

CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TIEMPO Y DE LA ADICIÓN DE OXÍGENO EN EL SISTEMA LACASA MEDIADOR

RESUMEN

El objetivo de este capítulo es el estudio de la influencia de la adición de oxígeno y del tiempo de tratamiento en una etapa enzimática con el sistema lacasa mediador en pasta de lino a presión atmosférica.

En el presente estudio se realizan bioblanqueos con el sistema lacasa mediador (L) en los que se varía el tipo de adición de oxígeno al sistema y el tiempo de actuación (entre 0,5 y 30 h). Se ha determinado el potencial redox y la concentración de oxígeno disuelto durante los tratamientos. Se evalúa la evolución de las propiedades de la pasta (índice kappa, blancura y viscosidad) después de aplicar la etapa L y la secuencia LE y las propiedades de los efluentes (color y DQO) después de la etapa L.

Los resultados obtenidos indican que se observan dos fases diferenciadas en el biotratamiento, tanto después de aplicar la etapa L como la secuencia LE, una primera fase de deslignificación rápida (entre 0,5 y 5 h) en la que la viscosidad disminuye lentamente y una segunda fase de deslignificación lenta. En el momento en que disminuye la velocidad de deslignificación se produce una disminución rápida de la viscosidad de la pasta, a partir de las 9 h la viscosidad se mantiene prácticamente constante hasta el final del tratamiento.

En cuanto a la blancura de la pasta, se observan diferentes comportamientos después de la etapa L y después de la secuencia LE. Al inicio (0,5 a 2,5 h) la blancura de la pasta después de la etapa L disminuye respecto a la pasta inicial, posteriormente la blancura aumenta rápidamente y se mantiene constante a partir de las 5 h hasta el final del tratamiento. En cambio, la blancura después de la secuencia LE durante todo el tratamiento es superior a la blancura inicial. Se distinguen dos fases diferenciadas, una primera fase de aumento rápido (entre 0,5 y 5 h) y una segunda fase de aumento lento.

El estudio del color de la pasta blanqueada enzimáticamente es novedoso ya que no se han encontrado referencias en la bibliografía sobre análisis de cromaticidad en el blanqueo de pasta con el sistema lacasa mediador. A partir de los resultados del estudio de las coordenadas cromáticas CIE L*a*b* y CIE L*h*C 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. Estos grupos se eliminan posteriormente en la etapa de extracción alcalina.

La adición de oxígeno al sistema influye en las propiedades de la pasta tanto después de aplicar la etapa L como la secuencia LE, así como en las propiedades de los efluentes de la etapa L. En general, la adición de gas oxígeno en el sistema lacasa mediador produce un aumento de la deslignificación y de la blancura, así como también una disminución de la viscosidad para un mismo tiempo de tratamiento respecto a la etapa sin aporte adicional de oxígeno. A partir de los datos anteriores se puede deducir que un aumento en el aporte de oxígeno y una mayor concentración de oxígeno en el sistema tienen influencia en la cinética del proceso.

4.1 INTRODUCCIÓN

En pocos trabajos se han aplicado enzimas oxidativas para el blanqueo de pastas no madereras (Camarero et al. 2002; Camarero et al. 2004; García 2003; Herpöel et al. 2002; Sigoillot et al. 2005) y la mayoría de los estudios cinéticos en la bibliografía tratan la influencia del sistema lacasa mediador en reacciones con los compuestos modelo de la lignina para tiempos cortos de tratamiento (Balakshin et al. 1999; Balakshin et al. 2001b). 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 y no se han encontrado estudios anteriores que describan las propiedades de DQO y color de los efluentes en un sistema lacasa mediador. La caracterización de estos efluentes es relevante debido a los problemas de contaminación asociados a los efluentes industriales de blanqueo y también debido a la posibilidad de cierre de circuitos de blanqueo que ofrecen las secuencias TCF (con un menor contenido en cloruros) respecto a las secuencias ECF.

En estudios anteriores sobre la influencia del tiempo de aplicación del sistema lacasa-mediador en la deslignificación de pasta o en reacciones con compuestos modelo de lignina, algunos autores indican que en dicho proceso existen dos fases diferenciadas (Balakshin et al. 2000a; Balakshin et al. 2001a; García 2003; Potthast et al. 1997). En una primera fase se produce la mayor deslignificación de la pasta, llegando a un valor de índice kappa límite, similarmente a lo que ocurre en tratamientos con ozono. En la segunda fase se produce poca deslignificación pero el consumo de oxígeno sigue

siendo elevado, lo cual indica la presencia de especies químicas activas en el sistema que no reaccionan con la lignina residual presente en la pasta y sí con fragmentos de lignina mediante reacciones secundarias (Balakshin et al. 1999; Balakshin et al. 2000a; Balakshin et al. 2001b; Balakshin et al. 2001a; García 2003; Roncero 2001).

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 (Balakshin et al. 2001a; Bourbonnais et al. 1997; Call and Mücke 1997; Li et al. 1999) y los tratamientos realizados en matraces en los que se burbujea una corriente de oxígeno (Balakshin et al. 1999; Balakshin et al. 2000a; Balakshin et al. 2001b; Camarero et al. 2004; Crestini et al. 2003; Ibarra et al. 2006). En cuanto a la influencia de la concentración de oxígeno en el sistema lacasa mediador, algunos autores indican que cuando el tratamiento se realiza en un reactor a presión, un aumento en la presión de oxígeno produce un aumento de la deslignificación de la pasta (Balakshin et al. 2001b; Call and Mücke 1997). 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 cuando el tratamiento se realiza en el reactor a presión respecto al tratamiento en matraz (Camarero et al. 2004). No obstante, no se ha descrito en la bibliografía la influencia de la adición de oxígeno ni de la concentración de oxígeno disuelto en el medio en la deslignificación de pasta en un sistema lacasa mediador a presión atmosférica.

En el presente trabajo se pretenden identificar y cuantificar aquellos parámetros que pueden influir en la cinética y que pueden ser de interés en el control de un posible proceso de bioblanqueo industrial. En concreto, se estudia la aplicación del sistema lacasa mediador en los procesos de blanqueo de pasta de lino y la influencia de la adición de oxígeno y del tiempo de tratamiento en las propiedades de las pastas (índice kappa, blancura y viscosidad) y de los efluentes (color y DQO) obtenidos. Se miden parámetros como pueden ser el potencial redox del sistema y la concentración de oxígeno disuelto; por lo que para llevar a cabo estas determinaciones se diseña una nueva instalación de bioblanqueo a presión atmosférica.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se indican las materias primas, las condiciones de aplicación de las distintas etapas y los análisis realizados en este capítulo. En el capítulo 2 "Materiales y métodos" se detalla específicamente la metodología con un mayor detalle.

4.2.1 MATERIA PRIMA

La pasta de lino ha sido suministrada por la empresa CELESA, obtenida mediante un proceso de cocción químico NaOH-AQ (sosa-antraquinona). Las características de esta pasta se muestran en la Tabla 4-1.

Por otra parte, la etapa L, sistema lacasa mediador, se aplica tras haber realizado el lavado ácido (W) a la pasta cruda de lino. Este lavado 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. Las propiedades de la pasta inicial son las que se indican en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1. Características de la pasta cruda de lino y de la pasta inicial que se utiliza en el estudio del sistema lacasa mediador a presión atmosférica.

	Pasta cruda lino	Pasta inicial
Índice kappa	11,0	10,1
Blancura (%ISO)	33,6	35,3
Viscosidad (mL·g⁻¹)	970	952

4.2.2 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 en tartrato sódico a pH 4. Se añade Tween 80 como tensoactivo. Las experiencias se llevan a cabo en vasos de precipitados altos de 1 L y a una temperatura constante de 30 °C. Todas las experiencias se realizan con el vaso abierto a 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 (Ls), con aire (Lair) o con oxígeno (Lo). 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. Al final del tratamiento se filtra la pasta y se recogen las lejías para su caracterización. A las pastas obtenidas después de los lavados se les realiza una etapa E y una etapa R, a partir de 5 g y 1 g de pasta respectivamente.

4.2.3 ETAPA DE EXTRACCIÓN ALCALINA (ETAPA E)

A las pastas obtenidas después de la etapa L se les realiza una etapa E de extracción alcalina. 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 Easydye AHIBA de Datacolor. Los tratamientos se efectúan sobre 5 g de pasta al 5 %odp de consistencia. Las condiciones de esta etapa son 1,5 %odp de NaOH durante 120 min a una temperatura de 90 °C.

4.2.4 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. La etapa R se realiza en bolsas de polietileno. Los tratamientos se efectúan sobre 1 g de pasta al 5 %odp de consistencia. Las condiciones de esta etapa son 2 %odp de NaBH₄ durante 30 min a temperatura ambiente.

4.2.5 PROPIEDADES PASTAS

Después de realizar la etapa L y las secuencias LE y LR se caracterizan las muestras, se miden las propiedades de blancura, índice kappa y viscosidad según la normativa ISO correspondiente. Se miden también las coordenadas cromáticas CIE L*a*b* y CIE L*C*h y la reflectancia intrínseca.

4.2.6 PROPIEDADES EFLUENTES

Después de realizar la etapa L se caracterizan los efluentes, se miden las propiedades de color y DQO según las normativas ASTM D1252-00 y ASTM D1209-00.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 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 (Tabla 4-2). 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.

Tabla 4-2. Propiedades de la pasta de lino después de los tratamientos W, E y WE.

	Índice kappa	Blancura (%ISO)	Viscosidad (mL·g ⁻¹)
pasta lino	11,0	33,6	967
W	10,1	36,6	952
E	8,6	35,8	951
WE	8,3	40,5	952

El porcentaje de deslignificación de la pasta se calcula mediante la ecuación Ec. 4-1.

$$\text{porcentaje de deslignificación (\%)} = \frac{IK_o - IK_f}{IK_o} \cdot 100 \quad \text{Ec. 4-1}$$

Donde, IK_o es el valor de índice kappa de la pasta inicial y IK_f es el índice kappa de la pasta después de cada etapa W, E y WE.

Se determina el índice kappa de la pasta tras cada uno de los tratamientos, Fig. 4-1 (a). Se observa 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 índice kappa de 8,3 en WE.

Además, se determina la blancura de la pasta tras cada uno de los tratamientos, