de ácido linoleico y colesterol linoleato, respectivamente. Se producen disminuciones más pequeñas en las reacciones que se realizan sólo con lacasa. Sin embargo, la triheptadecanoína no se modificó ni en presencia de los lípidos insaturados, y para el ácido palmítico sólo se obtiene una débil disminución. La disminución observada para el ácido palmítico fue variable, debido a su solubilidad limitada.

Después de la reacción de lacasa y HBT para el 1-hexadecanol en presencia de ácido linoleico y colesteryl linoleato, se formó ácido hexadecanoico. Pero en las reacciones de lacasa y HBT para el octadecano, no se forma ningún producto de reacción.



**Fig. 21.** Análisis de GC/MS para diferentes tiempos de reacción, 0 min (a y b), 5 min (c y d) y 30 min (e y f), durante el tratamiento del colesteril palmitato (izquierda) y del colesteril linoleato (derecha) con lacasa y HBT. Identificación de los picos: las letras corresponden a las estructuras en las Fig. 16 y 17; y los asteriscos corresponden con los picos de colesta-3,5-dieno y colesta-3,5,7-trieno.

**Tabla 6.** Efectos del sistema lacasa-HBT en cinco lípidos modelo saturados (estructuras a-c y k en Fig. 16) en mezclas con ácido linoleico y colesteryl linoleato (porcentaje de reducción en la concentración después de 2 horas de tratamiento).

	Lacasa	Lacasa-HBT
<b><u>Mezclas con ácido linoleico:</u></b>		
Octadecano (a)	3	52
1-hexadecanol (b)	7	25
Ácido palmítico (c)	0-3	0-8
Triheptadecanoína (k)	0	0
<b><u>Mezclas con colesteryl linoleato:</u></b>		
Octadecano (a)	9	26
1-hexadecanol (b)	9	24
Ácido palmítico (c)	0-5	0-14
Triheptadecanoína (k)	0	0

### Discusión

Utilizando los compuestos modelo, se ha demostrado que los tratamientos sólo con lacasa pueden modificar algunos lípidos insaturados, tales como los ácidos linoleico, oleico y abiético, colesteryl oleato, colesteryl linoleato, y trilinoleína; pero no actúan sobre el sitosterol libre y el colesteryl palmitato.

Los resultados de los tratamientos de pastas con lacasa-HBT realizados en estudios anteriores, mostraban que se eliminaban una gran cantidad (casi la totalidad) de todos los lípidos presentes en la pasta (incluyendo esteroides libres y conjugados, triglicéridos, ácidos resínicos, ácidos grasos, y alcoholes), como fue publicado por primera vez por Gutiérrez et al. (2006a, b). Además, usando los compuestos modelo, se ha demostrado que el sistema lacasa-HBT es capaz de oxidar, en mayor grado que la lacasa sola, varios tipos de lípidos saturados, tales como los ácidos linoleico, oleico y abiético, sitosterol libre, colesteryl palmitato, colesteryl oleato, colesteryl linoleato, y trilinoleína. Se observó que se producen algunos productos oxidados en la mayoría de las reacciones, lo que es coherente con la naturaleza oxidativa de la lacasa, que es una metaloproteína con cationes cobre que cataliza las reacciones de oxidación. Se han estudiado los compuestos de oxidación que se forman con el sistema lacasa-HBT, en las reacciones con esteroides, ácidos grasos y ésteres de esteroides.

Los hidroperóxidos y époxis, son los productos que predominan en la oxidación de los ácidos grasos insaturados (Frankel, 2005). La autooxidación por radicales libres del ácido oleico, implica la pérdida de hidrógeno en los carbonos alílicos 8 ó 10, formándose dos radicales alílicos. El ataque del oxígeno a estos intermedios produce una mezcla de cuatro hidroperóxidos alílicos (en los carbonos 8, 9,10 ó 11). En la reacción con lacasa-HBT en el ácido oleico, se identificaron los cuatro hidroxi-ácidos grasos correspondientes, así que se pensó que el mecanismo de reacción era el mismo. Además, también aparece el ácido 9,10-epoxioctadecanoico como producto del tratamiento con lacasa-HBT, que podría formarse como resultado de la reacción del hidroperóxido con el ácido oleico (Frankel, 2005). Después del tratamiento enzimático del ácido linoleico, no se encontró ningún producto de degradación, incluso usando columnas más largas de GC y programas de menor temperatura. Este hecho parece estar relacionado con la gran reactividad del ácido linoleico, que podría conducir a la rápida descomposición del hidroperóxido formado.

En la reacción del sitosterol con lacasa-HBT, el principal compuesto formado es 7-oxositosterol, y trazas de 7 $\alpha$ - y 7 $\beta$ -hidroxisitosterol. También se formó una pequeña cantidad de estigmasta-3,5-dien-7-ona. A partir de los productos de oxidación, se puede pensar que la oxidación es una reacción vía radicales libres, que comienza con la pérdida de un hidrógeno alílico reactivo en el carbono 7, seguido por el ataque del oxígeno para formar el radical 7-peroxi. Con la adición de hidrógeno a este radical se obtiene 7-hidroxiperóxido, cuya degradación forma 7 $\alpha$ - y 7 $\beta$ -hidroxisitosterol y 7-oxositosterol (Johnsson, 2004).

En las degradaciones de ésteres de esteroides por el sistema lacasa-HBT, los oxoesteroides formados dependen de la parte del ácido graso. El colesteril palmitato, es el éster de esteroide más resistente al ataque enzimático, seguido del colesteril oleato, mientras que el colesteril linoleato es el más susceptible a la oxidación. El grado de oxidación es proporcional al grado de insaturación que existe en el ácido graso, como habían demostrado otros estudios anteriores (Brown et al., 1996; Frankel, 2005).

En la reacción de colesteril palmitato con lacasa-HBT, aparecen varios productos de oxidación: 7-oxocolesteril palmitato, colest-3,5-dien-7-ona y ácido palmítico. La cantidad de productos de oxidación que aparecen en las reacciones de colesteril oleato y linoleato es mucho menor que en el colesteril palmitato, y además sus degradaciones son más rápidas.

En la reacción de colesteril linoleato, se detectaron unos productos de oxidación que eran una mezcla de colesteril y 7-oxocolesteril ésteres con las cadenas de ácidos grasos más cortas que la del colesteril linoleato. En la peroxidación de lipoproteínas del plasma, catalizada por iones cobre, se ha descrito la formación de colesteril ésteres core aldehídos (Kamido et al., 1995) similares a los compuestos que aparecen en la degradación del colesteril linoleato con lacasa-HBT (oxoalcanoil ésteres de colesterol y 7-oxocolesterol). La concentración de los core aldehídos disminuye a medida que aumenta la concentración de colest-3,5-dien-7-ona, que es el único producto de degradación que permanece al finalizar el tratamiento enzimático. En los tratamientos enzimáticos de colesteril palmitato y colesteril oleato, aparece como producto de reacción 7-oxocolesteril palmitato y 7-oxocolesteril oleato respectivamente, pero no se detecta 7-oxocolesteril linoleato a ningún tiempo del tratamiento enzimático del colesteril linoleato. Un resultado similar es el que se obtiene durante la oxidación catalizada por iones cobre de las lipoproteínas plasmáticas (Brown et al., 1996).

Se observa la formación de tres tipos de ésteres de esteroides oxidados después del tratamiento con lacasa-mediador: oxoesteroides esterificados, ésteres de esteroides oxidados en el ácido graso y ésteres de esteroides oxidados en el ácido graso y en el esteroide.

Algunos compuestos saturados (octadecano, hexadecanol, ácido palmítico y triheptadecanoína), no muestran reactividad con el sistema lacasa-HBT, incluso probando tratamientos de 8 horas, pero sí pueden ser degradados cuando forman mezclas con otros lípidos insaturados. Estos resultados ayudan a la comprensión de los resultados obtenidos con el tratamiento de lacasa-HBT de las pastas y pueden contribuir al desarrollo de métodos enzimáticos para el control del pitch en las fábricas de pasta y papel.

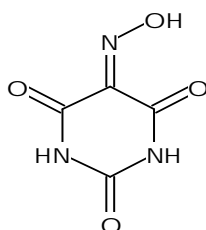
Estos resultados dieron lugar a la siguiente publicación:

**Molina, S., Rencoret, J., del Río J. C., Lomascolo, A., Record, E., Martínez, A.T. y Gutiérrez, A. (2008)** Oxidative degradation of model lipids representative for main paper pulp lipophilic extractives by the laccase–mediator system. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:211–222.

## 1.2. Lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* y ácido violúrico

### ▪ Tratamientos de pasta

En los estudios previos se probó el 1-hidroxibenzotriazol (HBT), **Fig. 11**, como mediador sintético, en estos experimentos se utilizará como mediador el ácido violúrico (**Fig. 22**), que también posee un grupo –NOH, al igual que el HBT.



**Fig. 22.** Estructura química del ácido violúrico.

La pasta kraft de eucalipto, se sometió a un tratamiento con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* en presencia de ácido violúrico como mediador, durante 12 horas. Se realizaron experimentos aplicando una fase de peróxido tras el tratamiento enzimático. Con estos tratamientos además de comprobar la eficacia del sistema lacasa-ácido violúrico para la eliminación de los compuestos lipofílicos responsables de la formación de los depósitos de pitch, también se midieron parámetros de deslignificación y blanqueo de la pasta (**Tabla 7**), para estudiar la posibilidad de que el sistema lacasa-ácido violúrico pueda realizar los tratamientos de blanqueo y eliminación de lípidos de forma simultánea.

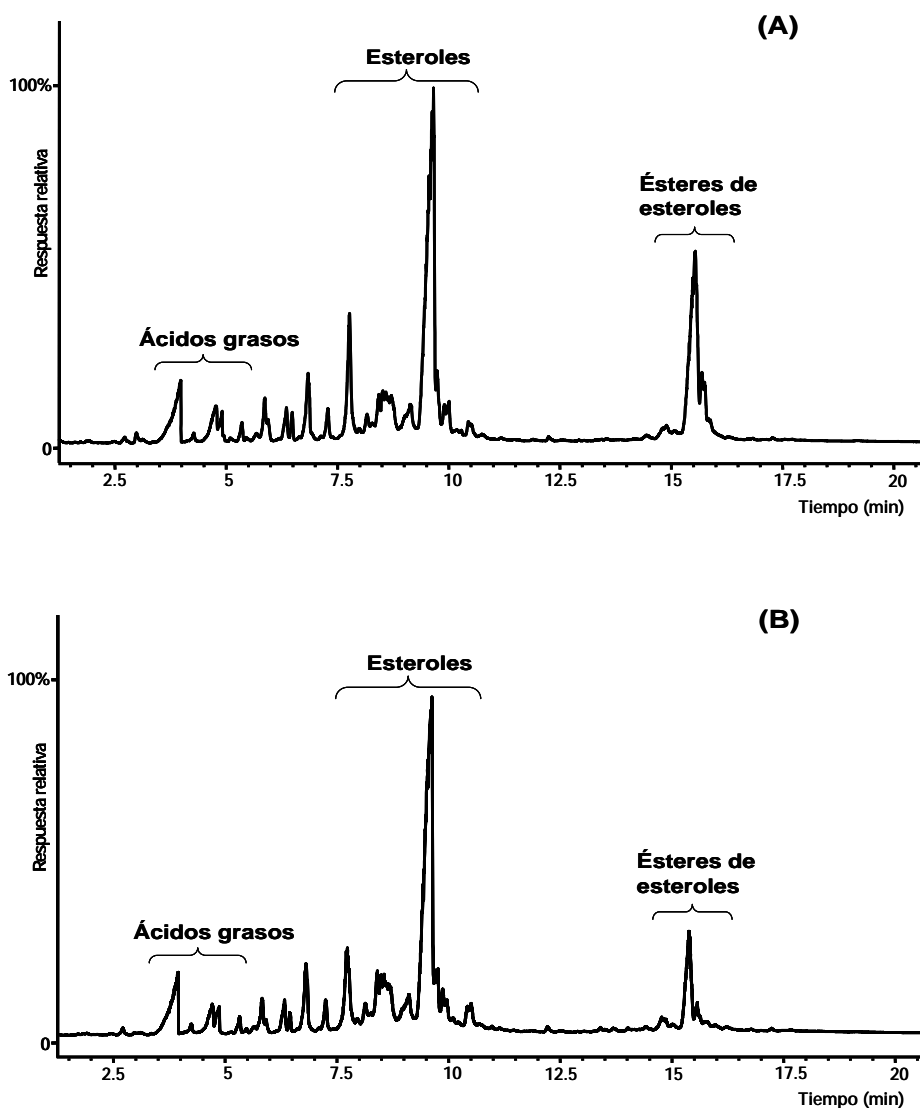
**Tabla 7.** Parámetros de blanqueo para el tratamiento lacasa-ácido violúrico sin fase de peróxido y aplicando una fase de peróxido.

		Índice Kappa	Viscosidad ml/g	Blancura, %ISO
Control 12 h	Inicial	14,9	1144	40,2
	<b>Peróxido</b>	<b>11,2</b>	<b>958</b>	<b>55,8</b>
Lacasa + ácido violúrico 12 h	Inicial	10,9	1158	43,7
	<b>Peróxido</b>	<b>5,8</b>	<b>826</b>	<b>72,5</b>

Se puede observar que el tratamiento lacasa-ácido violúrico disminuye el índice Kappa de la pasta 4 puntos y aumenta la blancura 3,5 puntos, lo cual es un dato positivo. Con la aplicación de la fase de peróxido se obtienen muy buenos valores para los parámetros de blanqueo, próximos a los obtenidos en el tratamiento con lacasa-HBT pero sin fase de peróxido. Con el tratamiento de lacasa-ácido violúrico seguido de una fase de peróxido, la blancura aumenta 16,7 puntos y el índice kappa disminuye 5,4 puntos, unos resultados muy espectaculares.

Los extractos lipofílicos de la pasta kraft de eucalipto estaban constituidos principalmente por ácidos grasos, esteroides libres y ésteres de esteroides. Entre los esteroides libres los mayoritarios fueron sitosterol, estigmastanol y fucosterol. Se

analizaron los extractos lipofílicos de las diferentes pastas del tratamiento por GC y GC/MS, usando columnas cortas y medianas, como se ha descrito anteriormente en los métodos. Los cromatogramas de los extractos lipofílicos de los tratamientos, muestran la disminución producida en los lípidos tras el tratamiento con lacasa-ácido violúrico (**Fig. 23**) y tras el tratamiento con lacasa-ácido violúrico con una fase de peróxido (**Fig. 24**). Se ha cuantificado la degradación de los distintos tipos de lípidos que existen en la pasta kraft de eucalipto: ácidos grasos, esteroides libres y ésteres de esteroides, a partir de los cromatogramas (**Tablas 8 y 9**).



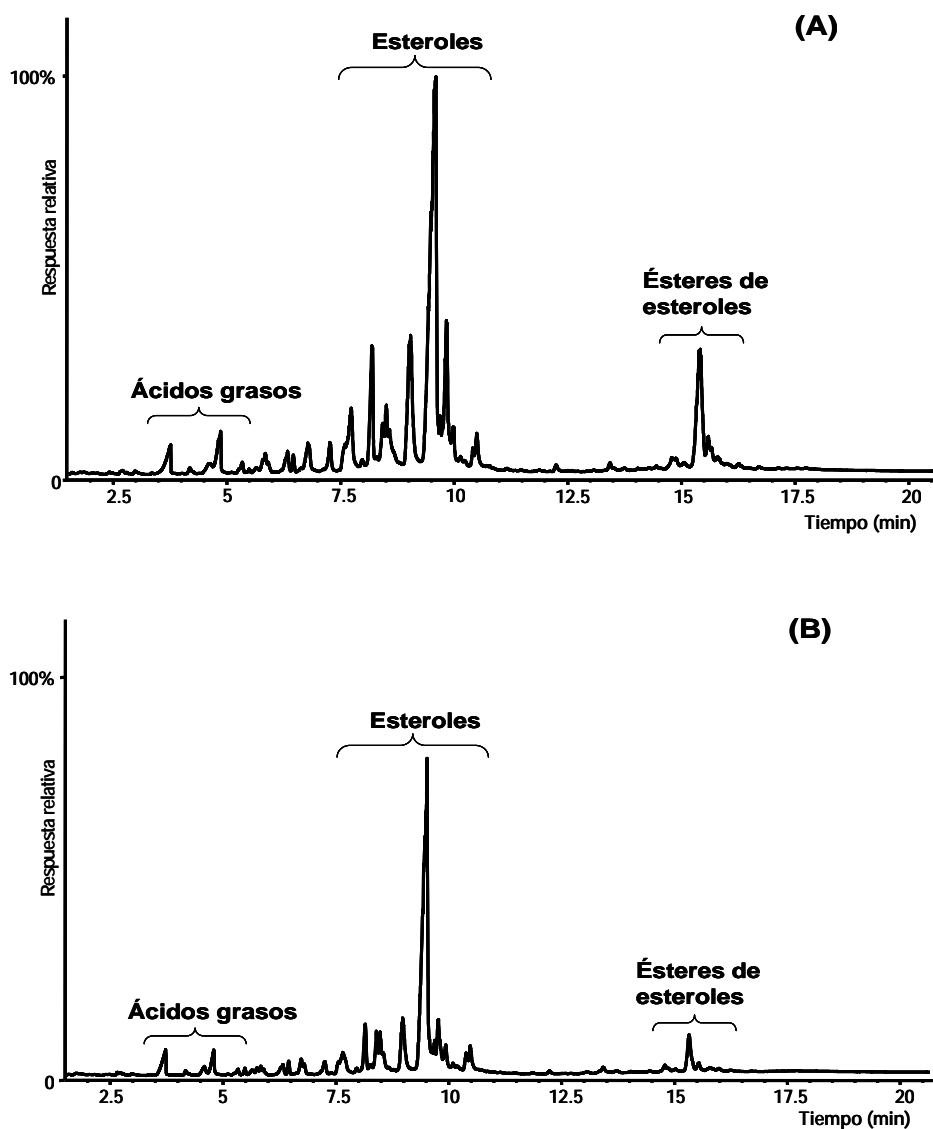
**Fig. 23.** Cromatogramas de los extractos lipofílicos de las pastas kraft de eucalipto del tratamiento lacasa-ácido violúrico. (A) Cromatograma de la pasta control 12 horas; (B) Cromatograma de la pasta tratada con lacasa-ácido violúrico durante 12 horas.



## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 8.** Porcentaje de degradación del extracto lipofílico del tratamiento de pasta kraft de eucalipto con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* y ácido violúrico durante 12 horas. Se ha calculado el porcentaje de degradación para las tres clases de lípidos que se indican en la tabla, que son los más abundantes en esta pasta.

	% Degradación Lacasa <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> + Ácido violúrico 12 h
Ácidos grasos	13,0
Esteroles libres	4,0
Ésteres de esteroles	61,0



**Fig. 24.** Cromatogramas de los extractos lipofílicos de las pastas kraft de eucalipto del tratamiento lacasa-ácido violúrico y posterior fase de peróxido. (A) Cromatograma de la pasta control 12 horas + fase de peróxido; (B) Cromatograma de la pasta tratada con lacasa-ácido violúrico durante 12 horas + fase de peróxido.

**Tabla 9.** Porcentaje de degradación del extracto lipofílico del tratamiento de pasta kraft de eucalipto con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* y ácido violúrico durante 12 horas y una fase posterior de peróxido. Se ha calculado el porcentaje de degradación para los tres tipos de lípidos que se indican en la tabla, que son los más abundantes en esta pasta.

	% Degradación Lacasa <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> + Ácido violúrico 12 h + Fase de peróxido 2h
Ácidos grasos	39,0
Esteroles libres	44,0
Ésteres de esteroles	81,0

### Discusión

En estos experimentos sobre pasta kraft de eucalipto, se ha podido comprobar la eficacia de otro mediador sintético como es el ácido violúrico, que como el HBT también tiene un grupo –NOH en su estructura. El tratamiento de 12h de la pasta con lacasa y ácido violúrico, mejora de forma notable los parámetros de blancura y deslignificación, pero el resultado es mucho más espectacular en el tratamiento enzimático seguido de una fase de peróxido, en este caso se ha disminuido el índice Kappa en más de 5 unidades, y la blancura %ISO ha aumentado 7,2 puntos y también ha mejorado la viscosidad.

En cuanto a la eliminación de compuestos lipofílicos, el tratamiento con lacasa y ácido violúrico de la pasta, degrada mayoritariamente los ésteres de esteroles, pero no degrada a los esteroles libres. Sin embargo al aplicar una fase posterior de peróxido, los esteroles libres se degradan en un 44% y la degradación de los ésteres de esteroles aumenta hasta un 81% y también aumenta la degradación de los ácidos grasos. En el análisis de los cromatogramas no se observa la formación de grandes cantidades de compuestos oxidados tras los tratamientos.

#### **Reacciones con compuestos modelo**

Se realizaron tratamientos enzimáticos de 2 y 6 horas de duración, con lacasa y ácido violúrico en compuestos lipofílicos modelo tales como sitosterol y colesteril linoleato (**Fig. 25**), y se repitieron aplicando una fase posterior de peróxido. Los resultados se muestran en la **Tabla 10**. El sitosterol libre no se degrada con el tratamiento de lacasa y ácido violúrico, sin embargo si se aplica una posterior fase de peróxido, se degrada un 44% de la cantidad inicial. El colesteril linoleato se degrada un 100%, tanto si se aplica el tratamiento enzimático con fase de peróxido como sin ella.

**Tabla 10.** Porcentajes de degradación de dos compuestos modelo tratados con lacasa y ácido violúrico y con el tratamiento enzimático seguido de una fase de peróxido.

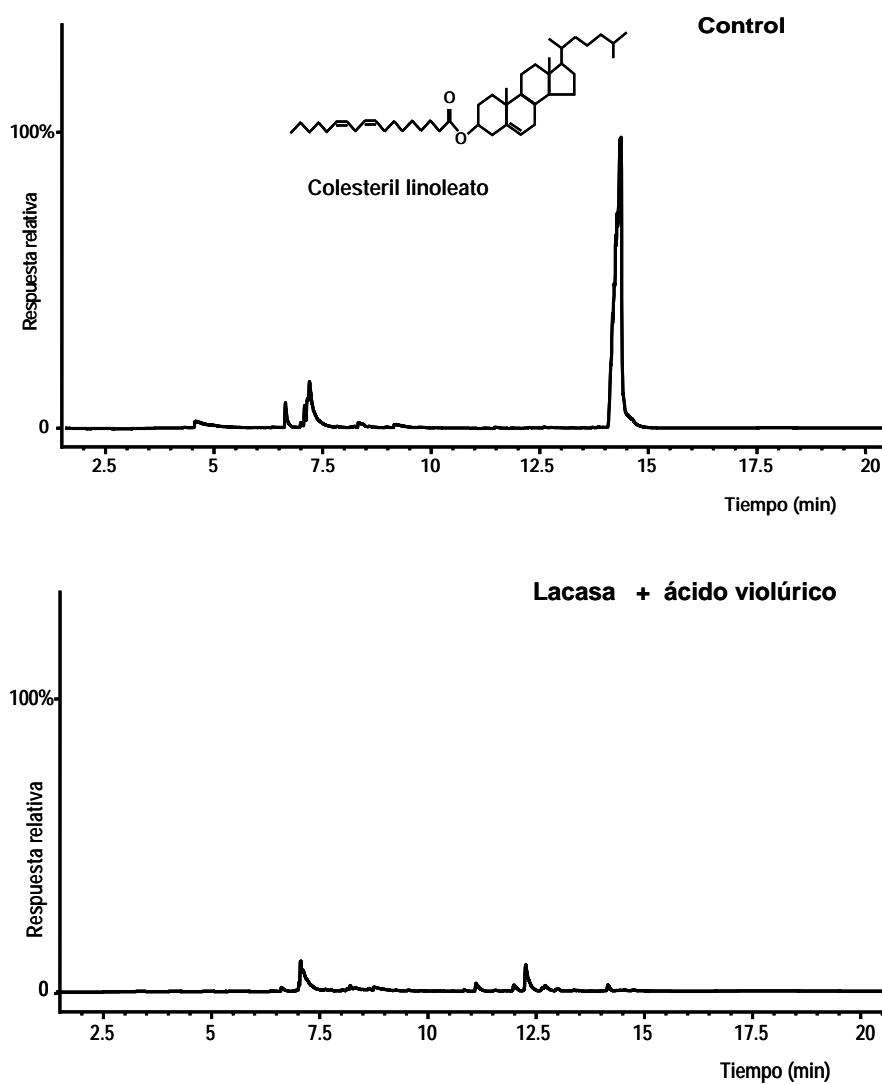
	% Degradación	
	Lacasa + ácido violúrico	Lacasa + ácido violúrico + Fase peróxido
Sitosterol libre	0	44
Colesteril linoleato	100	100

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

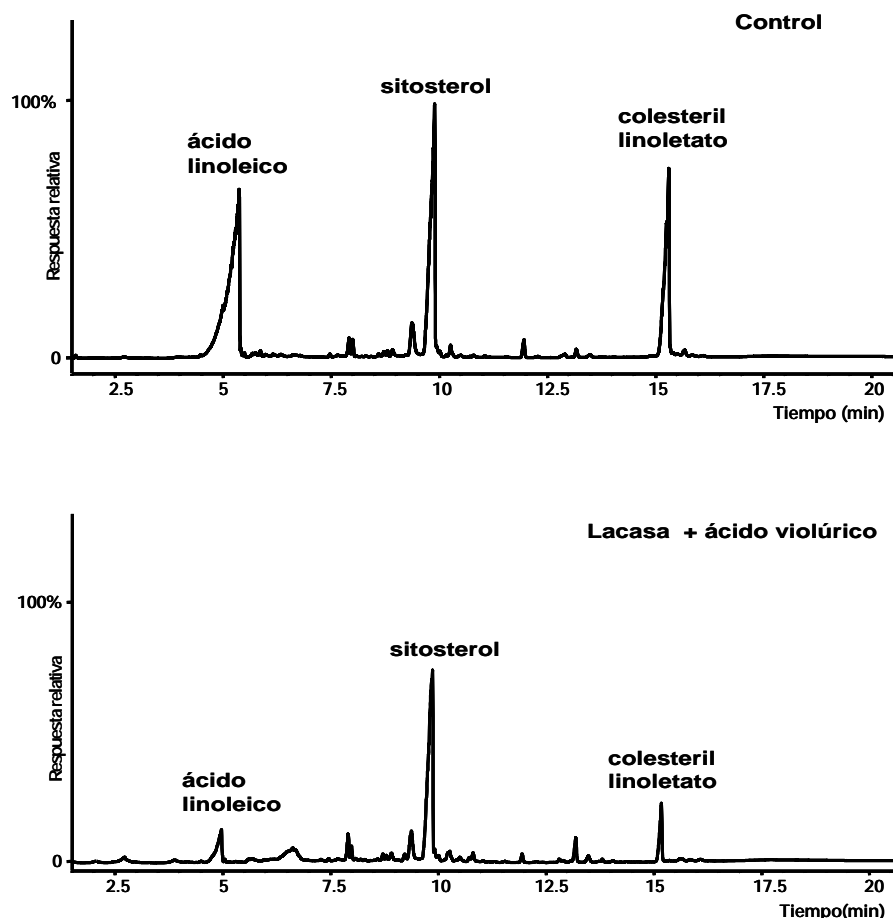
Con el objeto de estudiar si la degradación del sitosterol libre podría estar influenciada por la presencia de otros lípidos, se realizó el tratamiento con lacasa y ácido violúrico en una mezcla de tres compuestos lipídicos modelo: ácido linoleico, sitosterol y colesteril linoleato (**Fig. 26**) durante 3 horas, y también se realizó el tratamiento enzimático aplicándole una fase posterior de peróxido. Los porcentajes de degradación de estos experimentos se muestran en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.** Porcentajes de degradación de una mezcla de tres compuestos modelo con lacasa y ácido violúrico y con el tratamiento enzimático seguido de una fase de peróxido.

Mezcla de 3 lípidos modelo	% Degradación	
	Lacasa + ácido violúrico	Lacasa + ácido violúrico + Fase peróxido
Ácido linoleico	91	78
Sitosterol libre	24	48
Colesteril linoleato	83	85



**Fig. 25.** Cromatogramas del tratamiento con lacasa y ácido violúrico del compuesto modelo colesteril linoleato.



**Fig. 26.** Cromatogramas control 3h y tratamiento con lacasa y ácido violúrico 3h, de la mezcla de los tres lípidos modelo: ácido linoleico, sitosterol y colesteril linoleato.

### Discusión

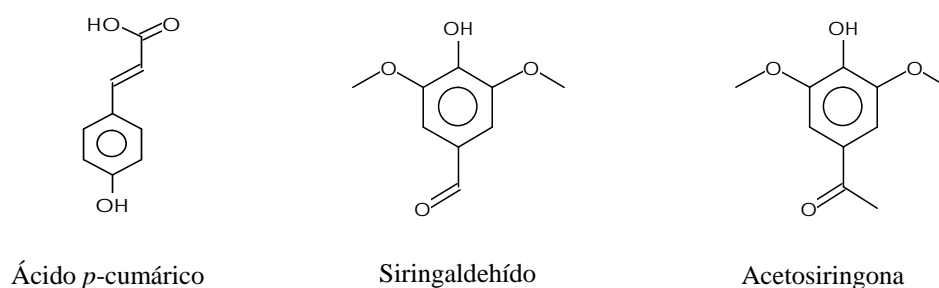
En estos experimentos sobre lípidos modelo, se ha podido comprobar la eficacia de otro mediador sintético como es el ácido violúrico, que como el HBT también tiene un grupo  $-NOH$  en su estructura. El tratamiento de lacasa y ácido violúrico actúa sobre el colesteril linoleato pero no sobre el sitosterol libre, sin embargo si se aplica tras el tratamiento enzimático una fase de peróxido, sí se consigue degradar el sitosterol en un 44%. Los tratamientos enzimáticos se han realizado con una duración de 6 horas y también de 3 horas, observándose que son suficientes 3 horas para la degradación total del colesteril linoleato

Para intentar estudiar si la degradación del sitosterol libre en la pasta podría estar influenciada por la presencia de otros lípidos, se realizan tratamientos enzimáticos en una mezcla de tres compuestos lipofílicos modelo: ácido linoleico + sitosterol libre + colesteril linoleato. Los tratamientos enzimáticos se realizaron durante 3 horas y algunos se realizaron aplicando una fase posterior de peróxido. El ácido linoleico y colesteril linoleato se degradan casi en su totalidad por el tratamiento con lacasa + ácido violúrico, tanto con fase de peróxido como sin ella. El sitosterol se degrada en torno a un 25 % con el tratamiento enzimático, lo que significa que aumenta la degradación respecto al tratamiento del sitosterol de forma aislada, y cuando se aplica una posterior fase de peróxido, aumenta el porcentaje de degradación.

### 1.3. Lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* y mediadores naturales

#### ▪ Tratamientos de pasta

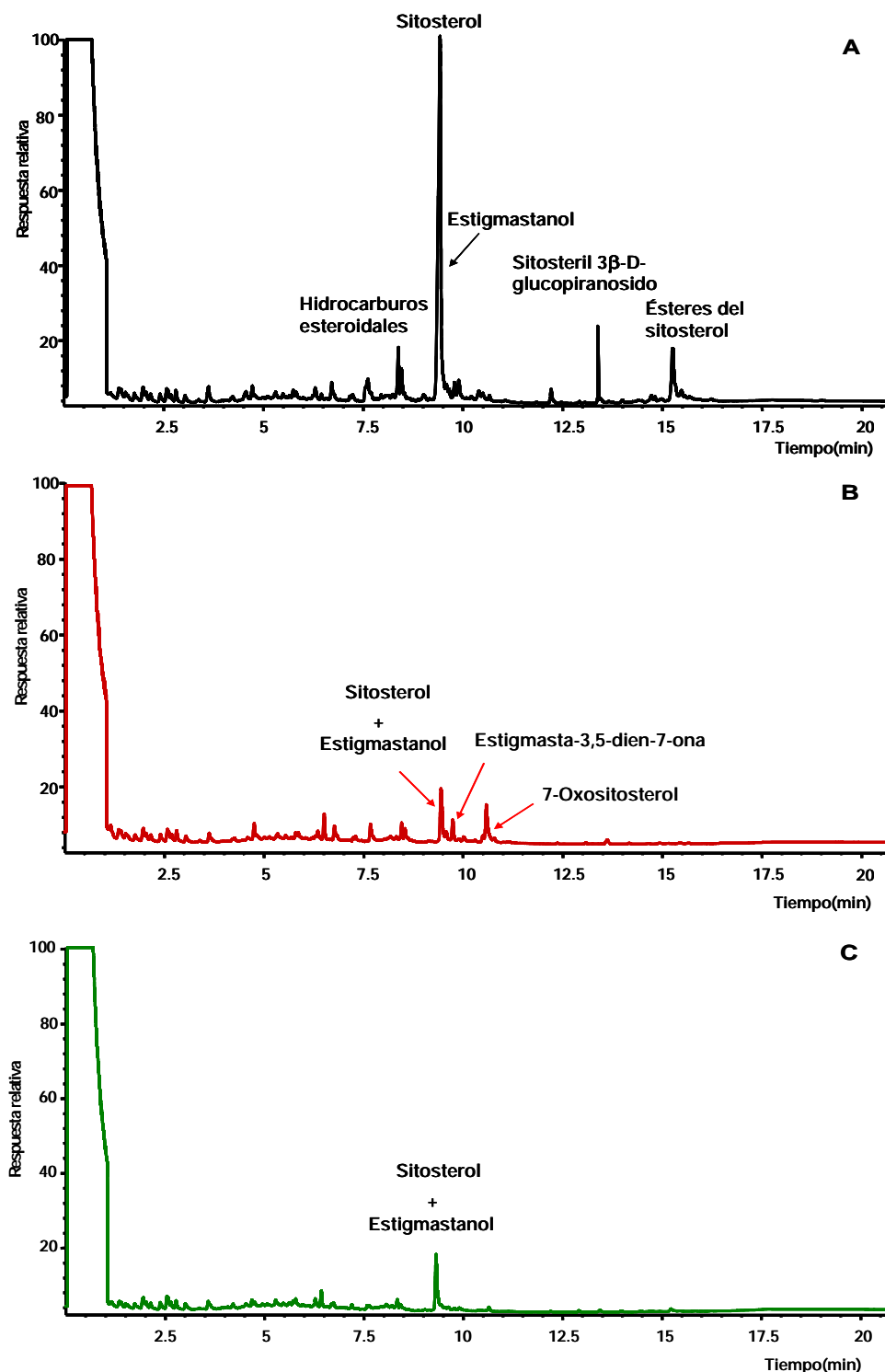
En los trabajos previos del grupo, se había demostrado por primera vez que los extractos lipofílicos de la pasta kraft de eucalipto, causantes del problema del “pitch”, podían ser eliminados con el sistema lacasa-mediador, usando un compuesto sintético como mediador rédox: HBT (Gutiérrez et al., 2006a). Para estos tratamientos de la pasta, se seleccionó la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* porque su potencial rédox (0,75 V), es el mayor de los potenciales rédox descritos para las lacasas (0,4-0,8), por su resistencia a elevadas temperaturas y estabilidad frente a la inactivación del mediador, y por sus buenos resultados en los estudios de deslignificación de las pastas (Sigoillot et al., 2005). Se ha propuesto el uso de varios compuestos naturales como mediadores rédox con las lacasas, en lugar de los mediadores sintéticos (Camarero et al., 2005; Johannes y Majcherczyk, 2000). En estos experimentos se han usado tres derivados fenólicos naturales relacionados con la lignina (**Fig. 27**), un precursor de la lignina: ácido *p*-cumárico (ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico) y dos productos de degradación de la lignina siringaldehído (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído), y acetosiringona (4-hidroxi-3,5-dimetoxifeniletanona); y se han probado como una alternativa al HBT, en la eliminación simultánea de la lignina y los extractos lipofílicos causantes del problema del “pitch”, usando lacasas.



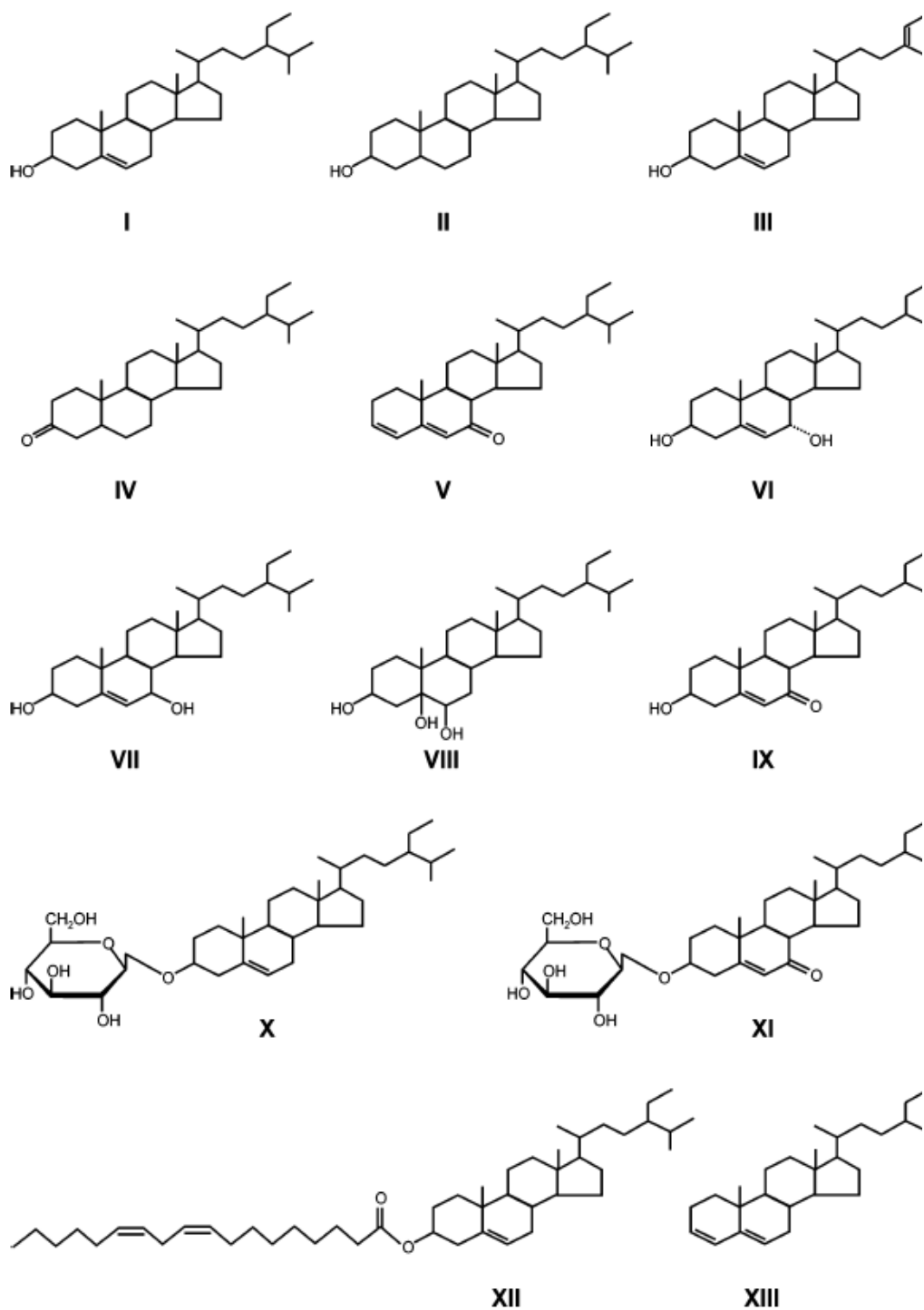
**Fig. 27.** Estructuras químicas de los tres compuestos fenólicos usados como mediadores naturales.

Se realizan los tratamientos de la pasta kraft de eucalipto sin blanquear con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* en presencia de cada uno de los mediadores naturales y posteriormente se aplica una etapa de peróxido. En cada tratamiento se realizan varios controles, incluyendo uno con la pasta tratada sólo con lacasa sin mediador. Los compuestos lipofílicos se analizaron por GC y GC/MS. El cromatograma de los lípidos en el control del tratamiento después de la etapa de peróxido, se muestra en la **Fig. 28A**. La composición relativa de los lípidos es similar a la que existe en la pasta de eucalipto TCF incluyendo los esteroides libres, cetonas esteroidales, glicósidos de esteroides, ésteres de esteroides e hidrocarburos esteroidales (**Fig. 29**). Además de tratar las pastas con lacasa y mediadores naturales, se realizó un tratamiento de la pasta con lacasa-HBT, para poder comparar los resultados con los obtenidos con los mediadores naturales, de forma que los tratamientos estuviesen realizados de forma simultánea. Se observó una gran disminución de los lípidos de la pasta, en el tratamiento con lacasa-HBT (**Fig. 28B**), y con algunos de los mediadores fenólicos, como se muestra en

la Fig. 28C para el siringaldehído. Se pueden observar diferencias entre los lípidos residuales que quedan tras el tratamiento enzimático con lacasa-HBT, y los tratamientos lacasa-mediadores naturales.



**Fig. 28.** Análisis por GC de los extractos lipofílicos durante el tratamiento con lacasa-mediador de la pasta de eucalipto seguido por una fase de peróxido: (A) pasta control tras la fase de peróxido; (B) pasta tratada con lacasa y HBT, y posterior fase de peróxido; (C) pasta tratada con lacasa y siringaldehído, y posterior fase de peróxido. Todos los cromatogramas corresponden a la misma cantidad de pasta.



**Fig. 29.** Estructuras químicas de los principales compuestos de los extractos lipofílicos de la pasta kraft de eucalipto. En la **Tabla 12** pueden encontrarse sus nombres y sus cantidades relativas (las estructuras **XII** y **XIII** corresponden a sitosteril linoleato y estigmata-3,5-dieno, respectivamente)

Las cantidades de los principales compuestos lipofílicos que se han identificado en las pastas de los tratamientos con lacasa y los diferentes mediadores, seguidos de la fase de peróxido, se muestran en la **Tabla 12**, comparándolas con las de los tratamientos sólo con lacasa (sin mediador) y con la pasta control (sin lacasa y sin mediador). Los resultados de los controles con lacasa desnaturalizada o sólo con el mediador, fueron los mismos que los obtenidos con la pasta control, como se esperaba.

**Tabla 12.** Composición de los extractos lipofílicos de la pasta kraft de eucalipto tratada con lacasa (*Pycnopus cinnabarinus*) en presencia y en ausencia de diferentes mediadores, seguido de una fase de peróxido, y control sin lacasa. Cuantificado por GC y GC/MS como mg/Kg de pasta seca. Lac, lacasa; SAD, siringaldehído; ACS, acetosiringona; APC, ácido *p*-cumárico; HBT, 1-hidroxibenzotriazol. Las desviaciones estándar de las medidas, están por debajo del 8% de los valores de la tabla.

	Control	Lac	SAD	ACS	APC	HBT
Esteroles libres totales	273	280	25	113	230	27
Sitosterol (I)	222	226	19	83	186	14
Estigmastanol (II)	42	44	4	25	37	12
Fucosterol (III)	9	10	2	5	7	1
Esteroles oxidados totales	32	53	7	10	43	69
Estigmastan-3-ona (IV)	0	0	0	1	0	2
Estigmasta-3,5-dien-7-ona (V)	4	4	2	7	8	17
7 $\alpha$ -hidroxisitosterol (VI)	7	13	1	1	6	8
7 $\beta$ -hidroxisitosterol (VII)	12	21	1	1	9	4
Sitostanetriol (VIII)	3	5	2	0	13	5
7-oxositosterol (IX)	5	10	1	1	7	34
Esteril glicósidos totales	27	27	2	12	24	5
Sitosteril 3 $\beta$ -D-glucopiranosido (X)	27	27	2	12	24	2
7-oxositosteril 3 $\beta$ -D-glucopiranosido (XI)	0	0	0	0	0	2
Ésteres de esteroides (XII)	90	57	7	43	57	2
Hidrocarburos esteroidales (XIII)	22	21	3	11	15	8
Esteroides totales	444	438	45	189	369	110

Los análisis de GC y GC/MS muestran que el tratamiento con lacasa y ácido *p*-cumárico disminuye el contenido en ésteres de esteroides en un 37%, incluyendo sitosteril linoleato (compuesto XII en la Fig. 29). Sin embargo, el contenido de esteroides libres y esteril glicósidos disminuye muy poco, sólo un 15% y 10% respectivamente. La eliminación de los ésteres de esteroides es similar a la que se consigue con el tratamiento de lacasa sola, y la mayoría de los ésteres de esteroides eliminados son los que provienen de ácidos grasos insaturados, que se degradan preferiblemente a los que provienen de ácidos grasos saturados. Los ésteres de esteroides del ácido linoleico y del ácido oleico que presenta la pasta de eucalipto, disminuyen después del tratamiento con lacasa más del 80% y del 70% respectivamente, mientras que los ésteres de esteroides del ácido esteárico y del palmítico disminuyen más del 20% y del 30% respectivamente. Esto se demostró aislando (usando SPE) de la fracción que contenía los ésteres de esteroides del extracto lipofílico de la pasta control y de la pasta tratada con lacasa, hidrolizando ambas fracciones, y determinando la composición en ácidos grasos libres por GC y GC/MS. Con anterioridad ya se había publicado la modificación de los ácidos grasos insaturados libres por lacasas (Karlsson et al., 2001).

El tratamiento de la pasta con lacasa en presencia de siringaldehído o acetosiringona, disminuye eficientemente el contenido de esteroides libres (91% y 59%, respectivamente), de ésteres de esteroides (92% y 52%, respectivamente) y de esteril



glucósidos (95% y 56%, respectivamente). Estos datos muestran que el mediador natural siringaldehído produce una disminución en el extracto lipofílico similar a la que produce el mediador sintético HBT. No se consigue la eliminación de los lípidos cuando tras el tratamiento enzimático se realiza una simple extracción alcalina (con las mismas condiciones que para la etapa de peróxido), esto revela que se necesita aplicar una posterior fase de peróxido en los tratamientos con lacas y mediadores naturales.

La cantidad de esteroides oxidados que estaban originariamente en la pasta kraft de eucalipto, estigmastan-3-ona, estigmasta-3,5-dien-7-ona, y 7-oxositosterol (compuestos **IV**, **V** y **IX**, respectivamente de la **Fig. 29**), y que provienen de la oxidación del sitosterol, aumenta en los tratamientos enzimáticos con lacasa y HBT de la pasta, y además se forman nuevos compuestos oxidados tales como 7-oxositosteril glucopiranosido (compuesto **XI**, **Fig. 29**). Sin embargo, con la pasta se trata con lacasa en presencia de siringaldehído, el sitosterol se elimina sin la producción de los esteroides oxidados, y además las cetonas esteroidales que estaban inicialmente presentes en la pasta kraft de eucalipto desaparecen durante el tratamiento con lacasa y siringaldehído. Esto supone una gran ventaja del uso de mediadores naturales fenólicos, porque consiguen eliminar los esteroides oxidados recalcitrantes que permanecen tras el tratamiento lacasa-HBT.

También se estudió el efecto de los tratamientos con lacasa en presencia de los mediadores fenólicos sobre algunas de las propiedades de la pasta, incluyendo el índice Kappa, blancura %ISO y viscosidad intrínseca, y los resultados se compararon con los de la pasta control (**Tabla 13**).

**Tabla 13.** Propiedades de la pasta de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) tratada con lacasa en presencia de diferentes mediadores, seguido de una fase de peróxido, y un control sin lacasa. Lac, lacasa; SAD, siringaldehído; ACS, acetosiringona; APC, ácido *p*-cumárico; HBT, 1-hidroxibenzotriazol.

	<b>Control</b>	<b>SAD</b>	<b>ACS</b>	<b>APC</b>	<b>HBT</b>
Índice Kappa	11,2	9,5	9,2	11,7	7,0
Blancura %ISO	56,9	65,7	65,8	59,1	73,4
Viscosidad intrínseca (ml/g)	1119	944	970	934	913

Las pastas con menor índice Kappa y mayor aumento en la blancura, se obtuvieron tras el tratamiento con lacasa y siringaldehído (disminuye 1,7 puntos el índice Kappa y la blancura aumenta 8,8 puntos respecto al control) y tras el tratamiento con lacasa y acetosiringona (disminuye 2,0 puntos el índice Kappa y aumenta 8,9 puntos la blancura respecto a la pasta control). El tratamiento de la pasta con lacasa y ácido *p*-cumárico, no mejoró las propiedades de la pasta, en realidad se observa un aumento del índice Kappa, que puede deberse a las uniones de los radicales del ácido *p*-cumárico a la lignina de la pasta. Los radicales de siringaldehído y acetosiringona no dan lugar a reacciones de unión por la presencia de dos grupos metoxilos en las posiciones C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub> del anillo aromático y la ausencia de dobles enlaces conjugados en la cadena.

La mejora de las propiedades de la pasta usando siringaldehído y acetosiringona como mediadores de la lacasa, es menor que la que se consigue con el tratamiento con lacasa-HBT, pero los resultados confirman la capacidad de estos mediadores naturales para deslignificar y blanquear la pasta kraft de eucalipto (Camarero et al., 2007). Tras los tratamientos enzimáticos hay una pérdida en la viscosidad de la pasta, pero la producida por los tratamientos con lacasa y mediadores naturales es menor que la producida por el tratamiento lacasa-HBT. De forma similar a lo que ocurre con la eliminación de los lípidos de la pasta, no se observa una mejora de las propiedades de la

pasta, cuando se aplica tras el tratamiento enzimático una simple extracción alcalina, esto revela nuevamente la necesidad de aplicar una posterior fase de peróxido al tratamiento con lacasa y mediadores naturales. Se espera un incremento en la porosidad del papel, como consecuencia beneficiosa de la eliminación de lípidos por el tratamiento lacasa-mediadores naturales.

### Discusión

El mediador sintético HBT pertenece al grupo de los compuestos -N(OH)-, que incluye a los mediadores de lacasa más eficientes descritos hasta ahora para la deslignificación y el blanqueo de la pasta de papel (Xu et al., 2001). A pesar de esto, varias cuestiones quedan aún por resolver antes de la implantación a nivel industrial de los sistemas lacasa-mediador. Una de estas cuestiones es el coste de los mediadores sintéticos, que hace difícil que su uso sea viable a nivel industrial, y otro de los obstáculos para el uso del sistema lacasa-mediador, es la posible toxicidad de algunos de los más poderosos mediadores para lacasas, tales como los compuestos -N(OH)- o los productos de sus reacciones.

Dos de los mediadores fenólicos naturales usados en estos experimentos, siringaldehído y acetosiringona, son tan eficientes como el HBT en la eliminación de los esteroides de la pasta de papel. Estos dos compuestos fenólicos son potencialmente baratos porque forman parte de los compuestos de bajo peso molecular que se extraen de las lejías negras del proceso kraft de pulpeo de la madera de eucalipto, donde juntos representan más del 30% del extracto de hexano-acetona, analizado por GC/MS (Gutiérrez et al., 2007). Además las lejías negras del pulpeo kraft de eucalipto (y probablemente de la mayoría de maderas de frondosas), podrían fraccionarse de tal forma que se obtuviese una fracción rica en siringaldehído y acetosiringona, que pudiese actuar junto con las lacasas como mediadores en el tratamiento de la pasta. Estos dos compuestos fenólicos están también presentes en los efluentes de los procesos de pulpeo (Ismail et al., 2005). Además el uso de estos mediadores naturales, no debería causar daños medioambientales, puesto que estos dos compuestos ya están presentes en el proceso, debido a la recirculación de las aguas de lavado de las pastas, y no se asocian con ningún tipo de toxicidad. En realidad, algunos de los aldehídos aromáticos derivados de la lignina son comercializados como aditivos alimentarios.

Se podría concluir con la idea de que algunos compuestos fenólicos derivados de la lignina pueden usarse eficientemente como mediadores redox alternativos a los mediadores sintéticos, en los tratamientos enzimáticos de las pastas con lacasas. De esta forma, se puede eliminar simultáneamente la lignina residual responsable del color de la pasta y los lípidos de la pasta que causan grandes pérdidas económicas por la formación de los depósitos de pitch. Los tratamientos lacasa-mediador, pueden introducirse de forma eficaz en un secuencia de blanqueo TCF para la pasta de eucalipto, como se ha publicado recientemente (Ibarra et al., 2006).

Estos resultados dieron lugar a la siguiente publicación:

**Gutiérrez, A., Rencoret, J., Ibarra, D., Molina, S., Camarero, S., Romero, J., del Río, J.C. y Martínez, A.T. (2007)** Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4124-4129.

### ▪ Reacciones con compuestos modelo

#### Mediador: siringaldehído

Se realizaron tratamientos con lacasa y siringaldehído de 3 y 6 horas de duración, aplicando una fase posterior de peróxido, en compuestos lipofílicos modelo tales como sitosterol y colesteril linoleato. Se hicieron controles con lacasa y fase de peróxido, y sin lacasa y sin mediador, y aplicando la fase de peróxido. Los resultados se muestran en la **Tabla 14**. El sitosterol libre no se degrada con el tratamiento de lacasa y siringaldehído seguido de una fase de peróxido. El colesteril linoleato se degrada entre 50-60 % con el tratamiento enzimático y la fase de peróxido.

**Tabla 14.** Porcentajes de degradación de dos lípidos modelo (sitosterol y colesteril linoleato) en los tratamientos con lacasa y fase de peróxido, y con el tratamiento lacasa-siringaldehído y fase de peróxido. Los porcentajes de degradación se han calculado a partir de los análisis de GC.

Lípidos modelo	% Degradación	
	Lacasa 6h + Fase Peróxido	Lacasa + siringaldehído 6h + Fase Peróxido
Sitosterol	0	0
Colesteril linoleato	41	50-60

En estos experimentos con compuestos lipofílicos modelo, se comprobó que el sitosterol de forma aislada no se degradaba con el tratamiento lacasa-siringaldehído seguido de fase de peróxido, pero sin embargo en los tratamientos que se habían realizado sobre pasta kraft de eucalipto, sí se conseguía disminuir la cantidad de sitosterol libre (**Fig. 28** y **Tabla 12**). Por este motivo se realizó un experimento de tratamiento de lacasa y siringaldehído seguido de una fase de peróxido, con una mezcla de tres lípidos modelo, para estudiar la influencia que tiene la presencia de otros lípidos en la degradación del sitosterol libre con el sistema lacasa-siringaldehído y fase de peróxido. El experimento se realizó con una mezcla de ácido linoleico, sitosterol y colesteril linoleato, a la que se le aplicó el tratamiento enzimático lacasa-siringaldehído durante 3 horas y posteriormente una fase de peróxido, los porcentajes de degradación se muestran en la **Tabla 15**. Se incluyó un control con lacasa 3 horas y fase de peróxido, además del control sin lacasa, sin mediador y con fase de peróxido.

**Tabla 15.** Porcentajes de degradación de la mezcla de tres lípidos modelo tras el tratamiento lacasa-siringaldehído de 3 horas, seguido de una fase de peróxido. Los porcentajes de degradación se han calculado a partir de los análisis de GC del control y del tratamiento enzimático con fase de peróxido.

Mezcla de tres lípidos modelo	% Degradación
	Lacasa + Siringaldehído 3h + Peróxido
Ácido linoleico	97
Sitosterol	99
Colesteril linoleato	90

En la mezcla, el sitosterol se degrada en su totalidad, a pesar de que no se observaba ninguna degradación en el tratamiento con lacasa-siringaldehído y fase de peróxido del sitosterol de forma aislada. También se degrada prácticamente en su totalidad el ácido linoleico, y el colesteryl linoleato se degrada en un 97% con lo que aumenta de forma considerable su porcentaje de degradación respecto a su tratamiento de forma aislada con lacasa-siringaldehído y fase de peróxido, que estaba entre 50 y 60%.

### Discusión

Tras los tratamientos de las pasta kraft de eucalipto con lacasa y los tres mediadores naturales, se ha elegido el más eficiente en la eliminación del extracto lipofílico de la pasta, que fue el siringaldehído, y se ha usado para realizar tratamientos lacasa-mediador natural en lípidos modelo y en mezcla de varios lípidos modelo, para intentar comprender la reactividad de varios lípidos modelo frente al sistema lacasa-siringaldehído seguido de una fase de peróxido.

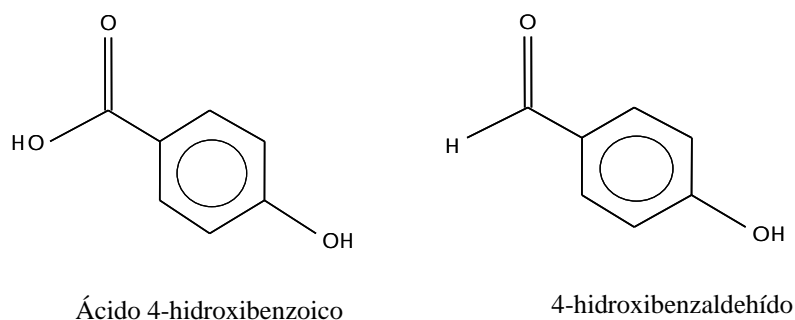
En los tratamientos de los extractos lipofílicos de la pasta, se comprobó que los esteroides libres no se degradaban en el tratamiento con lacasa-siringaldehído sin fase de peróxido, ni con el tratamiento sólo con lacasa con o sin fase de peróxido. Sin embargo, cuando no se aplica una fase posterior de peróxido tras el tratamiento lacasa-siringaldehído, aumentan los porcentajes de degradación de los esteroides libres y de los ésteres de esteroides.

Como los esteroides libres se degradan sólo si se aplica una fase posterior de peróxido, se ha intentado estudiar su degradación con más detalle, y por eso se han realizado tratamientos con el sitosterol de forma aislada. Se comprobó que de forma aislada no se degrada ni cuando se aplica una fase de peróxido tras el tratamiento enzimático. También se realizaron experimentos con colesteryl linoleato, aplicándole el sistema lacasa-siringaldehído y fase de peróxido, y se consigue un porcentaje de degradación entre 50-60%.

El sitosterol de forma aislada no se degradaba con el tratamiento lacasa-siringaldehído seguido de fase de peróxido, pero sin embargo en los tratamientos que se habían realizado sobre pasta kraft de eucalipto, si se conseguía disminuir la cantidad de sitosterol libre (**Fig. 28** y **Tabla 12**). Por este motivo se realizó un experimento de tratamiento de lacasa y siringaldehído seguido de una fase de peróxido, con una mezcla de tres lípidos modelo, para estudiar la influencia que tiene la presencia de otros lípidos en la degradación del sitosterol libre con el sistema lacasa-siringaldehído y fase de peróxido. En la mezcla, el sitosterol se degrada en su totalidad, también se degrada prácticamente en su totalidad el ácido linoleico, y el colesteryl linoleato se degrada en un 97% con lo que aumenta su degradación respecto a su tratamiento de forma aislada que estaba entre 50 y 60%. Se puede por tanto afirmar que la presencia de otros lípidos sí influye en la degradación (la favorece), con el sistema lacasa-siringaldehído y fase de peróxido.

Mediadores: 4-hidroxibenzaldehído y ácido 4-hidroxibenzoico

En estos experimentos se probaron dos mediadores naturales no utilizados en los experimentos anteriores: 4-hidroxibenzaldehído y ácido 4-hidroxibenzoico (**Fig. 30**). Se realizaron tratamientos lacasa-mediador con una mezcla de tres lípidos modelo y con sitosterol de forma aislada. El experimento del sitosterol se realizó aplicando una fase posterior de peróxido al tratamiento enzimático, y los experimentos de la mezcla de lípidos se realizaron con y sin fase de peróxido tras el tratamiento enzimático.



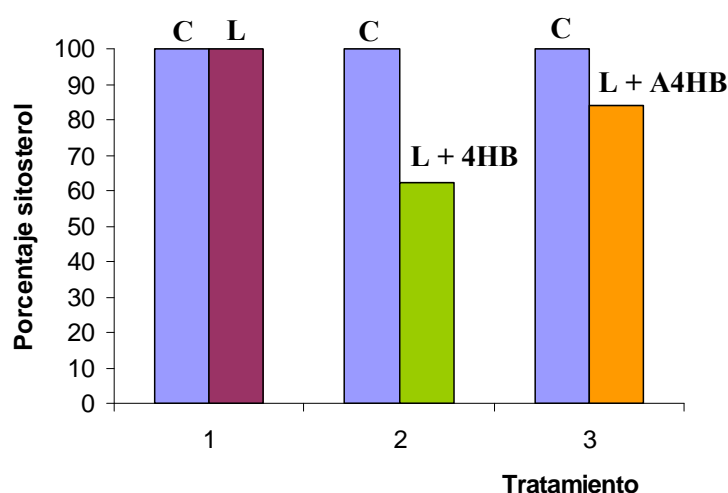
**Fig. 30.** Estructuras químicas de los mediadores naturales usados en estos experimentos: ácido 4-hidroxibenzoico y 4-hidroxibenzaldehído.

Los resultados de degradación del patrón de sitosterol con el tratamiento de lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* y cada uno de los dos mediadores naturales durante 3 horas y fase posterior de peróxido se muestran en la **Tabla 16** y en la **Fig. 31**. Se realizó un control con la fase de peróxido y un control con lacasa y fase de peróxido.

**Tabla 16.** Porcentajes de degradación de los tratamientos de lacasa, y lacasa en presencia de 4-hidroxibenzaldehído y ácido 4-hidroxibenzoico, aplicando a todos una fase posterior de peróxido. Los porcentajes de degradación se han calculado a partir de los análisis de GC. Lac, lacasa.

	% Degradación		
	Lac + Peróxido	Lac + 4-hidroxibenzaldehído + Peróxido	Lac + ácido 4-hidroxibenzoico + Peróxido
Sitosterol	0	37,8	16

En los experimentos anteriores se comprobó que el tratamiento con lacasa y otro mediador natural como era el siringaldehído, incluso con una fase posterior de peróxido, no degradaba en ningún porcentaje al sitosterol de forma aislada, sin embargo estos dos mediadores, sobre todo el 4-hidroxibenzaldehído consigue degradar en parte al sitosterol como compuesto modelo de forma aislada. Se plantea de nuevo, realizar los tratamientos sobre una mezcla de lípidos modelo, para comprobar si la presencia de otros lípidos afecta a la degradación, y en este caso a la degradación del sitosterol.



**Fig. 31.** Diagramas de barras para los porcentajes de sitosterol respecto al del control con peróxido, que permanecen tras los distintos tratamientos.

C: Control con fase de peróxido.

L: Tratamiento con lacasa y posterior fase de peróxido.

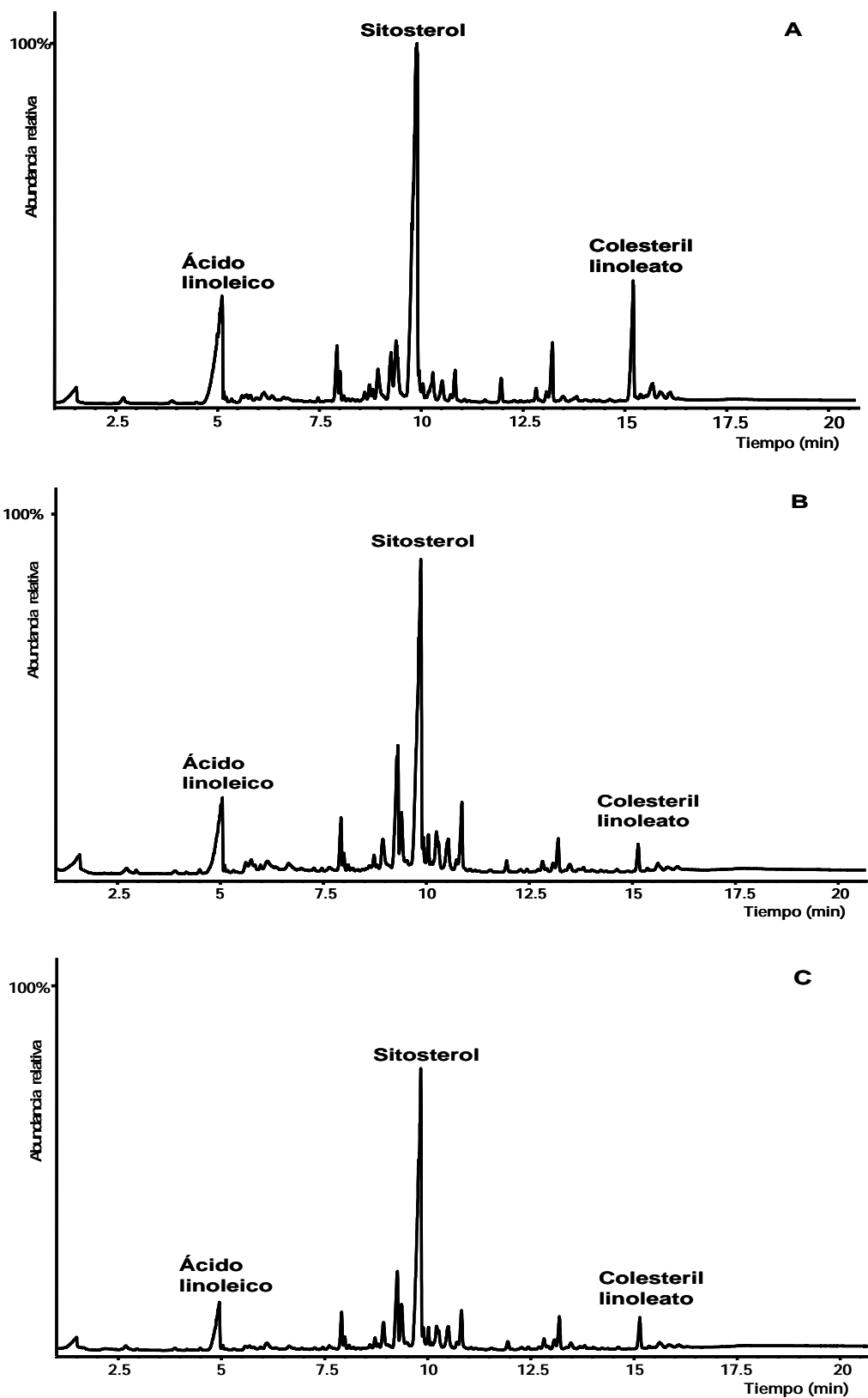
L + 4HB: Tratamiento con lacasa en presencia de 4-hidroxibenzaldehído como mediador y fase de peróxido.

L + A4HB: Tratamiento con lacasa en presencia de ácido 4-hidroxibenzoico como mediador y fase de peróxido.

Se realiza un tratamiento con lacasa en presencia de 4-hidroxibenzaldehído como mediador y otro con lacasa en presencia de ácido 4-hidroxibenzoico durante 3 horas, en una mezcla de tres lípidos modelo: ácido linoleico, sitosterol y colesteril linoleato. Se utilizó un control sin lacasa y sin mediador, y un control con lacasa. Posteriormente se repitieron todos los tratamientos, aplicando una fase posterior de peróxido (**Fig. 32**), también se aplica esta fase de peróxido a los controles sin lacasa y sin mediador, y al control con lacasa. Los resultados de degradación de estos tratamientos se muestran en la **Tabla 17**.

**Tabla 17.** Porcentajes de degradación de los tratamientos de lacasa, y lacasa en presencia de 4-hidroxibenzaldehído y ácido 4-hidroxibenzoico, con una mezcla de tres lípidos modelo: ácido linoleico, sitosterol y colesteril linoleato, con y sin posterior fase de peróxido. Los porcentajes de degradación se han calculado a partir de los análisis de GC. L, lacasa; P, fase de peróxido.

Mezcla de tres lípidos modelo	% Degradación		
	Lacasa	L + 4-hidroxibenzaldehido	L + Ácido 4-hidroxibenzoico
Ácido linoleico	13	47	56
Sitosterol	4	4,9	27
Colesteril linoleato	15	16,8	55,5
	Lacasa + P	L + 4-hidroxibenzaldehido + P	L + Ácido 4-hidroxibenzoico + P
Ácido linoleico	30,5	43,3	72,4
Sitosterol	28,6	30,8	47,4
Colesteril linoleato	70,1	80,8	81,3



**Fig. 32.** Cromatogramas control y tratamientos lacasa-mediadores naturales, seguidos todos de una fase posterior de peróxido, en una mezcla de tres compuestos lipofílicos modelo: ácido linoleico, sitosterol y colesteril linoleato. A: control 3 horas y fase de peróxido B: tratamiento lacasa en presencia de 4-hidroxibenzaldehído y fase posterior de peróxido. C: tratamiento lacasa en presencia de ácido 4-hidroxibenzoico y fase posterior de peróxido.

Se puede observar que el tratamiento con lacasa en presencia de ácido 4-hidroxibenzoico, es más efectivo que el tratamiento con lacasa y 4-hidroxibenzaldehído y el tratamiento con lacasa sola. Si se aplica una posterior fase de peróxido, se consiguen mayores porcentajes de degradación, para cada uno de los tres tratamientos que se indican en la **Tabla 17**, y sigue siendo el tratamiento con lacasa y ácido 4-hidroxibenzoico con fase posterior de peróxido, el más efectivo de los tres, para la eliminación de los lípidos. El tratamiento con lacasa y ácido 4-hidroxibenzoico consigue degradar un 27% el sitosterol, sin embargo si tras el tratamiento enzimático se aplica una fase posterior de peróxido, el sitosterol se degrada un 47%.

### Discusión

Al comenzar la experimentación con estos dos nuevos mediadores naturales, se comprobó que los tratamientos con lacasa y 4-hidroxibenzaldehído o ácido 4-hidroxibenzoico, con una fase posterior de peróxido, degradaban en un pequeño porcentaje al sitosterol, cuando se realizaban los tratamientos sobre el lípido modelo de forma aislada, sin embargo con el tratamiento lacasa-siringaldehído con posterior fase de peróxido, no se conseguía ninguna degradación. Este hecho hace pensar que se deben estudiar estos dos mediadores con más detalle.

