
Bioblanqueo de lino mediante el sistema lacasa mediador a presión atmosférica

Ursula Fillat, M. Blanca Roncero*

Textile and Paper Engineering Department. Universitat Politècnica de Catalunya, Colom 11, E-08222 Terrassa, Spain

*Flax biobleaching by laccase mediator system at atmospheric pressure
Bioblanqueig de lli mitjançant el sistema lacasa mediador a pressió atmosfèrica*

*Recibido: 25 de febrero de 2010; revisado: 22 del noviembre
de 2010; aceptado: 30 de noviembre de 2010*

RESUMEN

En este trabajo se estudia el bioblanqueo de pasta de lino basado en el sistema lacasa mediador (L) a presión atmosférica, en concreto, la influencia de la adición de oxígeno y del tiempo de tratamiento en las propiedades de pastas. Los resultados obtenidos muestran que la adición de oxígeno al sistema influye en las propiedades de la pasta tanto después de aplicar la etapa enzimática como después de la posterior realización de una etapa de extracción alcalina (E). En la evolución de la blancura de la pasta, se observan diferentes comportamientos después de la etapa L y después de la secuencia LE. A partir de los resultados del estudio de las coordenadas cromáticas CIE L*C*h y las curvas espectrofotométricas, se puede deducir que la etapa de tratamiento enzimático produce una modificación de la estructura de la lignina que lleva a la formación de grupos cromóforos que aportan color a la pasta. Los valores de número kappa indican que se producen dos fases diferenciadas en el biotratamiento, una primera fase de deslignificación rápida y una segunda de deslignificación lenta.

Palabras clave: Bioblanqueo, HBT, lacasa, lino, oxígeno, propiedades ópticas.

SUMMARY

In this study, the effect of the treatment time and oxygen addition on the laccase mediator system's efficiency applied to flax pulp at atmospheric pressure is evaluated. The presence of oxygen and the increase of its concentration in the medium affect on pulp properties after both enzymatic treatment (L) and alkaline extraction stage (E). Different behaviours of pulp brightness property are observed during L stage and LE sequence. Based on color properties (coordinates CIE L*a*b* and spectrophotometric curves), the enzyme treatment not only removes lignin, but also alters the structure of the pulp by causing the for-

mation of chromophoric groups giving color. The kappa number values show that two different steps take place in the biobleaching. Firstly a fast delignification occur and immediately a slower delignification.

Key words: Biobleaching, flax, HBT, laccase, oxygen, optical properties.

RESUM

En aquest treball s'estudia el bioblanqueig de pasta de lli basat en el sistema lacasa mediador (L) a pressió atmosfèrica, en concret, la influència de l'adició d'oxigen i del temps de tractament en les propietats de les pastes. Els resultats mostren que l'adició d'oxigen al sistema influeix en les propietats de la pasta tant després d'aplicar l'etapa enzimàtica com després de la posterior realització d'una etapa d'extracció alcalina (E). En l'evolució de la blancura de la pasta, s'observen diferents comportaments després de la etapa L i de la seqüència LE. A partir dels resultats de les coordenades cromàtiques CIE L*C*h i les curves espectrofotomètriques, es pot deduir que la etapa de tractament enzimàtic produeix una modificació de l'estructura de la lignina que porta a la formació de grups cromòfors que aporten color a la pasta. Els valors de l'índex kappa indiquen que es produeixen dos fases diferenciades en el biotratament, una primera fase de deslignificació ràpida i una segona lenta.

Paraules clau: Bioblanqueig, HBT, lacasa, lli, oxigen, propietats òptiques.

*Corresponding author. roncero@etp.upc.edu;
Tel.: +34937398210; Fax: +34937398101

1. INTRODUCCIÓN

La aparición de leyes más restrictivas sobre los procesos industriales lleva a la introducción de cambios y la utilización de nuevas tecnologías. El actual interés de la aplicación de biotecnología en los procesos de fabricación de pasta y papel es consecuencia de las posibilidades que ofrecen los tratamientos biológicos, como las xilanasas y las lacasas, en cuanto a estas restricciones medioambientales (Roncero et al. 2003; Siles et al. 1996). En pocos trabajos se han aplicado enzimas oxidativas para el blanqueo de pastas no madereras (Camarero et al. 2002; García et al. 2003; Camarero et al. 2004; Sigoillot et al. 2005; Fillat and Roncero 2009; Fillat and Roncero 2010). Por otro lado, los estudios de deslignificación de pasta mediante el sistema lacasa mediador no suelen analizar la degradación de la celulosa a partir de la medida de la viscosidad.

Los equipos para el estudio del sistema lacasa mediador utilizados en la bibliografía se clasifican en dos tipos, los bioblanqueos realizados en reactor a presión (Call and Mücke 1997; Li et al. 1999; Valls et al. 2010) y los tratamientos realizados en matraces en los que se burbujea una corriente de oxígeno (Balakshin et al. 2001; Camarero et al. 2004; García et al. 2003; Ibarra et al. 2006). En cuanto a la influencia de la concentración de oxígeno en el sistema lacasa mediador, cuando el tratamiento se realiza en un reactor a presión, algunos autores indican que, un aumento en la presión de oxígeno produce un aumento de la deslignificación de la pasta (Balakshin et al. 2001; Call and Mücke 1997; Moldes and Vidal 2008). También se ha observado que se produce un aumento en la deslignificación de la pasta de lino y una disminución de la viscosidad después de aplicar la secuencia LP (donde P es una etapa de peróxido de hidrógeno) cuando el tratamiento se realiza en el reactor a presión respecto al tratamiento en matraz (Camarero et al. 2004; García et al. 2003). No obstante, no se ha descrito en la bibliografía la influencia de la adición de oxígeno en el medio en la deslignificación de pasta y en las propiedades ópticas (coordenadas cromáticas CIE L^*C^*h y curvas espectrofotométricas), temas que se tratan en este trabajo. En este estudio también se determinan parámetros, como pueden ser el potencial redox del sistema y la concentración de oxígeno disuelto, que pueden ser de interés en el control de un posible proceso de bioblanqueo industrial.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materia prima

La pasta de lino ha sido suministrada por la empresa CELESA (Tortosa, España), obtenida mediante un proceso de cocción químico NaOH-AQ (sosa-antraquinona). Antes de realizar los tratamientos de blanqueo, la pasta de lino se somete a un lavado ácido (W) que permite acondicionar la pasta al pH del tratamiento lacasa-mediador y extraer restos de lejía residual que no se han eliminado en el lavado industrial. De modo que en el estudio bioquímico se considera la pasta inicial como la pasta de lino tras realizar el lavado ácido. Este tratamiento se realiza a un 2 %odp de consistencia, se ajusta el pH 4 de la pasta con ácido sulfúrico y se mantiene en agitación durante 30 min. Las propiedades de la pasta suministrada son: número kappa de 11,0, una blancura de 33,6 %ISO y 967 mL·g⁻¹ de viscosidad.

2.2 Etapa con el sistema lacasa mediador (etapa L)

Los tratamientos con el sistema lacasa mediador a presión atmosférica se efectúan en 10 g de pasta a baja consistencia (1,5 %odp), en una solución tamponada 50 mM de tartrato sódico a pH 4. Se añade Tween 80 como tensoactivo. Las experiencias se llevan a cabo a una temperatura constante de 30 °C y en vasos de precipitados altos de 1 L abiertos (presión atmosférica). Se mide en la suspensión fibrosa el potencial redox y la concentración de oxígeno disuelto. Se realizan tres tratamientos sistema lacasa-mediador distintos dependiendo del tipo de gas que se burbujea en la suspensión de pasta, sin gas (Lsg), con aire (Laire) o con oxígeno (Lox). La dosis de lacasa es de 25 U·g⁻¹ y la dosis de mediador HBT es de 2,6 %odp. El tiempo de tratamiento se varía entre 0,5 y 30 h. A las pastas obtenidas después de los lavados se les realiza una etapa de extracción alcalina (E) y una etapa reductora con borohidruro sódico (R), a partir de 5 g y 1 g de pasta respectivamente.

2.3 Etapa de extracción alcalina (etapa E)

A las pastas obtenidas después de la etapa L se les realiza una etapa de extracción alcalina (E). Mediante esta etapa E se consigue solubilizar y extraer aquellas fracciones de lignina que no se han solubilizado durante la etapa de tratamiento enzimático ni en los correspondientes lavados. La etapa E se realiza en el reactor individual oscilante Easdyde AHIBA de Datacolor. Los tratamientos se efectúan sobre 5 g de pasta a 5 %odp de consistencia. Las condiciones de esta etapa son 1,5 %odp de NaOH durante 120 min a una temperatura de 90 °C.

2.4 Etapa reductora (etapa R)

A las pastas obtenidas después de la etapa L se les realiza una etapa reductora (R). El objetivo de esta etapa R es evitar la degradación de los hidratos de carbono en posteriores etapas alcalinas, debido a la posible formación de grupos carbonilo en la celulosa en la etapa de tratamiento enzimático (Roncero y Vidal, 2007). La etapa R se realiza en bolsas de polietileno, con 1 g de pasta al 5 %odp de consistencia, con 2 %odp de NaBH₄ durante 30 min a temperatura ambiente.

2.5 Propiedades de las pastas

Después de realizar la etapa L y las secuencias LE y LR se caracterizan las muestras, se miden las propiedades de blancura, número kappa y viscosidad según la normativa ISO 2470, ISO 302 e ISO 5351-1, respectivamente. Se miden también las coordenadas cromáticas CIE L^*C^*h y la reflectancia intrínseca.

El porcentaje de deslignificación de la pasta se calcula mediante la ecuación 1. Donde, IK_0 es el valor de número kappa de la pasta inicial y IK_f el número kappa de la pasta después de cada etapa a estudiar.

$$\text{porcentaje de deslignificación (\%)} = \frac{IK_0 - IK_f}{IK_0} \cdot 100 \quad (1)$$

En el espacio CIE L^*C^*h se puede caracterizar un color mediante tres variables: la luminosidad (L^*), el chroma (C^*) y el ángulo hue (h). Estos parámetros se basan en el sistema CIE L^*a^*b , que se define como un espacio tridimensional donde cada uno de los puntos está asociado a un determinado color. La coordenada L^* (luminosidad o

“lightness”) indica la cantidad de luz que tiene un determinado color y oscila entre 0 (negro absoluto) y 100 (blanco perfecto), por lo que define si el color es claro u oscuro, el valor de C^* viene determinado por el módulo del vector que está formado por a^* (color rojo a verde) y b^* (color amarillo a azul) y define la intensidad del color. El ángulo h es aquel que forma el vector definido por las coordenadas a^* y b^* e indica el matiz del color que presenta un material, un aumento en el ángulo h supone un cambio de color. El factor de reflectancia intrínseca se define como la relación, expresada en tanto por ciento, entre la radiación reflejada por la formeta opaca y la radiación reflejada por un difusor reflector perfecto en las mismas condiciones. Tanto en las medidas de reflectancia, como las de coordenadas cromáticas se ha utilizado la fuente de luz C(ISO) y el iluminante/observador C(ISO)/2°.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Efecto del lavado ácido y de la etapa de extracción alcalina en la pasta cruda

La pasta suministrada por CELESA se somete a un lavado ácido (W) y a una etapa de extracción alcalina (E) para determinar el efecto individual de cada uno de estos tratamientos en las propiedades de la pasta. El objetivo del lavado es acondicionar la pasta al pH de actuación de la enzima, además de realizar un lavado de la pasta antes de someterla a la etapa L, con el fin de eliminar las impurezas y reducir el contenido en cationes metálicos.

Los resultados del porcentaje de deslignificación muestran que el lavado ácido ya deslignifica la pasta en un 8 %, probablemente debido a un lavado deficiente de la pasta cruda. Una parte de la lignina presente en la pasta inicial, 24 %, se solubiliza en la etapa E hasta llegar a un número kappa de 8,3 en WE. La etapa W aumenta la blancura de la pasta en casi 3 unidades hasta llegar a 36,3 %ISO, seguramente debido a la eliminación de lejía residual del proceso de cocción presente en la pasta cruda. La etapa E también aumenta la blancura en 2 unidades, sin embargo cuando esta etapa se realiza después de la etapa W, se obtiene un incremento de la blancura de casi 4 unidades, de manera que tras el tratamiento WE se llega a una blancura de 40,2 %ISO; por lo que la etapa W tiene un efecto positivo en la acción de la etapa E. La pasta se blanquea durante la etapa E, principalmente por la disolución de la lignina, como lo demuestra la disminución de número kappa.

3.2 Estudio del tiempo de tratamiento en el sistema la-casa mediador

3.2.1 Determinación de la concentración de oxígeno y el potencial redox durante la etapa L

El potencial redox de la pasta en la solución de tartrato se encuentra alrededor de 250 mV. Al adicionar la enzima en el sistema el potencial aumenta ligeramente hasta los 320 mV. Cuando se adiciona el mediador se produce un aumento instantáneo del potencial hasta llegar a los 660 mV. Se realiza una experiencia para determinar el potencial redox del sistema en presencia de HBT y en ausencia de la enzima lacasa, dando como resultado 230 mV. El potencial redox de un sistema con el tampón tartrato sódico, enzima lacasa y mediador sin presencia de pasta se encuentra alrededor de 675 mV. El potencial redox no depende del tipo de adición de gas al sistema; en las tres

experiencias, Lsg, Laire y Lo, el potencial redox se mantiene constante en torno a 660 mV durante todo el tiempo de tratamiento, algo inferior a la experiencia sin pasta. Por lo que el potencial redox medido durante la etapa L no se correlaciona con la deslignificación ni con la degradación de la pasta pero depende de los reactivos que se adicionan en el sistema.

Se determina la concentración de oxígeno disuelto durante los tratamientos sin adición de gas (Lsg) y con adición de aire (Laire). En el tratamiento con adición de oxígeno la concentración de oxígeno es superior a 20 ppm y no se ha podido determinar con el oxímetro que se dispone en el laboratorio. En general, es de esperar que cuanto mayor es el aporte de oxígeno en el sistema mayor es la concentración de oxígeno disuelto. En la Fig.1 a y b se observa que la concentración de oxígeno en los tratamientos depende del tipo de adición de oxígeno al sistema y no se mantiene constante a lo largo del tiempo. En los tratamientos sin adición de gas y con adición de aire se produce una disminución rápida de la concentración inicial de oxígeno durante los primeros minutos de reacción. Posteriormente la concentración de oxígeno aumenta hasta llegar al estado estacionario a partir de las cuatro horas de tratamiento.

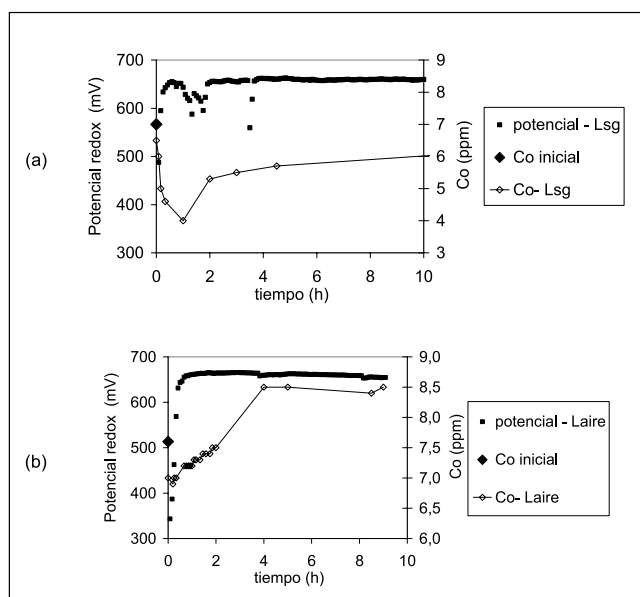
3.2.1 Estudio de la deslignificación

Los porcentajes de deslignificación obtenidos después de aplicar la etapa L y la secuencia LE se muestran en la tabla 1. El porcentaje de deslignificación de la pasta se calcula según la ecuación 1, en este caso, IK_0 es el valor de número kappa de la pasta inicial y IK_t es el número kappa de la pasta después de aplicar la etapa L o la secuencia LE. En la etapa L se observa una deslignificación rápida al inicio del tratamiento seguida de una fase de deslignifica-

Tabla 1. Porcentajes de deslignificación (%) después de aplicar la etapa L y la secuencia LE respecto del tiempo de reacción.

| tiempo (h) | Etapa L | | | Secuencia LE | | |
|------------|---------|-------|-----|--------------|--------|------|
| | Lsg | Laire | Lox | LsgE | LaireE | LoxE |
| 0,5 | 13 | 12 | 12 | 33 | 33 | 40 |
| 1 | 13 | 17 | 12 | 31 | 37 | 48 |
| 1,5 | 14 | 14 | 14 | - | 40 | 47 |
| 2 | 12 | 12 | 15 | 34 | 36 | 44 |
| 2,5 | 13 | 17 | 16 | 36 | 39 | 47 |
| 3 | 14 | 20 | 19 | 36 | 41 | 46 |
| 4 | 14 | 20 | 22 | 39 | 51 | 51 |
| 5 | 19 | 26 | 21 | 40 | 55 | 53 |
| 9 | - | - | - | 41 | - | 56 |
| 16 | 15 | 26 | 31 | 52 | 68 | 68 |
| 24 | 19 | 30 | 35 | 46 | 61 | 63 |
| 30 | 25 | 32 | 41 | 55 | 61 | 70 |

ción más lenta. También se aprecia que durante las tres primeras horas de tratamiento no se aprecian diferencias significativas entre los tres tratamientos. Sin embargo, a tiempos superiores, se observan diferencias, obteniéndose que el porcentaje de deslignificación es superior en el tratamiento realizado con aire (Laire) respecto al tratamiento sin introducción de gas (Lsg). Las diferencias en el porcentaje de deslignificación entre el tratamiento Laire y el tratamiento con adición de oxígeno (Lox) son menos significativas, aunque se observa que el porcentaje de deslignificación es algo superior en el tratamiento Lox, con el que se obtiene un número kappa mínimo de 6,0. En las pastas obtenidas con la secuencia LE se puede observar la misma tendencia que en la etapa L; una primera fase de deslignificación rápida durante las primeras 5 horas de tratamiento (en los primeros 30 min la deslignificación puede llegar hasta el 40 %) y una segunda fase de deslignificación más lenta en la que se llega a un valor de número kappa límite. El número kappa mínimo obtenido es de 3,1, y corresponde al tratamiento LoxE a las 30 h. A diferencia de los resultados obtenidos después de aplicar la etapa L, durante todo el tratamiento la deslignificación es superior en las experiencias realizadas con adición de aire y oxígeno (LaireE y LoxE) respecto al tratamiento sin



adición de gas (LsgE).

Fig. 1. Potencial redox y concentración de oxígeno en las experiencias Lsg (a) y Laire (b).

El hecho de que se llegue a un número kappa límite, a partir del cual un aumento del tiempo de tratamiento no supone una mayor deslignificación, ha sido observado en trabajos anteriores (Balakshin et al. 2001; Camarero et al. 2004; Valls et al. 2010) corroborándose que sólo una parte de la lignina presente en la pasta se puede eliminar en una sola etapa de tratamiento enzimático. Esto puede ser debido a una pérdida de actividad de la enzima al final del tratamiento (Fillat and Roncero 2009b; Fillat et al. 2010; Ibarra et al. 2006), a la oxidación del HBT a su forma no activa (Li et al. 1999), a la acumulación de fragmentos oxidados de la lignina de alta reactividad y/o a problemas de difusión de los reactivos químicos en las fibras. La presencia de un mayor aporte de oxígeno dentro de unos márgenes

de concentraciones en el tratamiento sistema lacasa mediador, de 4 a 7 ppm (Fig. 1 a y b), permite una mayor oxidación de la lignina presente en la pasta, por lo que el número kappa límite al final del tratamiento es más bajo (1,2 puntos de número kappa) en las experiencias con adición de aire y oxígeno respecto al tratamiento sin adición de gas. La presencia de una mayor cantidad de oxígeno en el sistema también supone, al inicio del tratamiento, un ligero aumento de la pendiente de disminución del número kappa respecto al tiempo en el tratamiento Lox respecto al Laire. El número kappa límite es prácticamente el mismo en ambos tratamientos por lo que un aumento en la concentración de oxígeno por encima de 7 ppm supone un aumento de la cinética de deslignificación de pasta, aunque poco significativo. Que el incremento del aporte de oxígeno en el sistema produzca una disminución en el número kappa límite y por tanto una disminución de la cantidad de lignina residual en la pasta, sugiere que el valor de número kappa límite está fuertemente relacionado con factores físicos, de difusión de reactivos en la pasta (Balakshin et al. 2001; Call and Mücke 1997).

En todos los tratamientos la aplicación de una etapa E aumenta el porcentaje de deslignificación respecto a la etapa L (Tabla 1). Si se realiza una etapa E a la pasta inicial (sin etapa L) se produce una disminución del número kappa en 1,8 unidades. De modo que una fracción de la lignina presente en la pasta inicial se disuelve en la etapa de extracción alcalina. Si se realiza la etapa L, la diferencia de número kappa de la pasta tratada después de la secuencia LE respecto al número kappa obtenido tras la etapa L es superior durante todo el tratamiento a 1,8. Por lo que se puede deducir que durante la etapa L se producen modificaciones en la estructura de la lignina que provocan que ésta no sea soluble a pH 4 durante el tratamiento L, ni a pH neutro durante los lavados posteriores de la pasta y sin embargo esta lignina modificada se solubiliza en la etapa de extracción alcalina.

3.2.2 Estudio de la variación de la blancura

Los resultados de blancura obtenidos tienen un comportamiento distinto en función del tiempo según se aplica la etapa L o la secuencia LE (Fig. 2). Al inicio del tratamiento en la etapa L se produce una disminución de la blancura respecto a la blancura de la pasta inicial (36,3 %ISO), seguidamente la blancura aumenta rápidamente hasta llegar a un valor prácticamente constante y superior a la blancura de la pasta inicial. Al igual que en el porcentaje de deslignificación, en la secuencia LE se pueden observar dos fases en el sistema, en una primera fase rápida, la blancura aumenta unas 10 unidades %ISO; en una segunda fase más lenta donde se llega al máximo valor de blancura. Al inicio del tratamiento no se observan diferencias apreciables entre los tratamientos LsgE, LaireE y LoxE, en cambio, a tiempos largos se puede observar que el tratamiento LoxE es el que permite obtener grados de blanco más elevados. En todos los casos se observa un aumento de la blancura de la pasta después de aplicar la etapa E respecto a la blancura de la pasta después de la etapa L (Fig. 2). Como se ha comentado anteriormente, la diferencia de grado de blanco entre la pasta inicial y esta pasta después de la etapa E es de 5 unidades %ISO. La diferencia de blancura de la pasta tratada después de la secuencia LE respecto a la blancura obtenida tras la etapa L es superior durante todo el tratamiento a 5 %ISO; por lo que la etapa L produce alteraciones en la estructura de

la lignina que provocan un aumento de la blancura de la pasta después de realizar la etapa E.

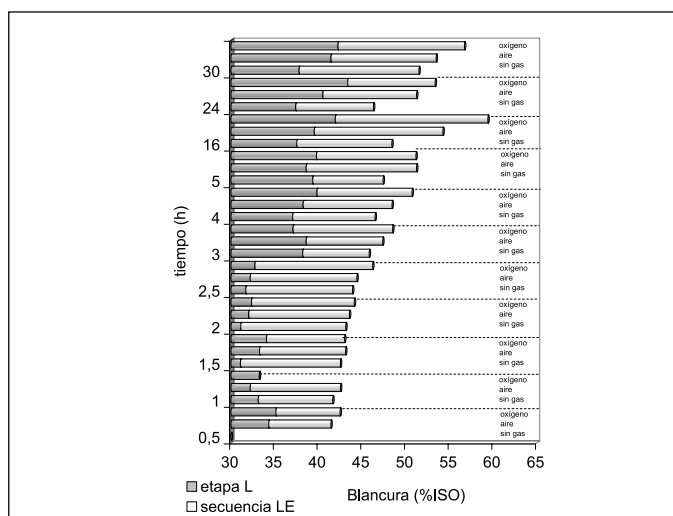


Fig. 2. Aumento de blancura después de la etapa L y la secuencia LE.

Algunos autores afirman que el sistema lacasa mediador produce una pérdida de blancura de la pasta inicial que se recupera posteriormente en la etapa de extracción alcalina (Chakar and Ragauskas 2000; Freudenreich et al. 1998). A partir de los resultados obtenidos se puede observar como la disminución o aumento de la blancura respecto a la pasta inicial depende del tiempo de tratamiento. Esta disminución inicial de la blancura puede ser debida a una formación de grupos cromóforos producidos durante la oxidación de la lignina; estas estructuras aportan color a la pasta. Se ha descrito anteriormente la degradación oxidativa de las cadenas laterales (Camarero et al. 1997), la formación de quinonas (Crestini and Argyropoulos 2001) y el incremento de los grupos carbonilo (Crestini et al. 2003; Ibarra et al. 2005; Poppius-Levlin et al. 1999) durante la biodegradación de lignina. Al comparar blancura e número kappa, se observa que después de la secuencia LE no hay diferencias apreciables en el número kappa entre los tratamientos LoxE y LaireE, en cambio la blancura es superior en LoxE. Este aumento de blancura no se debe a una menor cantidad de lignina en la pasta, sino que la lignina en el tratamiento LoxE podría presentar un grado de oxidación superior al del tratamiento LaireE. Un mayor aporte de oxígeno, que aumentara la concentración por encima de 8,5 ppm en el tratamiento, no supone una mayor deslignificación en la secuencia LE, pero sí una mayor modificación de la lignina residual en la pasta, dando lugar a una pasta con una mayor blancura.

3.2.3 Estudio de la variación de color

Debido a lo expuesto anteriormente en cuanto a la posible formación de grupos cromóforos en la etapa enzimática, se determinan las coordenadas cromáticas CIE L*C*h y las curvas espectrofotométricas de las pastas obtenidas después de la etapa L y la secuencia LE (Fig. 3). La pasta inicial presenta unos valores de las coordenadas cromáticas L*, C* y h de 73; 13 y 83, respectivamente. La pasta inicial E presenta unos valores de las coordenadas cromáticas L*, C* y h de 77, 14 y 83 respectivamente. Las coordenadas C* y h asociadas al matiz o a la intensidad del color son similares en ambas pastas, por lo que la etapa de extracción alcalina no supone un cambio en la estructura de la lignina de la pasta. Sin embargo, produce un aumento de la coordenada L*, la pasta es más clara, esto puede ser debido a la eliminación de lignina de la pasta, tal como muestra la disminución del número kappa de la pasta inicial. En la figura 3 (a) se observa como la coordenada C* después de la etapa L es superior a la coordenada C* de la pasta inicial durante todo el tiempo de tratamiento, por lo que la pasta tras el tratamiento enzimático presenta un color más intenso que la inicial. En la primera hora de tratamiento en la etapa L se produce un aumento de 5 unidades de la coordenada C* y una disminución del ángulo h de 4 °; por lo que la etapa L a tiempo inicial ya produce cambios, tanto en la intensidad como en la tonalidad del color de la pasta, que adquiere un aspecto rojizo (Fig. 3 a y b). La coordenada C* se mantiene prácticamente constante durante todo el tiempo de tratamiento, en cambio, entre las 5 y 16 h, el ángulo h aumenta hasta 4 unidades, de manera que cambia la tonalidad del color de la pasta, disminuye la tonalidad roja y aumenta la amarilla. A partir de las 16 h el ángulo h se mantiene prácticamente constante. La secuencia LE presenta una coordenada C* inferior a la de la etapa L durante todo el tratamiento (entre 2 y 6 unidades). El ángulo h es unos 4 ° superior en la secuencia LE respecto a la etapa L. De manera que la etapa de extracción alcalina produce una disminución tanto de la intensidad del color como de la tonalidad rojiza adquirida durante el tratamiento enzimático. La coordenada L* (Fig. 3 c) es superior en la secuencia LE que en la etapa L. Aunque al inicio del tratamiento la coordenada L* en la etapa L es algo inferior a la inicial, ésta aumenta al aumentar el tiempo de tratamiento, tanto después de la etapa L como de la secuencia LE, de manera que la pasta se vuelve más clara. Al inicio del tratamiento, durante las primeras dos horas, las pastas obtenidas tras la secuencia LE presentan una coordenada C* y un ángulo h similares a las de la pasta inicial y la inicial E. En cambio, la coordenada L* es superior, las pastas tras la secuencia LE son más claras que la inicial y la inicial E. A medida que aumenta el tiempo de tratamiento en la secuencia LE, disminuye la coordenada C* y aumenta el ángulo h. Se observan dos fases en el

Tabla 2. Variación de la viscosidad de la pasta (mL·g⁻¹).

| Tiempo (h) | Etapa L | | | Secuencia LE | | | Secuencia LR | | |
|------------|----------|----------|----------|--------------|----------|----------|--------------|----------|----------|
| | Lsg | Laire | Lox | LsgE | LaireE | LoxE | LsgR | LaireR | LoxR |
| 5 | 933 ± 34 | 926 ± 6 | 935 ± 15 | 860 ± 14 | 871 ± 14 | 886 ± 20 | 891 ± 14 | - | - |
| 9 | 885 ± 15 | 842 ± 11 | 824 ± 5 | 837 ± 22 | 803 ± 2 | 789 ± 1 | 892 ± 16 | 887 ± 12 | 864 ± 12 |
| 16 | 904 ± 10 | 846 ± 20 | 828 ± 7 | 809 ± 14 | 788 ± 15 | 756 ± 9 | 898 ± 11 | 871 ± 3 | - |
| 24 | 890 ± 3 | 872 ± 42 | 845 ± 11 | 838 ± 1 | 765 ± 21 | 767 ± 9 | 969 ± 17 | 961 ± 0 | 949 ± 9 |
| 30 | 860 ± 10 | 865 ± 1 | 789 ± 9 | 763 ± 5 | 748 ± 5 | 734 ± 32 | 923 ± 23 | 915 ± 11 | 901 ± 32 |

cambio de coordenadas cromáticas; una primera fase en la que las coordenadas C^* y h varían de forma rápida y una segunda fase, a partir de las 5 h, en las que las coordenadas se mantienen prácticamente constantes. En general,

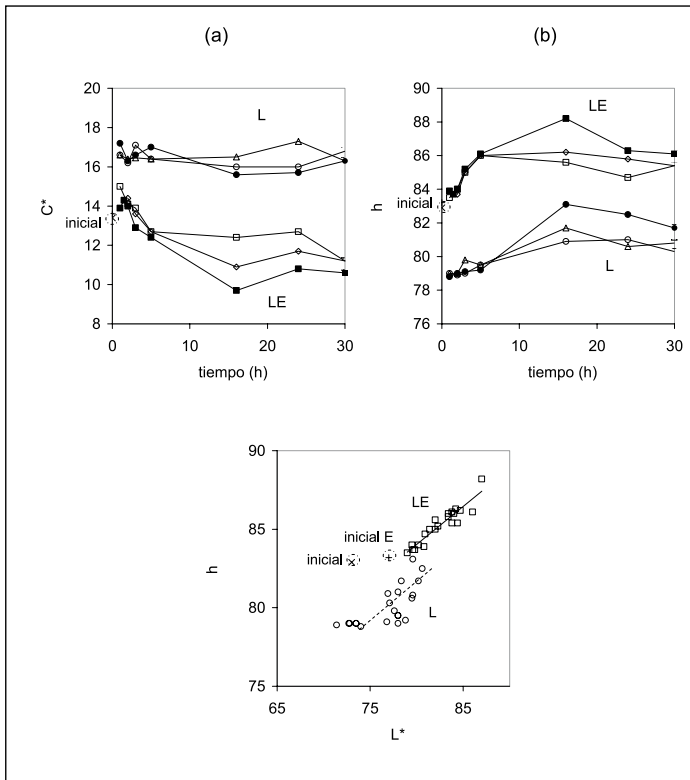


Fig. 3. Coordenadas CIE $L^*a^*b^*$ de las pastas obtenidas en la etapa L y la secuencia LE en función del tiempo de tratamiento. En las figuras, pasta inicial (x), Lsg(o), Laire (Δ), Lox (o), LsgE (□), LaireE (Δ) y LoxE (■).

se observa que a medida que transcurre el tratamiento, en la etapa L no disminuye la intensidad del color medida como C^* . El aumento en la coordenada L^* , se debe al cambio de color, disminuye la tonalidad roja (aumenta el ángulo h). Sin embargo, durante la secuencia LE, el au-

mento de la coordenada L^* se debe tanto a la disminución de la intensidad del color (disminuye C^*) como también al cambio de color de la pasta (aumenta h).

Las curvas espectrofotométricas de las pastas de la etapa L (Fig. 4) muestran una pendiente superior que la curva de la pasta inicial, de modo que la reflectancia intrínseca aumenta en mayor medida en la zona del amarillo-rojo (entre 400 y 700 nm).

En cambio, las curvas de la pasta inicial E y de las pastas obtenidas en la secuencia LE presentan una pendiente similar a la de la pasta inicial, por tanto, un color similar. En la figura 4 se observa que durante la primera hora de tratamiento la reflectancia de 400 a 550 nm es inferior a la de la pasta inicial, por lo que las pastas obtenidas en la etapa L al inicio del tratamiento presentan una blancura inferior a la de la pasta inicial, como se ha comentado en el apartado anterior. Estos cambios de coloración determinados a partir de la medida de las coordenadas cromáticas y de las curvas espectrales se pueden observar de manera visual directamente en las formetas obtenidas. A partir de estos resultados se puede deducir que la etapa de tratamiento enzimático no solamente elimina lignina de la pasta sino que también produce una modificación de su estructura que lleva a la formación de grupos cromóforos. Estos grupos se eliminan posteriormente en la etapa de extracción alcalina.

3.2.4 Estudio de la variación de la viscosidad

En la Tabla 2 se muestran las medidas de viscosidad de las pastas después de la etapa L y las secuencias LE y LR. Tanto en la etapa L como en la secuencia LE se puede observar una ligera disminución de la viscosidad al aumentar el tiempo en el tratamiento enzimático. En cuanto a la influencia de la adición de oxígeno, se pueden observar diferencias de viscosidad apreciables entre el tratamiento sin adición de gas (Lsg y LsgE) y los tratamientos con adición de aire (Laire y LaireE) y de oxígeno (Lox y LoxE); siendo inferior en estos dos últimos.

Las diferencias de viscosidad entre las pastas antes y después de la realización de la etapa E pueden llegar a los 100 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ (Tabla 2). La oxidación de la pasta durante el proceso de blanqueo puede introducir grupos carbonilo en la estructura de carbohidratos de la celulosa. Estos grupos se degradan en una posterior etapa alcalina, por lo que se puede producir una disminución de la viscosidad de la pasta. La pasta antes de la etapa E puede haber sufrido, por tanto, dos efectos en la celulosa; una degradación directa o pueden haberse modificado los grupos funcionales de ésta, de manera que esta celulosa modificada se degrada en el tratamiento alcalino posterior. La medida de viscosidad se realiza en medio alcalino, de modo que al medir la viscosidad después de la etapa L, se mide la degradación producida por los dos efectos comentados anteriormente. La etapa de extracción alcalina se realiza en un medio fuertemente básico y en caliente. Durante esta etapa se puede degradar una mayor cantidad de celulosa modificada que la que se degrada durante la medida de viscosidad. Por lo que la diferencia de viscosidad entre las etapas L y la secuencia LE se puede deber a la degradación de la celulosa modificada.

Se realiza un estudio de la posible aplicación de una etapa reductora con borohidruro sódico (etapa R) después de la etapa L. Esta etapa R permite reducir los grupos funcionales de la celulosa que se han oxidado anteriormente en la pasta, de manera que en una etapa posterior a pH alcalino

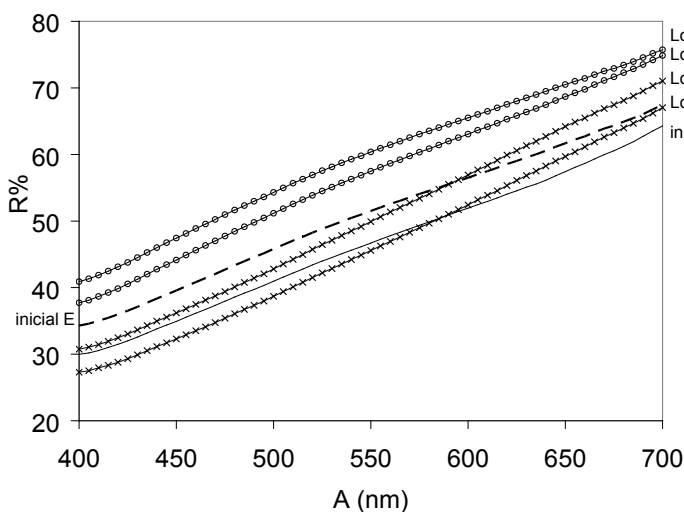


Fig. 4. Curvas de reflectancia ($R\%$) de las pastas inicial e inicial E, experiencias Lox y LoxE a tiempos de 1 h y 3 h. En la figura, inicial (línea continua), inicial E (línea discontinua), Lox (x) y LoxE (o).

no se produce la degradación de esta celulosa modificada. Los valores de viscosidad después de la secuencia LR son superiores a los obtenidos en la etapa L, lo que demuestra que una parte de la celulosa oxidada se degrada en el análisis de medida de viscosidad. Debido a esto, la pérdida de viscosidad en las pastas se debe mayoritariamente a una oxidación de los grupos de la celulosa y no es consecuencia de una degradación directa de la celulosa de la pasta.

4. CONCLUSIONES

En los tratamientos sin adición de gas y con adición de aire se produce una disminución rápida de la concentración inicial de oxígeno durante los primeros minutos de reacción, que coincide con la fase de deslignificación rápida de la pasta. Posteriormente la concentración de oxígeno aumenta hasta llegar al estado estacionario a partir de las cuatro horas de tratamiento, tiempo a partir del cual ya prácticamente no se produce deslignificación y empieza a disminuir la viscosidad de manera importante. El hecho de que el incremento de la concentración de oxígeno en el sistema, de 4 a 7 ppm, produzca una disminución en el número kappa límite y por tanto una disminución de la cantidad de lignina residual en la pasta, sugiere que el valor de número kappa límite está relacionado con factores físicos de difusión de reactivos en la pasta. La presencia de una mayor cantidad de oxígeno en el tratamiento hace aumentar la capacidad del sistema lacasa medidor de modificar la lignina presente en la pasta en mayor medida que la capacidad de eliminar lignina en esta etapa de tratamiento enzimático.

La disminución o aumento de la blancura de la pasta tratada enzimáticamente respecto a la pasta inicial depende del tiempo de tratamiento. Esta pérdida de blancura a tiempos cortos de tratamiento se recupera posteriormente en la etapa de extracción alcalina. A partir de los resultados del análisis de cromaticidad de las pastas, el estudio de las coordenadas cromáticas CIE L*a*b* y las curvas espectrofotométricas, se puede deducir que la etapa de tratamiento enzimático no solamente elimina lignina de la pasta sino que también produce una modificación de su estructura que lleva a la formación de grupos cromóforos que aportan color a la pasta. Se observa un rápido aumento de la tonalidad roja de la pasta durante la primera hora de tratamiento, a medida que aumenta el tiempo de tratamiento disminuye la tonalidad adquirida, por lo que la pasta durante las dos primeras horas presenta una mayor cantidad de grupos cromóforos que la pasta inicial. Estos grupos se eliminan posteriormente en la etapa de extracción alcalina.

La disminución de viscosidad observada después de la etapa L y la secuencia LE se debe mayoritariamente a una oxidación de los grupos de la celulosa y no es consecuencia de una degradación directa de la celulosa de la pasta durante el tratamiento enzimático. La realización de una etapa R reductora en la secuencia LR permite la recuperación de la viscosidad de la pasta.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado gracias al proyecto del MICINN (FUNCICEL, Ref. CTQ2009-12904), el proyecto

europeo (BIORENEW, Ref.: NMP2-CT-2006-026456) y el Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya y del Fondo Social Europeo, beca de 'Formació de Personal Investigador' (2005 FI 00139). Los autores agradecen a CELESA y a Novozymes el haber suministrado la pasta inicial y la lacasa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Balakshin, M., Chen, C.-L., Gratzl, J., Kirkman, A. and Jakob, H. (2001) Biobleaching of pulp with dioxygen in laccase-mediator system - effect of variables on the reaction kinetics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16, 205-215.
2. Call, H.P. and Mücke, I. (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator systems (LignoZymR-process). *Journal of Biotechnology* 53, 163-202.
3. Camarero, S., Galletti, G.C., Martínez, A.T. (1997) Demonstration of in situ oxidative degradation of lignin-side chains by two white-rot fungi using analytical pyrolysis of methylated wheat straw, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11, 331-334.
4. Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., del Río, J.C. and Gutiérrez, A. (2002) Flax pulp bleaching and residual lignin modification by laccase-mediator systems. *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* 21, 213-221.
5. Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., del Río, J.C., Gutiérrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martínez, M.J. and Martínez, A.T. (2004) Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme Microbial Technology* 35, 113-120.
6. Chakar, F.S. and Ragauskas, A.J. (2000) The effects of oxidative alkaline extraction stages after laccase/HBT and laccase/NHAA treatments - an NMR study of residual lignins. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 20, 169-184.
7. Crestini, C., Jurasek, L. and Argyropoulos, D.S. (2003) On the mechanism of the laccase-mediator system in the oxidation of lignin. *Chemistry - a European Journal* 9, 5371-5378.
8. Crestini, C. and Argyropoulos, D.S. (2001) On the role of 1-hydroxybenzotriazole as mediator in laccase oxidation of residual kraft lignin. *ACS Symposium Series* 785, 373-390.
9. Fillat, A., Colom, J. and Vidal, T. (2010) A new approach to the biobleaching of flax pulp with laccase using natural mediators. *Bioresource Technology* 101, 4104-4110. In press.
10. Fillat, U. and Roncero, M.B. (2009a) Effect of process parameters in laccase mediator system delignification of flax pulp. Part I. Pulp properties. *Chemical Engineering Journal* 152, 322-329.
11. Fillat, U. and Roncero, M.B. (2009b) Effect of process parameters in laccase mediator system delignification of flax pulp. Part II. Impact on effluents properties. *Chemical Engineering Journal* 152, 330-338.
12. Fillat, U. and Roncero, M.B. (2010) Optimization of laccase mediator system in producing biobleached flax pulp. *Bioresource Technology* 101, 181-187.
13. Freudenreich, J., Amann, M., Fritz-Langhals, E. and Stohrer, J. (1998) Understanding the lignozym-pro-

-
- cess. International Pulp Bleaching Conference pp. 71-76.
14. García,O., Camarero,S., Colom,J.F., Martínez,A.T., Martínez,M.J., Monje,R. and Vidal,T. (2003) Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* 57, 513-519.
 15. Ibarra, D., Camarero, S., Romero, J., Martínez, M. J. and Martínez, A. T. (2005) Biobleaching of eucalypt kraft pulp: Effect of including the laccase-mediator treatment at different stages of a totally chlorine-free industrial sequence. COST Action E-23: "Biotechnology for Pulp and Paper Manufacture: From Tailor-Made Biocatalysts to Mill Application".
 16. Ibarra,D., Romero,J., Martínez,M.J., Martínez,J. and Camarero,S. (2006) Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalypt pulp by laccase-mediator. *Enzyme Microbial Technology* 39, 1319-1327.
 17. Li,K., Xu,F. and Eriksson,K.-E. (1999) Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2654-2660.
 18. Moldes, D. and Vidal, T. (2008) Laccase-HBT bleaching of eucalyptus kraft pulp: Influence of the operating conditions. *Bioresource Technology* 99, 8565-8570
 19. Poppius-Levlin,K., Wang,W., Tamminen,T., Hortling,B., Viikari,L. and Niku-Paavola,M.L. (1999) Effects of laccase/HBT treatment on pulp and lignin structures. *Journal of Pulp and Paper Science* 25, 90-94.
 20. Rochefort,D., Leech,D. and Bourbonnais,R. (2004) Electron transfer mediator systems for bleaching of paper pulp. *Green Chemistry* 6, 14-24.
 21. Roncero,M.B., Colom,J.F. and Vidal,T. (2003) Influencia de los tratamientos enzimáticos con xilanasas en la composición de hidratos de carbono de pastas para papel. *Afinidad* 60, 8-15.
 22. Roncero,M.B. and Vidal,T. (2007) Optimization of ozone treatment in the TCF bleaching of paper pulps. *Afinidad* 64, 420-428.
 23. Sigoillot,C., Camarero,S., Vidal,T., Record,E., Asther,M., Perez-Boada,M., Martínez,M.J., Sigoillot,J.C., Asther,M., Colom,J.F. and Martínez,A.T. (2005) Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal of Biotechnology* 115, 333-343.
 24. Siles, F.J., Torres, A.L., Colom, J. and Vidal, T. (1996) Blanqueo biológico de pasta kraft de frondosas. *Afinidad* 53, 92-102.
 25. Valls,C., Vidal,T. and Roncero, M.B. (2010) The role of xylanases and laccases on hexenuronic acid and lignin removal. *Process Biochemistry* 45, 425-430.
 26. Valls, C., Vidal, T., Roncero, M.B. (2010) Boosting the effect of a laccase-mediator system by using a xylanase stage in pulp bleaching. *Journal of Hazard Materials* 177, 586-592.