Posteriormente se realiza un tratamiento con lacasa en presencia de 4-hidroxibenzaldehído como mediador y otro con lacasa en presencia de ácido 4-hidroxibenzoico durante 3 horas, en una mezcla de tres lípidos modelo: ácido linoleico, sitosterol y colesteril linoleato, para comprobar cómo influye la presencia de otros lípidos en la degradación del sitosterol, y tener una idea aproximada de lo que ocurrirá en el tratamiento de pasta con lacasa y estos dos nuevos mediadores. Se utilizó un control sin lacasa y sin mediador, y un control con lacasa. Posteriormente se repitieron todos los tratamientos, aplicando una fase posterior de peróxido, también se aplica esta fase de peróxido a los controles sin lacasa y sin mediador, y al control con lacasa.

En el tratamiento con lacasa y 4-hidroxibenzaldehído durante 3 horas, la degradación del sitosterol y colesteril linoleato, es prácticamente igual que la que produce el tratamiento sólo con lacasa (Tabla 18), sin embargo aumenta la degradación del ácido linoleico respecto a la que se produce sólo con lacasa. En el tratamiento con lacasa y ácido 4-hidroxibenzoico se consiguen los mayores porcentajes de degradación, 27% de degradación para el sitosterol y 55,5% para el colesteril linoleato. La aplicación de una fase posterior de peróxido aumenta la degradación de los tres lípidos modelo, en los tres tratamientos realizados, lacasa, lacasa en presencia de 4-hidroxibenzaldehído como mediador y lacasa en presencia de ácido 4-hidroxibenzoico. Los mayores porcentajes de degradación tanto del sitosterol (47,4%) como de colesteril linoleato (81,3%) se consiguen en el tratamiento con lacasa en presencia de ácido 4-hidroxibenzoico, aplicando una fase posterior de peróxido.

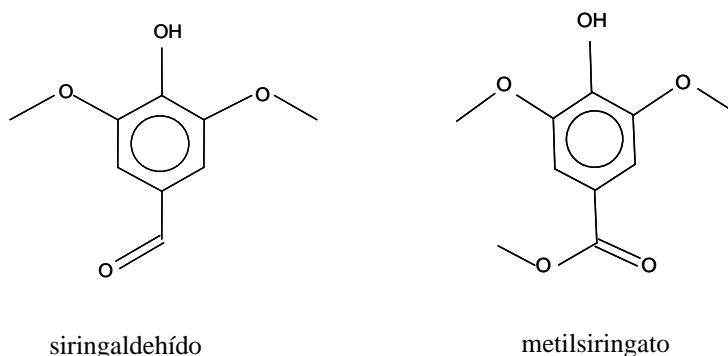
Aún no se ha concluido el estudio de los tratamientos de estos dos mediadores, puesto que dada su eficacia en mezclas de compuestos modelo, habría que aplicar estos tratamientos a distintos tipos de pasta, ajustando las condiciones del tratamiento, para comprobar sus efectos sobre la degradación de los lípidos responsables de la formación de los depósitos de “pitch”, y sobre los parámetros de deslignificación y blanqueo.



## 1.4. Lacasa de *Myceliophthora thermophila* y mediadores naturales

### ▪ Tratamientos de pasta

Se realizaron tratamientos enzimáticos usando lacasa de *Myceliophthora thermophila* (lacasa de bajo potencial rédox), en presencia de mediadores naturales con pasta kraft de eucalipto. Los mediadores naturales que se usaron fueron siringaldehído y metilsiringato (**Fig. 33**). Se realizó un control sin lacasa y sin mediador, y dos controles con lacasa y sin mediador, usando la enzima a dos concentraciones diferentes: 20 U/g pasta y 60 U/g de pasta, para comprobar si la acción del tratamiento con lacasa de *Myceliophthora thermophila* en el extracto lipofílico de la pasta y en la deslignificación, era la misma que la que producía el tratamiento con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*. Posteriormente, se realizaron los tratamientos enzimáticos aplicando una extracción alcalina y una etapa posterior de peróxido.



**Fig. 33.** Estructuras químicas de los mediadores naturales siringaldehído (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído) y metilsiringato (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoato metil éster).

### Variación en los parámetros de blanqueo y deslignificación de la pasta

Las variaciones de los parámetros de blancura y deslignificación de la pasta para los tratamientos enzimáticos y los tratamientos enzimáticos seguidos de una extracción alcalina se muestran en la **Tabla 18**.

Los tratamientos con lacasa de *Myceliophthora thermophila* no mejoran el índice Kappa ni la blancura de la pasta, tampoco cuando se aplica una extracción alcalina. El tratamiento lacasa-siringaldehído sin extracción, aumenta el índice kappa y disminuye la blancura, podría ser porque el siringaldehído quedase retenido junto a la lignina. Cuando se aplica una extracción alcalina al tratamiento con lacasa-siringaldehído, el índice Kappa no varía y la blancura continúa disminuyendo. En el tratamiento de la pasta con lacasa-metilsiringato, el índice kappa disminuye 1,7 puntos y la blancura % ISO disminuye. Pero si se aplica una extracción alcalina, los resultados mejoran disminuyendo el índice Kappa 2 puntos y aumentando 1,5 puntos la blancura % ISO.

**Tabla 18.** Parámetros de blanqueo para los tratamientos con lacasa *Myceliophthora thermophila* usando siringaldehído y metilsiringato como mediadores rédox, sin y con extracción alcalina. Se realizaron controles sin lacasa y sin mediador (sin extracción alcalina y con ella), y controles con distintas cantidades de lacasa sin mediador (sin extracción alcalina y con ella). Lac, lacasa; *Mt*, *Myceliophthora thermophila*; E, Extracción alcalina.

		<b>Indice Kappa</b>	<b>Viscosidad ml/g</b>	<b>Blancura % ISO</b>
Control 12 horas	inicial	14,9	1214	38,6
	<b>E</b>	<b>14,2</b>	<b>1212</b>	<b>41,2</b>
Lac <i>Mt</i> 20 U/g 12 horas	inicial	14,3	1251	36,2
	<b>E</b>	<b>13,7</b>	<b>1200</b>	<b>42,3</b>
Lac <i>Mt</i> 60 U/g 12 horas	inicial	14,3	1235	36,4
	<b>E</b>	<b>13,4</b>	<b>1216</b>	<b>41,7</b>
Lac <i>Mt</i> + siringaldehído 12 horas	inicial	17,6	1214	30,6
	<b>E</b>	<b>14,7</b>	<b>1189</b>	<b>37,6</b>
Lac <i>Mt</i> + metilsiringato 12 horas	inicial	13,1	1232	31,8
	<b>E</b>	<b>12,2</b>	<b>1171</b>	<b>42,7</b>

Como los parámetros de blanqueo no se mejoran de forma significativa, se realizan los tratamientos enzimáticos seguidos de una fase de peróxido, para intentar mejorar los resultados.

La variación de los parámetros de blanqueo y deslignificación de los tratamientos enzimáticos de la pasta, seguidos de una fase de peróxido, se muestran en la **Tabla 19**, comparándolos con los datos para los tratamientos enzimáticos sin fase de peróxido.

**Tabla 19.** Parámetros de blanqueo y deslignificación los tratamientos con lacasa *Myceliophthora thermophila* usando siringaldehído y metilsiringato como mediadores rédox, sin y con fase posterior de peróxido. Se realizaron controles sin lacasa y sin mediador (sin fase de peróxido y con ella), y controles con distintas cantidades de lacasa sin mediador (sin fase de peróxido y con ella). Lac, lacasa; *Mt*, *Myceliophthora thermophila*; P, fase de peróxido.

		<b>Indice Kappa</b>	<b>Viscosidad ml/g</b>	<b>Blancura % ISO</b>
Control 12 horas	inicial	14,9	1214	38,6
	<b>P</b>	<b>11,2</b>	<b>1040</b>	<b>57,6</b>
Lac <i>Mt</i> 20 U/g 12 horas	inicial	14,3	1251	36,2
	<b>P</b>	<b>10,5</b>	<b>1040</b>	<b>58,1</b>
Lac <i>Mt</i> 60 U/g 12 horas	inicial	14,3	1235	36,4
	<b>P</b>	<b>10,6</b>	<b>1037</b>	<b>58,2</b>
Lac <i>Mt</i> + siringaldehído 12 horas	inicial	17,6	1214	30,6
	<b>P</b>	<b>11,2</b>	<b>910</b>	<b>58,0</b>
Lac <i>Mt</i> + metilsiringato 12 horas	inicial	13,1	1232	31,8
	<b>P</b>	<b>8,5</b>	<b>1010</b>	<b>64,9</b>

Los mejores resultados en los tratamientos enzimáticos seguidos de una fase de peróxido, se obtuvieron en el tratamiento con lacasa-metilsiringato. El índice Kappa disminuye 2,7 puntos y la blancura % ISO aumenta 7 puntos. Con los demás tratamientos no se obtuvieron mejoras significativas de los parámetros.

Además se realizaron tratamientos con lacasa *Pycnoporus cinnabarinus* usando siringaldehído y metilsiringato como mediadores, y se repitieron aplicando una extracción alcalina y una fase posterior de peróxido, y se analizaron los parámetros de blanqueo y deslignificación (**Tablas 20 y 21**). Estos tratamientos se usaron para comparar los resultados de blanqueo de los dos tipos de lacasa (*Pycnoporus cinnabarinus* y *Myceliophthora thermophila*) y los dos mediadores. También se realizó el tratamiento de la pasta con lacasa *Pycnoporus cinnabarinus*-HBT, y se repitió aplicando una extracción alcalina y una fase de peróxido. Estos resultados se usaron para comparar la eficacia del blanqueo de los dos tipos de lacasas con los mediadores naturales, puesto que los mejores datos de blanqueo y de eliminación de lípidos en las pastas se han obtenido con el tratamiento de lacasa-HBT. Se tuvo en cuenta que la lacasa de *Myceliophthora thermophila* no es capaz de oxidar al 1-hidroxibenzotriazol (HBT), puesto que es una lacasa de bajo potencial rédox, al contrario que la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* que es de alto potencial rédox y si es capaz de oxidarlo.

**Tabla 20.** Parámetros de blanqueo para los tratamientos con lacasa *Pycnoporus cinnabarinus* usando siringaldehído, metilsiringato y HBT como mediadores rédox, sin y con extracción alcalina. Se realizaron controles sin lacasa y sin mediador (sin extracción alcalina y con ella), y controles con distintas cantidades de lacasa sin mediador (sin extracción alcalina y con ella). Lac, lacasa; Pc, *Pycnoporus cinnabarinus*; E, Extracción alcalina.

		<b>Índice Kappa</b>	<b>Viscosidad mL/g</b>	<b>Blancura % ISO</b>
Control 12 horas	inicial	16,0	1117	38,3
	<b>E</b>	<b>15,1</b>	<b>1081</b>	<b>39,9</b>
Lac Pc 20 U/g 12 horas	inicial	15,4	1135	35,4
	<b>E</b>	<b>14,9</b>	<b>1074</b>	<b>40,5</b>
Lac Pc 60 U/h 12 horas	inicial	15,3	1114	35,3
	<b>E</b>	<b>14,7</b>	<b>1001</b>	<b>40,1</b>
Lac Pc + siringaldehído 12 horas	inicial	16,7	1083	30,6
	<b>E</b>	<b>15,2</b>	<b>992</b>	<b>36,6</b>
Lac Pc + metilsiringato 12 horas	inicial	15,1	1135	33,1
	<b>E</b>	<b>14,1</b>	<b>1042</b>	<b>40,1</b>
Lac Pc + HBT 12 h	inicial	12,1	1020	39,9
	<b>E</b>	<b>10,1</b>	<b>913</b>	<b>45,8</b>

Los parámetros de blanqueo y deslignificación para la pasta kraft de eucalipto con los tratamientos lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*, no varían de forma apreciable, a excepción de cuando se usa el HBT como mediador. En el tratamiento con lacasa

*Pycnopus cinnabarinus* en presencia de HBT, se consigue disminuir unos 4 puntos el índice Kappa, y se aumenta 1,6 puntos la blancura % ISO. En el tratamiento con lacasa *Pycnopus cinnabarinus* en presencia de HBT como mediador rédox, y posterior aplicación de fase de peróxido, el índice Kappa disminuye 5 puntos y la blancura % ISO aumenta 6 puntos. En el tratamiento de la pasta con lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* y siringaldehído (al igual que en el tratamiento con lacasa *Myceliophthora thermophila*), se observa que el índice Kappa aumenta débilmente y la blancura % ISO disminuye 7,7 puntos, este hecho puede deberse a la unión del mediador a la lignina.

**Tabla 21.** Parámetros de blanqueo y deslignificación los tratamientos con lacasa *Pycnopus cinnabarinus* usando siringaldehído, metilsiringato y HBT como mediadores rédox, sin y con fase posterior de peróxido. Se realizaron controles sin lacasa y sin mediador (sin fase de peróxido y con ella), y controles con distintas cantidades de lacasa sin mediador (sin fase de peróxido y con ella). Lac, lacasa; Pc, *Pycnopus cinnabarinus*; P, fase de peróxido.

		<b>Índice Kappa</b>	<b>Viscosidad, mL/g</b>	<b>Blancura, % ISO</b>
Control 12 h	inicial	16,0	1117	38,3
	<b>P</b>	<b>11,9</b>	<b>857</b>	<b>53,9</b>
Lac Pc 20 U/h 12 horas	inicial	15,4	1135	35,4
	<b>P</b>	<b>11,3</b>	<b>863</b>	<b>55,1</b>
Lac Pc 60 U/h 12 horas	inicial	15,3	1114	35,3
	<b>P</b>	<b>11,2</b>	<b>868</b>	<b>55,2</b>
Lac Pc + siringaldehído 12 horas	inicial	16,7	1083	30,6
	<b>P</b>	<b>10,4</b>	<b>868</b>	<b>59,6</b>
Lac Pc + metilsiringato 12 horas	inicial	15,1	1135	33,1
	<b>P</b>	<b>10,5</b>	<b>899</b>	<b>57,5</b>
Lac Pc + HBT 12 horas	inicial	12,1	1020	39,9
	<b>P</b>	<b>7,2</b>	<b>746</b>	<b>68,3</b>

Los parámetros de blanqueo y deslignificación para la pasta kraft de eucalipto con los tratamientos con lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* y mediadores naturales, no varían de forma apreciable, a excepción de cuando se aplica una fase posterior de peróxido. En el tratamiento con lacasa *Pycnopus cinnabarinus* y HBT como mediador, el índice Kappa disminuye 4 puntos y la blancura aumenta 2 puntos. En el tratamiento con lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* en presencia de metilsiringato aplicando una fase posterior de peróxido, el índice Kappa disminuye 1,5 puntos y la blancura % ISO aumenta 3,6 puntos, y el mismo tratamiento pero usando siringaldehído se consigue disminuir el índice Kappa 1,4 puntos y la blancura % ISO aumenta 5,7 puntos. Los mejores resultados se obtienen tras el tratamiento de la pasta con lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* y HBT, y fase posterior de peróxido, el índice Kappa disminuye 4,7 puntos y la blancura % ISO aumenta 14,4 puntos.

Eliminación de los extractos lipofílicos de la pasta

Se analizó la degradación de los extractos lipofílicos para los tratamientos anteriormente mencionados, usando lacasa de *Myceliophthora thermophila*, en presencia de mediadores naturales con pasta de eucalipto. Las degradaciones de los extractos lipofílicos con el tratamiento enzimático, con el tratamiento enzimático con extracción alcalina y con el tratamiento enzimático seguido de fase de peróxido, se muestran en la **Tabla 22**.

**Tabla 22.** Porcentajes de degradación de los principales grupos de lípidos de la pasta tratada con lacasa de *Myceliophthora thermophila* en presencia de metilsiringato y siringaldehído como mediadores. Los tratamientos se repiten aplicando una extracción alcalina y una fase posterior de peróxido. Se realizaron controles sin lacasa y sin mediador, y controles con lacasa y sin mediador, usando la enzima a dos concentraciones diferentes: 20 U/g pasta y 60 U/g de pasta. Los porcentajes de degradación se han calculado a partir de los análisis de GC. Lac, lacasa; Mt, *Myceliophthora thermophila*; MeS, metilsiringato; SAD, siringaldehído; P, fase de peróxido.

<b>% Degradación</b>				
<b>Lac Mt</b>	Lac (20U/g) 12h	Lac (60U/g) 12h	Lac + MeS 12h	Lac + SAD 12h
Ácidos grasos	13.6	19.3	28.9	20.5
Esteroles libres	0	1.4	30.6	32.2
Ésteres de esteroles	19.2	22.4	85.5	84.5
	Lac (20U/g) 12 + Extracción	Lac (60U/g) 12h + Extracción	Lac + MeS 12h + Extracción	Lac + SAD 12h + Extracción
Ácidos grasos	-	4.3	0	0
Esteroles libres	-	8.5	7.1	34.4
Ésteres de esteroles	-	29.6	82.6	71.8
	Lac (20U/g) 12 + Peróxido	Lac (60U/g) 12h + Peróxido	Lac + MeS 12h + Peróxido	Lac + SAD 12h + Peróxido
Ácidos grasos	18.6	40.1	36.0	63.3
Esteroles libres	19.4	40.4	39.8	75.8
Ésteres de esteroles	60.2	71.0	90.8	95.6

Se comprobó que el tratamiento con lacasa de *Myceliophthora thermophila*-siringaldehído y lacasa de *Myceliophthora thermophila*-metilsiringato, eliminaban aproximadamente un 30% de los esteroles libre y un 85% los ésteres de esteroles. El tratamiento de lacasa *Myceliophthora thermophila* sin mediador, no degrada a los esteroles libres, aunque se aumente su concentración en el tratamiento, igual que ocurría en los tratamientos con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*.

La aplicación de una extracción alcalina tras el tratamiento enzimático, no mejora de forma considerable los resultados. Al aplicar una fase de peróxido tras el tratamiento sólo con lacasa de *Myceliophthora thermophila*, dependiendo de la concentración a la que se use la enzima, se obtiene una degradación entre 18% y el 40% para los ácidos grasos y los esteroles libres; y una degradación entre 60% y 70% para los ésteres de esteroles. En el tratamiento de la pasta con lacasa de *Myceliophthora thermophila* usando metilsiringato como mediador y aplicando una fase posterior de peróxido, se obtiene una degradación en torno al 36% para los ácidos grasos, al 40 % para los

esteroles libres y al 91% para los ésteres de esterole. Con el tratamiento de la pasta kraft de eucalipto con lacasa de *Myceliophthora thermophila*, usando siringaldehído como mediador, y aplicando una fase posterior de peróxido, se consigue la mayor degradación del extracto lipofílico de la pasta, 63% para los ácidos grasos, 76% para los esterole libres y 96% para los ésteres de esterole.

También se analizaron las degradaciones de los extractos lipofílicos de los tratamientos realizados con lacasa *Pycnoporus cinnabarinus* que se han mencionado anteriormente, para poder comparar la acción de los dos tipos de lacasas, en lo referente a la eliminación del extracto lipofílico de la pasta.

En la **Tabla 23**, se muestra la comparación entre los tratamientos con lacasa *Myceliophthora thermophila* en presencia de siringaldehído y metilsiringato, y estos tratamientos enzimáticos aplicando una fase posterior de peróxido. En la **Tabla 24** se muestra la comparación entre los tratamientos con lacasa *Pycnoporus cinnabarinus* en presencia de siringaldehído y metilsiringato, y estos tratamientos enzimáticos aplicando una fase posterior de peróxido. En estas dos tablas se pueden comparar los resultados de los mismos tratamientos realizados con los dos tipos de lacasa: *Myceliophthora thermophila* y *Pycnoporus cinnabarinus*.

En los tratamientos con metilsiringato como mediador, los mejores resultados de degradación sin aplicar la fase de peróxido se obtienen con lacasa de *Myceliophthora thermophila*, un 31% de degradación en esterole libres y un 86% de degradación en los ésteres de esterole, sin embargo con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* se obtiene un 15% de degradación de los esterole libres y un 41% de los ésteres de esterole. En los tratamientos con siringaldehído como mediador, los mejores resultados de degradación sin aplicar la fase de peróxido se obtienen con lacasa de *Myceliophthora thermophila*, un 32% de degradación en los esterole libres y un 85% de degradación en los ésteres de esterole, frente al 0 % de degradación de los esterole libres y 37% de los ésteres de esterole que se consigue con la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Al aplicar a los tratamientos una fase posterior de peróxido, la degradación tanto de los esterole libres como de los ésteres de esterole aumenta. Los mejores resultados se obtienen usando siringaldehído como mediador, tanto con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*, como con lacasa de *Myceliophthora thermophila*. El tratamiento con lacasa de *Myceliophthora thermophila* y siringaldehído, aplicando una fase posterior de peróxido, produce una degradación de los esterole libres del 76% y de los ésteres de esterole del 96%; y el tratamiento con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* y siringaldehído, aplicando una fase posterior de peróxido, produce una eliminación de los esterole libres del 76% y de los ésteres de esterole del 96%.

**Tabla 23.** Porcentajes de degradación de los principales grupos de lípidos del extracto lipofílico de la pasta kraft de eucalipto, en los tratamientos con lacasa de *Myceliophthora thermophila*. Lac, lacasa; Mt, *Myceliophthora thermophila*; MeS, metilsiringato; SAD, siringaldehído.

Degradación (%)				
Lacasa Mt	Lac Mt (20 U/g)	Lac Mt (60 U/g)	Lac-MeS	Lac-SAD
Esterole libres	0	0	31	32
Ésteres de esterole	19	22	86	85
	Lac Mt (20 U/g) + Peróxido	Lac Mt (60 U/g) + Peróxido	Lac-MeS + Peróxido	Lac-SAD + Peróxido
Esterole libres	19	40	40	76
Ésteres de esterole	60	71	91	96

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 24.** Porcentajes de degradación de los principales grupos de lípidos del extracto lipofílico de la pasta kraft de eucalipto, en los tratamientos con lacasa de *Pycnopus cinnabarinus*. Lac, lacasa; Pc, *Pycnopus cinnabarinus*; MeS, metilsiringato; SAD, siringaldehído.

Degradación (%)				
<b>Lacasa Pc</b>	Lac Pc (20 U/g)	Lac Pc (60 U/g)	Lac-MeS	Lac-SAD
Esteroles libres	0	0	15	0
Ésteres de esteroles	37	-	41	37
	Lac Pc (20 U/g) + Peróxido	Lac Pc (60 U/g) + Peróxido	Lac-MeS + Peróxido	Lac-SAD + Peróxido
Esteroles libres	0	16	18	80
Ésteres de esteroles	39	68	44	86

### Discusión

En cuanto a los parámetros de blanqueo y deslignificación se puede afirmar que los tratamientos con los dos tipos de lacasa y los dos mediadores naturales sin extracción alcalina ni fase de peróxido, no los mejoran de forma apreciable, y que además disminuye la blancura % ISO, especialmente en los tratamientos con los dos tipos de lacasa y siringaldehído como mediadores, este hecho podría deberse a que el mediador quedase unido o retenido junto a la lignina.

Cuando tras el tratamiento enzimático, se aplica una extracción alcalina, se observa una leve mejoría en cuanto a los parámetros de la pasta, cuando se usa metilsiringato como mediador. En el tratamiento con lacasa de *Myceliophthora thermophila* y metilsiringato con una extracción alcalina, se obtiene una disminución del índice Kappa de 2 puntos y un aumento de la blancura % ISO de 1,5 puntos. En el tratamiento con lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* y metilsiringato con una extracción alcalina, se obtiene una disminución del índice Kappa de 1 punto y un aumento de la blancura % ISO de 0,2 puntos. Por tanto, con una extracción alcalina y usando metilsiringato como mediador rédox, se obtiene alguna mejoría en los parámetros de blanqueo y deslignificación, usando lacasa de *Myceliophthora thermophila* en lugar de lacasa de *Pycnopus cinnabarinus*.

Cuando tras el tratamiento enzimático se aplica una fase de peróxido, los resultados de blanqueo mejoran. Los mejores datos para blancura y deslignificación se obtienen con el tratamiento con lacasa de *Myceliophthora thermophila* y metilsiringato, seguido de una fase de peróxido, se disminuye el índice Kappa 2,7 puntos y la blancura % ISO aumenta 7 puntos. Si se observan los datos de los tratamientos con lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* se comprueba que el blanqueo con los mediadores naturales y lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* no es tan eficiente como con lacasa de *Myceliophthora thermophila* y que los mejores resultados de los tratamientos con lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* se obtienen usando siringaldehído como mediador, seguido de una fase de peróxido, se disminuye el índice Kappa 1,5 puntos y aumenta la blancura % ISO 5,7 puntos.

El mediador sintético HBT sigue siendo más eficaz que los mediadores naturales, obteniéndose en los tratamientos mejores variaciones de los parámetros de blanqueo y deslignificación, aunque sólo actúa como mediador con lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* que es de alto potencial rédox.

En la degradación de los extractos lipofílicos de la pasta responsables de la formación de los depósitos de pitch, los mejores resultados de eliminación usando

lacasa de *Myceliophthora thermophila*, se obtienen en presencia de siringaldehído como mediador con aplicación de una fase posterior de peróxido. Con los tratamientos de la pasta sólo con lacasa *Myceliophthora thermophila* se obtienen valores de degradación semejantes a los que se obtienen con lacasa *Pycnoporus cinnabarinus*, no degradando ninguna de las dos lacasas a los esteroides libres. Los tratamientos con lacasa *Myceliophthora thermophila* y mediadores naturales eran más eficaces que los tratamientos con lacasa *Pycnoporus cinnabarinus* y mediadores. En los tratamientos con lacasa *Myceliophthora thermophila* y siringaldehído o metilsiringato, se obtiene una degradación en torno al 30% para los esteroides libres y un 85% para los ésteres de esteroides; mientras que en los tratamientos con lacasa *Pycnoporus cinnabarinus* y estos dos mediadores, se obtenían menores porcentajes de degradación e incluso los esteroides no se degradan en el tratamiento con lacasa *Pycnoporus cinnabarinus* y siringaldehído. Cuando se aplica una fase posterior de peróxido, los resultados con lacasa *Myceliophthora thermophila* siguen siendo mejores que los de lacasa *Pycnoporus cinnabarinus*, con metilsiringato como mediador se obtiene una degradación del 40 % para los esteroides libre y del 91% para los ésteres de esteroides; y con siringadehído como mediador se obtiene una degradación del 76% para los esteroides libres y del 96% para los ésteres de esteroides.

## 2. Lipoxigenasa de *Gaeumannomyces graminis*

### ▪ Tratamientos de pasta

Se han realizado los ensayos con 1 ó 2 de pasta de eucalipto seca, al 1% consistencia (peso/peso) en tampón dihidrogenofosfato sódico 100 mM. Se han ido variando las dosis de lipoxigenasas del hongo *Gaeumannomyces graminis* y las condiciones de reacción para optimizar el proceso. El pH se ha probado a 7, 9 y 10; la dosis de enzima 10 mg lipoxigenasa/g de pasta y 20 mg de lipoxigenasa/g de pasta (conociendo que la densidad es 8,7 mg/ml); la temperatura a 30 y 50°C; la velocidad de agitación 170 y 200 rpm; se ha probado a realizar el experimento con y sin burbujeo de oxígeno en los matraces de reacción; y a 4 y 8 horas. También se ha utilizado otro tampón formado por ácido fosfórico, ácido acético y ácido bórico, para ajustar el pH hasta valores alcalinos.

Los tratamientos se realizaron en matraces de 1l, en un baño térmico de agitación. En algunos de los experimentos, después del tratamiento con lipoxigenasas, las pastas al 5% de consistencia, se sometieron a una etapa de blanqueo con peróxido, usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (peso/peso) y NaOH 1,5% (peso/peso), ambos referidos al peso de la pasta seca, a 90°C durante 2 horas. Se realiza en unas bolsitas selladas de plástico termorresistente.

Los controles para la evaluación de la acción de la enzima lipoxigenasa de *Gaeumannomyces graminis*, se trataron bajo las mismas condiciones pero sin enzima.

Los mejores resultados para el blanqueo y la eliminación de lípidos se obtuvieron a pH 7, 180 rpm, con burbujeo de oxígeno, a una temperatura de 30°C, durante 4 horas de tratamiento y con una dosis de enzima de 20 mg de lipoxigenasa/g de pasta.

### Variación en los parámetros de blanqueo y deslignificación de la pasta

Los parámetros de blanqueo y deslignificación para los tratamientos de la pasta kraft de eucalipto se muestran en la **Tabla 25**. Los mejores resultados de blanqueo se consiguen con el tratamiento de lipoxigenasa junto con ácido linoleico, seguido de una



## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fase posterior de peróxido, se consigue disminuir el índice Kappa 1,2 puntos y aumentar la blancura % ISO en 3,4 puntos.

**Tabla 25.** Parámetros de blanqueo y deslignificación para los tratamientos de pasta kraft de eucalipto con lipoxigenasa. P, fase posterior de peróxido

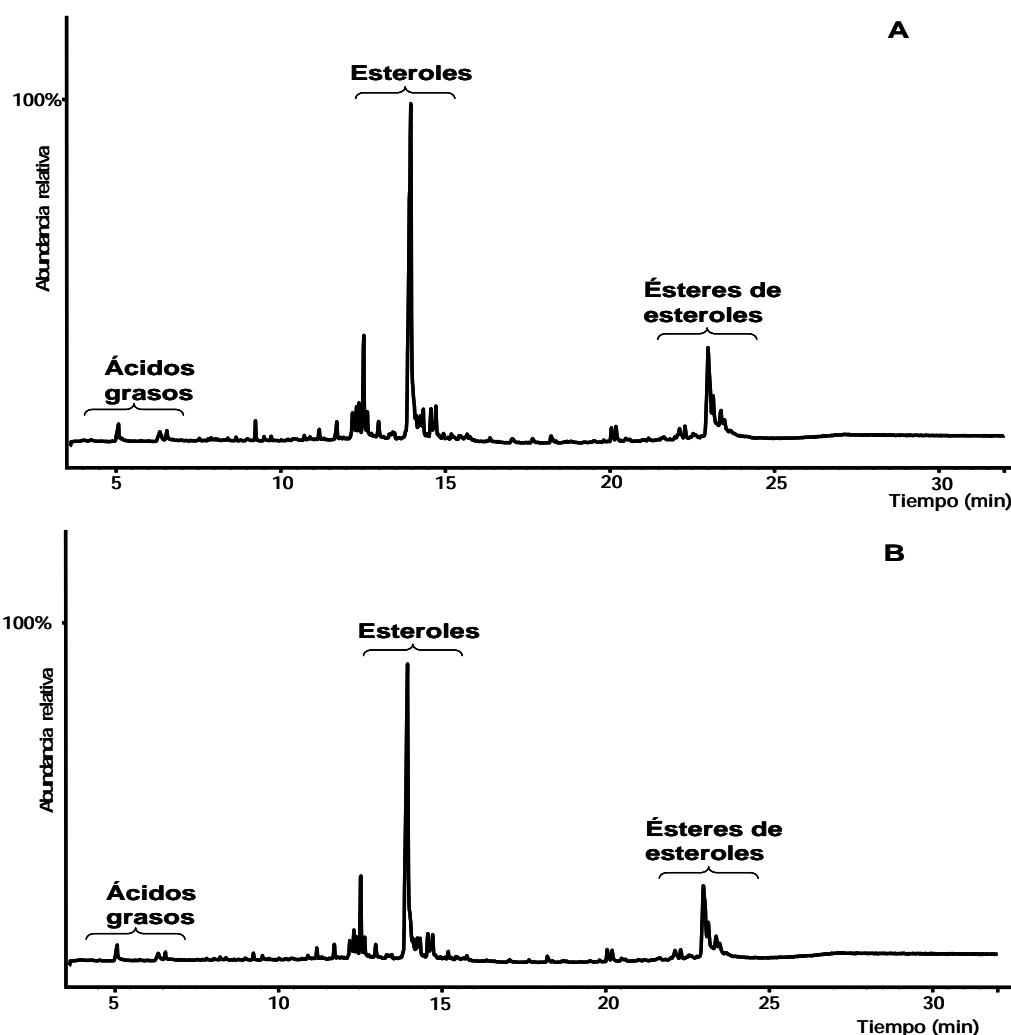
		<b>Índice Kappa</b>	<b>Viscosidad, mL/g</b>	<b>Blancura, % ISO</b>
Control 4 h	inicial	13,5	1140	44,0
	<b>P</b>	10,7	925	55,9
Lipoxigenasa 4 h	inicial	12,8	1148	43,8
	<b>P</b>	9,5	800	58,5
Lipoxigenasa + ácido linoleico 4 h	inicial	12,9	1143	43,9
	<b>P</b>	9,5	767	59,3

### Eliminación de los extractos lipofílicos de la pasta

En los tratamientos de pasta kraft de eucalipto con lipoxigenasa a pH 7, los mejores resultados para la degradación de los extractos lipofílicos que se obtuvieron fueron una disminución entre el 20% y 30% de los ésteres de esteroides antes de aplicar la fase de peróxido, en ausencia y presencia de ácido linoleico respectivamente; y una disminución entre 27% y 40% para los ésteres de esteroides después de aplicar la fase de peróxido, en ausencia y presencia de ácido linoleico.

En cuanto a los esteroides libres, se observa una degradación en torno al 7%, cuando se realiza el tratamiento con lipoxigenasa en presencia de ácido linoleico después de aplicar la fase de peróxido. Los porcentajes de degradación se calcularon a partir de las áreas de los cromatogramas de los extractos lipofílicos de las pastas kraft de eucalipto tratadas (**Fig. 34**).

Cuando los tratamientos se realizan a pH 9, los resultados para la degradación de los ésteres de esteroides después de aplicar la fase de peróxido, son los mismos que los que se obtienen con los tratamientos realizados a pH 7. Sin embargo para los esteroides libres, la degradación que se obtiene es del 28% cuando se realiza el tratamiento con lipoxigenasa sin ácido linoleico y aplicando la fase de peróxido, y una degradación de 33% cuando se realiza el tratamiento con lipoxigenasa y ácido linoleico, aplicando una etapa posterior de peróxido.



**Fig. 34.** Cromatogramas de los tratamientos de pasta kraft de eucalipto con lipoxigenasa a pH 7. **A:** pasta control con fase de peróxido; **B:** Pasta tratada con lipoxigenasa y ácido linoleico, aplicando una fase posterior de peróxido.

### Discusión

Este es el primer estudio que se realiza con lipoxigenasa para la deslignificación y la eliminación de lípidos de las pastas. El uso del tratamiento con lipoxigenasa *Gaeumannomyces graminis* mejora los parámetros de blanqueo y deslignificación de la pasta kraft de eucalipto. Los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento con lipoxigenasa en presencia de ácido linoleico, aplicando una fase posterior de peróxido, en el que el índice Kappa disminuye 1,2 puntos y la blancura %ISO aumenta 3,4 puntos. Estas mejoras en los parámetros no llegan a igualar a las que se producen en los tratamientos con el sistema lacasa-mediador.

Se ha demostrado que el tratamiento con lipoxigenasa a pH 7 en pasta kraft de eucalipto degrada parte de los ésteres de esteroides del extracto lipofílico de la pasta, sobre todo cuando se realiza el tratamiento con lipoxigenasa y ácido linoleico, aplicando una fase posterior de peróxido (40%), sin embargo a este pH, no se degradan los esteroides libres (sólo un 7%), que son lípidos que se encuentran en gran cantidad en el extracto lipofílico de esta pasta, y que son responsables de la formación de los depósitos de “pitch”.

En los tratamientos con lipoxigenasa a pH 9, se consigue aumentar la degradación de los esteroides libres, la degradación que se obtiene es del 28% cuando se realiza el

tratamiento con lipoxigenasa sin ácido linoleico y aplicando la fase de peróxido, y una degradación de 33% cuando se realiza el tratamiento con lipoxigenasa y ácido linoleico, aplicando una etapa posterior de peróxido.

El tratamiento de la pasta kraft de eucalipto con lipoxigenasa, consigue eliminar parte de los lípidos, sin embargo los tratamientos con lacasa y mediadores sintéticos como HBT, o con lacasa y mediadores naturales, siguen siendo más eficaces en la eliminación de los lípidos responsables de la formación de los depósitos de pitch en las pastas kraft de eucalipto.

#### ▪ **Reacciones con compuestos modelo**

Para estudiar con más detalle las degradaciones producidas en los lípidos de las pastas por lipoxigenasas, se realizaron reacciones con lipoxigenasa en compuestos modelos representativos de cada uno de los grandes grupos de lípidos que forman el extracto lipofílico de la pasta kraft de eucalipto. Se realizaron tratamientos con lipoxigenasas en ácido linoleico, sitosterol y colesteril linoleato de forma aislada. Posteriormente para comprobar la influencia que tiene la presencia de otros lípidos en la degradación con lipoxigenasa, se realizaron tratamientos en mezclas de compuestos lipofílicos modelo: ácido linoleico y sitosterol; ácido linoleico y colesteril linoleato; y mezcla de los tres lípidos modelos. Los porcentajes de degradación que se obtuvieron en los experimentos de degradación de los lípidos modelo de forma aislada y en mezclas, se muestran en la **Tabla 26**.

**Tabla 26.** Porcentajes de degradación obtenidos con el tratamiento con lipoxigenasa de los lípidos modelo aislados, formando mezclas de dos y la mezcla de los tres. Los porcentajes de degradación se han calculado a partir de los análisis de GC.

	<b>% Degradación con el tratamiento con lipoxigenasa 2 horas</b>					
<b>Ácido linoleico</b>	100	-	-	100	100	100
<b>Sitosterol</b>	-	0	-	41	-	25
<b>Colesteril linoleato</b>	-	-	20	-	60	83

#### Discusión

Con estos experimentos se comprobó que el tratamiento con lipoxigenasa degrada en su totalidad al patrón de ácido linoleico, degrada un 20% al colesteril linoleato y no produce ningún efecto sobre el sitosterol. Se intentó comprobar si la degradación del sitosterol y del colesteril linoleato podría estar favorecida por la presencia de otros lípidos, y por ello se realizaron experimentos con mezclas de compuestos lipofílicos modelo. La presencia de ácido linoleico hace que el sitosterol tenga una degradación del 41%, cuando de forma aislada no se producía ninguna degradación. El colesteril linoleato aumenta su degradación desde 20% que tenía en las reacciones de tratamiento que se realizan sobre el compuesto de forma aislada, hasta un porcentaje de 60% cuando la reacción se realiza en una mezcla formada por ácido linoleico y colesteril linoleato. En la mezcla de los tres lípidos modelos también aumenta la degradación de sitosterol y colesteril linoleato. Es clara la influencia de la presencia de otros lípidos en la degradación de un compuesto lipofílico determinado, podría pensarse que algo similar ocurre en el extracto lipofílico de las pastas, cuando el tratamiento con lipoxigenasa degrada compuestos que de forma aislada no se degradan con dicho tratamiento, o que lo hacen de forma débil.

## **VI. CONCLUSIONES**

## VI. CONCLUSIONES.

Las principales conclusiones que se han alcanzado durante este trabajo, son las que se muestran a continuación:

1. La lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* en presencia del mediador 1-hidroxibenzotriazol (HBT), puede eliminar eficazmente la mayor parte de los lípidos presentes en pastas de papel de distintos orígenes.
2. Estudiando las reacciones de lacasa de *Pycnopus cinnabarinus* con lípidos modelo, se ha demostrado que los tratamientos con lacasa sola pueden modificar algunos lípidos insaturados, tales como los ácidos linoleico, oleico y abiético, colesteril oleato, colesteril linoleato y trilinoleína; pero no actúan sobre el sitosterol y el colesteril palmitato.
3. Se ha demostrado que el sistema lacasa de *Pycnopus cinnabarinus*-HBT es capaz de oxidar, en mayor grado que los tratamientos sólo con lacasa, a varios tipos de lípidos insaturados tales como el ácido linoleico, oleico y abiético, sitosterol, colesteril palmitato, colesteril oleato, colesteril linoleato y trilinoleína; y se han identificado los productos de reacción de la mayoría de ellos. Algunos compuestos saturados (octadecano, 1-hexadecanol, ácido palmítico y triheptadecanoína) no muestran reactividad con el sistema lacasa de *Pycnopus cinnabarinus*-HBT, en las condiciones ensayadas. Pero algunos de estos compuestos pueden ser degradados en presencia de otros lípidos insaturados. Estos resultados ayudan a la comprensión de los datos obtenidos con el tratamiento lacasa-HBT en las pastas, donde estos lípidos saturados sí se degradan.
4. Se ha comprobado la eficacia de otro mediador sintético como es el ácido violúrico, que como el HBT también tiene un grupo  $-NOH$  en su estructura. El tratamiento de la pasta kraft de eucalipto con lacasa *Pycnopus cinnabarinus* y ácido violúrico, mejora de forma notable los parámetros de blancura y deslignificación, pero el resultado es mucho más espectacular cuando tras el tratamiento enzimático se aplica una fase de peróxido. En cuanto a la eliminación de los compuestos lipofílicos de la pasta, el tratamiento lacasa-ácido violúrico degrada mayoritariamente los ésteres de esteroides, pero no degrada a los esteroides libres. Sin embargo cuando tras el tratamiento con lacasa y ácido violúrico se aplica una fase de peróxido, se degradan los esteroides libres aunque no en su totalidad, y aumenta la degradación de los ésteres de esteroides. Estos estudios realizados en la pasta se han corroborado en reacciones con lípidos modelo.
5. El tratamiento de la pasta kraft de eucalipto con lacasa *Pycnopus cinnabarinus* en presencia de siringaldehído o acetosiringona como mediadores, disminuye eficazmente el contenido de esteroides libres (91% y 59%, respectivamente), de ésteres de esteroides (92% y 52%, respectivamente) y de esteril glicósidos (95% y 56%, respectivamente). Estos datos muestran que el mediador natural siringaldehído produce una disminución en el extracto lipofílico similar a la que se obtiene con el mediador sintético HBT, pero es necesario aplicar una fase de peróxido posterior al tratamiento enzimático. La mejora de las propiedades de

## VI. CONCLUSIONES

blanqueo y deslignificación de la pasta tratada con lacasa y siringaldehído o acetosiringona, es menor que la que se consigue usando el HBT como mediador, pero los resultados confirman la capacidad de estos mediadores naturales para deslignificar y blanquear la pasta kraft de eucalipto. Por tanto se podría concluir con la idea de que algunos compuestos fenólicos derivados de la lignina pueden usarse eficazmente como mediadores rédox alternativos a los mediadores sintéticos, en los tratamientos enzimáticos de las pastas con lacasas.

6. En reacciones con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* en presencia de siringaldehído con compuestos modelo, se observó que el sitosterol de forma aislada no se degrada cuando se aplicaba un tratamiento con lacasa-siringaldehído seguido de una etapa de peróxido, pero sí se degrada cuando se realiza el tratamiento en presencia de otros lípidos insaturados como ácido linoleico y colesteril linoleato, lo que apoya el hecho de que sí se degradase en los tratamientos de las pastas.
7. En el estudio de los mediadores naturales 4-hidroxibenzaldehído y ácido 4-hidroxibenzoico, se comprobó que los tratamientos con lacasa *Pycnoporus cinnabarinus* y estos mediadores, aplicando una fase posterior de peróxido, se conseguía degradar en un pequeño porcentaje al sitosterol, hecho que no se había conseguido usando siringaldehído como mediador. Se comprueba que la presencia de otros lípidos modelo insaturados, favorece la degradación del sitosterol usando lacasa y estos mediadores naturales.
8. Se ha demostrado por primera vez, que una lacasa de bajo potencial rédox, la lacasa de *Myceliophthora thermophila*, en presencia de mediadores tales como siringaldehído y metilsiringato, es capaz de mejorar los parámetros de blanqueo y deslignificación y degradar los extractos lipofílicos de las pastas.
9. En el proceso de blanqueo, el mediador sintético HBT sigue siendo más eficaz que los mediadores naturales, aunque sólo actúa como mediador con lacasas de alto potencial rédox, como la de *Pycnoporus cinnabarinus*. Los porcentajes de degradación de los distintos lípidos en las pastas, tras los tratamientos con lacasa (de los dos tipos) y mediadores naturales, con una etapa posterior de peróxido, son similares a los obtenidos en los tratamientos con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* y HBT.
10. En los tratamientos de la pasta kraft de eucalipto con lipoxigenasa de *Gaeumannomyces graminis* junto con ácido linoleico, seguido con una fase de peróxido, se consiguen mejorar los parámetros de blancura y deslignificación de la pasta, así como degradar parte de los extractos lipofílicos, pero no de forma tan eficaz como con los tratamientos con lacasa y mediadores tanto naturales como sintéticos. Estos estudios realizados en la pasta se han corroborado en reacciones con lípidos modelo.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adler, E. (1977)** Lignin chemistry - Past, present and future. *Wood Sci. Technol.* 11: 169-218.
- Allen, L.H. (2000)** Pitch control in paper mills. En: Pitch control, wood resin and deresination (Eds.: Back, E.L. y Allen, L.H.), TAPPI Press, Atlanta, pp. 307-328.
- Ammalahti, E., Brunow, G., Bardet, M., Robert, D. Y Dilpeläinen, I. (1998)** Identification of side-chain structures in a poplar lignin using three-dimensional HMQC-HOHAHA NMR spectroscopy. *J. Agr. Food Chem.* 46, 5113-5117.
- Back, E.L. y Allen, L.H. (2000)** Pitch Control, Wood Resin and Deresination. Tappi Press, Atlanta, GA.
- Banci, L., Camarero, S., Martínez, A.T., Martínez, M.J., Pérez-Boada, M., Pierattelli, R. y Ruiz-Dueñas, F.J. (2003)** NMR study of Mn(II) binding by the new versatile prooxidase from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii*. *J. iol. Inorg Chem.* 8: 751-760.
- Behrendt C.J. y Blanchette R.A. (1997)** Biological processing of pine logs for pulp and paper production with *Phlebiopsis gigantea*. *Appl Environ Microbiol* 63:1995–2000.
- Bidlack, J., Malonge, M. y Benson, R. (1992)** Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proc. Okla. Acad. Sci.* 72: 51-56.
- Bjorkling, F., Godtfredsen, S.E. y Kirk, O. (1991)** The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.* 9, 360-363.
- Blanchette, R. A., Iverson, S. y Behrendt, C. J. (1998)** Pitch and lignin degradation with white-rot fungi. Patent (USA) No. US 5,705,383.
- Blanchette, R.A., Leatham, G.F., Attridge, M., Akhatar, M. y Myers, G.C. (1990)** Biomechanical pulping with *C. subvermispora*. Patent (International) 5,055,159.
- Boerjan, W., Ralph, J. y Baucher, M. (2003)** Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 519-546.
- Bourbonnais R. y Paice M.G. (1990)** Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett* 267:99–102.
- Brown, A.J., Dean, R.T. y Jessup, W. (1996)** Free and esterified oxysterol: formation during copper-oxidation of low density lipoprotein and uptake by macrophages. *J.Lipid Res* 37: 320-337.
- Brush, T.S., Chapman, R., Kurzman, R., Williams, D.P. (1999)** Purification and characterization of extracellular lipases from *Ophiostoma piliferum*. *Bioorgan. Med.Chem.* 7, 2131-2138.



**Brush, T., Farrell, R. L. y Ho, C. (1994)** Biodegradation of wood extractives from Southern and Yellow pine by *Ophiostoma piliferum*. *Tappi J.* 77 : 155-159.

**Buchert, J., Mustranta, A., Tamminen, T., Spetz, P., Holmbom, B. (2002)** Modification of spruce lignans with *Trametes hirsuta* laccase. *Holzforschung* 56 (6), pp. 579-584

**Buchert, J., Spetz, P., Mustranta, A., Ekman, R. y Holmbom, B. (1999)** Enzymatic control of pitch during mechanical pulping. Proc. 27th EUCEPA conference. Grenoble-France, 11-14 Oct. (1999)191-194.

**Bunzel, M., Ralph, J., Marita, J. M., Hatfield, R. D. y Steinhart, H. (2001)** Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *J. Sci.Food Agr.* 81, 653-660.

**Call H.P. y Mücke I. (1997)** History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase–mediator-systems (Lignozym(R)-process). *J Biotechnol* 53:163–202.

**Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2005)** Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1775-1784.

**Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, A.T., Romero, J., Gutiérrez, A. y del Río, J.C. (2007)** Paper pulp deslignification using laccase and natural mediators. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1264-1271.

**Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1999)** Description of a versatile peroxidase involved in natural degradation of lignin that has both Mn-peroxidase and lignin-peroxidase substrate binding sites. *J. Biol. Chem.* 274: 10324-10330.

**Chen, T.Z.Y. (1994)** Wood extractives and pitch problems: analysis and partial removal by biological treatment. Abs. 48<sup>th</sup> Appita Annu. Gen. Confer. Melbourne.

**Crawford, R.L. (1981)** Lignin biodegradation and transformation. *Wiley Interscience*, New York.

**Cullen, D. y Kersten, P.J. (2004)** Enzymology and molecular biology of lignin degradation. En: *Mycota.III: Biochemistry and Molecular Biology*. Anonymouspp. 249-273.

**del Río, J.C., Gutiérrez, A., González-Vila, F.J., Martín, F. y Romero, J. (1998)** Characterization of organic deposits produced in the kraft pulping of *Eucalyptus globulus* wood. *J. Chromatogr. A* 823:457–465.

**del Río, J.C., Gutiérrez, A. y Martínez, A.T. (2004)** Identifying acetylated lignin units in non-wood fibers using pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Rapad Commun. Mass Spectrom.* 18: 1181-1185.

**Dorado, J., Claassen, F.W., Van Beek, T.A., Lenon, G., Wijnberg, J.B.P.A., Sierra-Alvarez, R. (2000)** Elimination and detoxification of softwood extractives by white-rot fungi. *J. Biotechnol.* 80, 231-240.

**Ekman, R. (2000)** Resin during storage and its biological treatment. In *Pitch Control, Wood Resin and Deresination* (Back, E.L. y Allen, L.H., eds), pp. 185-204, Tappi Press.

**Encinas, O., Henningsson, B. y Daniel, G. (1988)** Changes in toughness and fracture characteristics of wood attacked by the blue stain fungus *Lasiodiplodia theobromae*. *Holzforschung* Vol 52 (1), 1998, 82-88.

**Eriksson, K-EL., Blanchette, R.A., Ander, P. (1990)** Microbial and enzymatic degradation of wood components. Springer-Verlag, Berlin.

**Evershed, R.P., M.C. Prescott, N. Spooner y L.J. Goad. (1989)** Negative ion ammonia chemical ionization and electron impact ionization mass spectrometric analysis of steryl fatty acyl esters. *Steroids* 53, 285–309.

**Farrell, R. L., Blanchette, R. A., Brush, T. S., Hadar, Y., Iverson, S., Krisa, K., Wender, P. A. and Zimmerman, W. (1993)** Cartapip TM: A Biopulping Product for Control of Pitch and Resin Acid Problems in Pulp Mills. *J. Biotechnol.* 30: 115-122.

**Farrell, R.L., Hadar, Y., Wendler, P. A. y Zimmerman, W. (1992)** New fungi for pitch reduction, their preparation and use. Patent (European) No. EP0470929

**Farrell, R.L., Hadar, Y., Wendler, P. A. y Zimmerman, W. (1995)** Composition containing strains of *Ophiostoma piliferum* and a method of using the composition to reduce the pitch content of pulpwood or pulp. Patent (USA) No. 5,476,789.

**Fengel, D. y Wegener, G. (1984)** Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. De Gruyter, Berlin.

**Fischer, K. y Messner, K. (1992)** Reducing troublesome pitch in pulp mills by lipolytic enzymes. *Tappi J* 75:130–135.

**Fischer, K., Puchinger, L. y Schloffer, K. (1993)** Enzymatic pitch control of sulfite pulp on pilot scale. *J Biotechnol* 27:341–348.

**Fleet, C. y Breuil, C. (1998)** High concentrations of fatty acids affect the lipase treatment of softwood thermomechanical pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 517-522.

**Frankel, E.N. (2005)** Lipid oxidation, second edn. The Oil Press, Bridgewater.

**Fujita Y., Awaji H., Taneda H., Matsukura M., Hata K., Shimoto H., Sharyo M., Sakaguchi H. y Gibson K. (1992)** Recent advances in enzymic pitch control. *Tappi J* 75:117–122.

**Galkin, S., Ammalahti, E., Kilpeläinen, I., Brunow, G. y Hatakka, A. (1997)** Characterization of milled wood lignin from reed canary grass (*Phalaris arundinacea*). *Holzforschung* 51, 130-134.

**Gandarias, J.M., Lacort, M., Martínez, M.J., Fernández, C.J., Ochoa, B. (1987)** Kinetic properties and solubilization of microsomal cholesterol ester hydrolase from rat liver. *Steroids*. 49, 403-417.

**Gao, Y. y Breuil, C. (1998)** Properties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from *Ophiostoma piceae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 421-429.

**Gold, M.H., Youngs, H.L. y Gelpke, M.D. (2000)** Manganese peroxidase. *Met. Ions Biol. Syst.* 37: 559-586.

**Goodell, B., Nicholas, D.D. y Schultz, T.P. (2006)** Wood deterioration and preservation. *Advances in our changing world.* ACS, Washington.

**Grabber, J. H., Ralph, J. y Hatfield, R.D. (2000)** Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. *J. Agr. Food Chem.* 48, 6106-6113.

**Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1992)** Aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*: substrate specificity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing system. En: *Biotechnology in pulp and paper industry.* (Eds.: Kuwahara, M. y Shimada, M.), UNI Pub. Co., Ltd., Tokyo, pp.371-376.

**Guillén, F., Martínez M.J., Muñoz, C. y Martínez, A.T. (1997)** Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 339: 190-199.

**Gutiérrez, A., Bocchini, P., Galletti, G.C. y Martínez, A.T. (1996)** Analysis of lignin-polysaccharide complexes formed during grass lignin degradation by cultures of *Pleurotus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (6):1928-1934.

**Gutiérrez, A. y del Río, J.C. (2001)** Gas chromatography/mass spectrometry demonstration of sterol glycosides in eucalypt wood, Kraft pulp and process liquids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15:2515–2520.

**Gutiérrez, A., del Río, J.C., González-Vila, F.J. y Martín, F. (1998b)** Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 823:449–455.

**Gutiérrez, A., del Río, J.C., González-Vila, F.J. y Martín, F. (1999a)** Chemical composition of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. wood. *Holzforschung* 53:481–486

**Gutiérrez, A., del Río, J.C., González-Vila, F.J. y Romero, J. (1998a)** Variation in the composition of wood extractives from *Eucalyptus globulus* during seasoning. *J. Wood Chem. Technol.* 18:439–446.

- Gutiérrez, A., del Río, J.C., Ibarra, D., Rencoret, J., Romero, J., Speranza, M., Camarero, S., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2006b)** Enzymatic removal of free and conjugated sterols forming pitch deposits in environmentally sound bleaching of eucalypt paper pulp. *Environ. Sci. Technol.* 40: 3416-3422.
- Gutiérrez, A., del Río, J.C. y Martínez, A.T. (2004)** Chemical analysis and biological removal of wood lipids forming pitch deposits in paper pulp manufacturing. In *Methods in Biotechnology: Environmental Microbiology; Methods and Protocols*; pp 189-202.
- Gutiérrez, A., Del Río, J.C., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1999)** Fungal degradation of lipophilic extractive in *Eucalyptus globulus* wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1367-1371.
- Gutiérrez, A., del Río, J.C., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2001c)** Biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. *Trends Biotechnol.* 19:340-348.
- Gutiérrez, A., del Río, J.C., Rencoret, J., Ibarra, D. y Martínez, A.T. (2006a)** Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase mediator system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72: 845-851.
- Gutiérrez, A., Martínez M.J., del Río, J.C., Romero, J., Canaval, J., Lenon, G. y Martínez A.T. (2000)** Fungal pretreatment of *Eucalyptus* wood can strongly decrease the amount of lipophilic extractives during chlorine-free kraft pulping. *Environ. Sci. Technol.* 34: 3705-3709.
- Hamberg, M., Samuelsson, B. (1967)** On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxidase. *Journal of Biological Chemistry* 242 (22), pp. 5329-5335.
- Hammel, K.E. (1997)** Fungal degradation of lignin. En: *Plant litter quality and decomposition*. (Eds.: Cadisch, G. y Giller, K.E.), CAB International, London, pp.33-45.
- Hata, K., Matsukura, M., Taneda, H., Fujita, Y. (1996)** Mill-scale application of enzymatic pitch control during paper production. In *Enzymes for Pulp and Paper processing*. (Viikari, L. y Jeffries, T.W., eds), pp. 280-296, ACS.
- Hattakka, A. (2001)** Biodegradation of lignin. En: *Biopolymers. Biology, Biotechnology, Applications*. Vol.1. Lignin, Humic substances and coal. (Eds.: Hofrichter, M. y Steinbüchel, A.), Wiley-VCH, Weinheim, 129-180.
- Heinfling, A., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Bergbauer, M., Szewzyk, U., Martínez, A.T. (1998)** A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Letters* 428 (3), pp. 141-146.
- Herpoël, I., Moukha, S., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J.C. y Asther, M. (2000)** Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. *FEMS Microbiol. Lett.* 183: 301-306.

**Higuchi, T. (1997)** Biochemistry and molecular biology of wood. Springer Verlag, London.

**Higuchi, T. (2004)** Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. Proc. Jpn. Acad. B 80, 204-214.

**Hillis, W.E. (1962)** Wood extractives. Academic press, London.

**Hillis, W.E. y Sumimoto, M. (1989)** Effect of extractives on pulping. In: Natural Products of Woody Plants II; Ed. Rowe, J.W. Springer-Verlag, Berlin. pp. 880-920.

**Ibarra, D., Camarero, S., Romero, J., Martínez, M.J. y Martínez, A. (2006)** Integrating laccase-mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine free bleaching eucalypt kraft pulp. J. Chem. Technol. Biotechnol. 81: 1159-1165.

**Irie, Y. (1990)** Enzymatic pitch control in papermaking system. Abs. 1990 Papermakers Confer., 23-25 April, Atlanta.

**Ismail, F., Mulholland, D.A., Marsh, J.J. (2005)** An analysis of the water soluble components of Sappi Saiccor's effluent streams. Water SA 31, 569-574.

**Jensen, K.A. Jr., Bao, W., Kawai, S., Srebotnik, E. y Hammel, K.E. (1996)** Manganese-dependent cleavage of non-phenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3679-3686.

**Johannes, C., Majcherczyk, A. (2000)** Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. Appl. Environ. Microbiol. 66, 524-528.

**Käärik, A. (1965)** The identification of the mycelia of wood-decay fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds. Stud. For. Suec. 31: 3-81.

**Kaiser, R., Erman, M., Duax, W.L., Ghosh, D. y Jornvall, H. (1994)** Monomeric and dimeric forms of cholesterol esterase from *Candida cylindracea*. Primary structure, identity in peptide patterns, and additional microheterogeneity. FEBS Lett. 337, 123-127.

**Kamido, H., Kuksis, A., Marai, L. y Myher, J.J. (1995)** Lipid ester-bound aldehydes among copper-catalyzed peroxidation products of human plasma lipoproteins. J. Lipid Res 36: 1876-1887.

**Karhunen, P., Rummakko, P., Sipila, J., Brunow, G. y Kilpeläinen, I. (1995)** The formation of dibenzodioxocin structures by oxidative coupling. A model reaction for lignin biosynthesis. Tetrahedron Lett. 36, 4501-4504.

- Karlsson, S., Holmbom, B., Spetz, P., Mustranta, A. y Buchert, J. (2001)** Reactivity of *Trametes* laccases with fatty and resin acids. *Appl. Microbiol. Biothechnol.* 55, 317-320.
- Kersten, P.J. y Kirk, T.K. (1987)** Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 169: 2195-2201.
- Kirk, T.K. y Cullen, D. (1998)** Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. (Eds.: Young, R.A. y Akhtar, M.), TAPPI Press, Atlanta, pp. 273-308.
- Kirk, T.K. y Farrell, R.L. (1987)** Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41, pp. 465-505.
- Lam, T.B.T., Iiyama, K. y Stone, B. A. (1992)** Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and *Phalaris* internodes. *Phytochemistry* 31, 1179-1183.
- Leach, J.M. y Thakore, A.N. (1976)** Toxic constituents in mechanical pulping effluents. *TAPPI* 59: 129-132.
- Leone, R. y Breuil, C. (1998)** Filamentous fungi can degrade aspen steryl esters and waxes. *Int. Biodeter. Biodegr.* 41,133-137
- Leonowicz, A., Grzywnowicz, K. y Malinowska, M. (1979)** Oxidative and demethylating activity of multiple forms of laccase from *Pholiota mutabilis*. *Acta Biochimica Polonica* 26 (4), pp. 431-434.
- Leonowicz, A., Szklarz, G. y Wojtaś-Wasilewska, M. (1985)** The effect of fungal laccase on fractionated lignosulphonates (peritan Na). *Phytochemistry* 24 (3), pp. 393-396.
- Liss, S.N., Bicho, P.A. y Saddler, J.N. (1997)** Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview. *Can. J. Microbiol.* 43: 599-611.
- Lu, F.C. y Ralph, J. (2002)** Preliminary evidence for sinapyl acetate as a lignin monomer in kenaf. *Chem. Commun.*, 90-91.
- Lusby, W.R., Thompson, M.J. y Kochansky, J. (1984)** Analysis of sterol esters by capillary gas chromatography electron impact and chemical ionization-mass spectrometry. *Lipids* 19 (11), 888-901.
- Madhosingh, C. y Orr, W. (1981)** Sterol ester hydrolase in *Fusarium oxysporum*. *Lipids* 16, 125-132.
- Martínez, A.T. (2002)** Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 425-444.

**Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez M.J., Gutiérrez, A., del Río, J.C. (2005)** Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungi attack of lignin. *Int. Microbiology* 8, 195-204.

**Martínez, M.J., Barrasa, J.M., Gutiérrez, A., del Río, J.C. y Martínez A.T. (1999)** Fungal screening for biological removal of extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. *Wood. Can. J. Bot.* 77: 1513-1522.

**Martínez, M.J., Ruiz-Dueñas, F.J., Guillén, F. y Martínez, A.T.(1996)** Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur.J.Biochem.* 237: 424-432.

**Martínez-Iñigo, M.J., Claassen, F.W., Joseleau, B., Van Beek, T.A., Lenon, G. y Sierra-Alvarez, R. (2000)** Evaluation of fungal capacity for detoxification of extractive in Scots pine sapwood. *Environ. Technol.* 21, 569-575.

**Martínez-Iñigo, M.J., Gutiérrez, A., Del Río, J.C., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000)** Time course of fungal removal of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* wood Labill. *Wood. J.Biotechnol.* 84, 119-126.

**Martínez-Iñigo, M.J., Immerzeel, P., Gutierrez, A., Del Río, J.C., Sierra-Alvarez, R. (1999)** Biodegradability of extractives in sapwood and heartwood from Scots pine by sapstain and white-rot fungi. *Holzforschung* 53, 247-252.

**Martínez-Iñigo, M.J., Tan, A. y Sierra-Alvarez, R. (1997)** Screening of lipase-producing fungal strains useful for pitch control. *Abs. Intern. Symp. Environ. Biotechnol.* 21-24 Abril, Oostende.

**Mayer, A.M. y Staples, R.C. (2002)** Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60 (6), pp. 551-565.

**Messner, K. (1998)** Biopulping. In *Forest Products Biotechnology* (Bruce, A. y Palfreyman, J.W., eds), pp. 63-82, Taylor & Francis.

**Messner, K. y Srebotnik, E. (1994)** Biopulping- An overview of developments in an environmentally safe paper-making technology. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 351-364.

**Morrison, W.H. III., Akin, D.E., Himmelsbach, D.S. y Gamble, G.R. (1999b)** Chemical, microscopic, and instrumental analysis of graded flax fibre and yarn. *J. Sci. Food Agric.* 79, 3-10.

**Mustranta, A., Fagernas, L. y Viikari, L. (1995)** Effects of lipases on birch extractive. *Tappi J.* 78, 140-144.

**Neto, C.P., Seca, A.M.L., Fradinho, D., Coimbra, M.A., Domingues, F.M.J., Evtuguin, D., Silvestre, A.J.D. y Cavaleiro, J.A.S. (1996)** Chemical composition and

structural features of macromolecular components of *Hibiscus cannabinus* grown in Portugal. Ind.Crops Prod. 5, 189-196.

**Nilsson, T y Asserson, A. (1966)** Patent (USA) No. 3486.

**Nimz, H. (1974)** Beech lignin- Proposal of a constitutional scheme. Angew. Chem. Int. Edit. 13: 313-321.

**Okawa, Y. y Yamaguchi, T. (1997)** Studies on sterol-ester hydrolase from *Fusarium oxysporum*. I.Partial purification and properties. J. Biochem. (Tokyo) 81, 1209-1215.

**O'Malley, D.M., Whetten, R., Bao, W., Chen, C.-L. y Sederoff, R.R. (1993)** The role of laccase in lignification. Plant Journal 4 (5), pp. 751-757.

**Örså, F. y Holmbom, B. (1994)** A convenient method for the determination of wood extractives in papermaking process waters and effluents. J. Pulp Paper Sci. 20(12), J361-J366.

**Otjen, L. y Blanchette, R.A. (1986)** A discussion of microstructural changes in wood during decomposition by white rot basidiomycetes. Can J. Bot 64, 905-911.

**Paice, M.G., Bourbonnais, R., Reid, I.D., Archibald, F.S. y Jurasek, L. (1995).** Oxidative bleaching enzymes: a review. Journal of Pulp and Paper Science 21 (8), pp. J280-J284.

**Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, R.T., Martínez, J. (2002)** Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. Int. Microbiol 5, 53-63.

**Pérez-Boada, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martínez, M.J., Piontek, K. y Martínez, A.T. (2005).** Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: Site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigations of three long-range electron transfer pathways. J.Mol.Biol. 345: 385-402.

**Pogni, R., Baraatto, M.C., Teutloff, C., Giansanti, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Choinowski, T., Piontek, K., Martínez, A.T., Lenzian, F. y Basosi, R. (2006).** A tryptophan neutral radical in the oxidized state of versatile peroxidase from *Pleurotus eryngii*: a combined multi frequency EPR and DFT study. J.Biol. Chem. Available on-line: M510424200.

**Quin, M.H. y Chen, J-X. (1997)** Biological pitch control of masson pine groundwood pulp by lipases. Proc. TAPPI Biol. Sci. Symp. San Francisco, 19-23 Octubre, 369.

**Rahim, M.A. y Sih, C.J. (1969)** Microbial steroid esterases. Methods Enzymol. 15, 675-684.

**Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. (2004)** Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus*



species: The role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biology and Biochemistry* 36 (6), pp. 909-916.

**Rowe, J. W. (1989)** Natural Products of Woody Plants II. Springer-Verlag, Berlin.

**Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1999)** Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol. Microbiol.* 31: 223-236.

**Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J., Guittet, E. y Rolando, C. (1985)** Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* 24, 1359-1362.

**Schwarze, FWMR., Engels, J. y Mattheck, C. (2000)** Fungal strategies of decay in trees. Springer, Berlin.

**Seitz, L.M. (1974)** Industrial application of microbial lipases: a review. *J. Am. Chem. Soc.* 51, 12-16.

**Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Pérez-Boada, M., Martínez, M.J., Sigoillot, J.C., Asther, M., Colom, J. y Martínez, A.T. (2005)** Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *J Biotechnol* 115:333-34.

**Sih, C. J., Laval, J., Rahim, M.A. (1963)** Purification and properties of steroid esterase from *Nocardia restrictus*. *J.Biol. Chem.* 238, 566-571.

**Sitholé, B.B., Sullivan, J.L. and Allen, L.H. (1992)** Identification and quantitation of acetone extractives of wood and bark by ion exchange and capillary GC with a spreadsheet program. *Holzforschung* 46(5), 409-416.

**Smith, L.S. (1996)** Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. *Lipids* 31: 453-487.

**Streitwieser, A, Jr. y Heathcock, C.H. (1993)** Química Orgánica, 3ª edición. Importecnica, S.A. 726-730.

**Sun, R., Lawther, J.M. y Banks, W.B. (1997)** A tentative chemical structure of wheat straw lignin. *Ind. Crops Prod.* 6: 1-8.

**Sun, R.C., Sun, X.F., Wang, S.Q., Zhu, W. y Wang, X.Y. (2002)** Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. *Ind. Crops Prod.* 15: 179-188.

**Svendsen, A., Borch, K., Barfoed, M., Nielsen, T.B., Gormsen, E. y Patkar, S.A. (1995)** Biochemical properties of cloned lipases from the *Pseudomonas* family. *Bioch. Biophys. Acta* 1258, 9-17.

- Svendsen, A., Clausen, I.G., Patkar, S.A., Borch, K. y Thellersen, M. (1997)** Protein engineering of microbial lipases. *Methods Enzymol.* 284, 317-340.
- Taketani, S., Nishino, T., Katsuki, H. (1981)** Purification and properties of sterol-ester hydrolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem. (Tokio)* 89, 1667-1673.
- Wakeham, S.G. y Frew, N.M. (1982)** Glass capillary gas chromatography-mass spectrometry of wax esters, steryl esters, and triacylglycerols. *Lipids* 17 (11), 831-843.
- Xu, F., Deussen, H.J., López, B., Lam, L., Li, K. (2001)** Enzymatic and electrochemical oxidation of N-hydroxy compounds. Redox potential, electron-transfer kinetics, and radical stability. *Eur. J. Biochem* 268, 4169-4176.
- Zabel R., and Morrell, J. (1992)** Wood microbiology: Decay and its prevention. Academic Press, London.
- Zhang, X., Eigendorf, G., Stebbing D.W., Mansfield, S.D. y Saddler, J.N. (2002)** Degradation of trilinolein by laccase enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 405: 44-54.
- Zhang, X., Renaud, S. y Paice, M. (2005)** The potential of laccase to remove extractives present in pulp and white water from TMP newsprint mills. *J. Pulp Paper Sci.* 31: 175-180.
- Zhang, X., Stebbing D.W., Saddler J.N., Beatson R.P. y Kruss, K. (2000)** Enzyme treatments of the dissolved and colloidal substances present in mill white water and the effects on the resulting paper properties. *L. Wood Chem Technol* 20: 321-335.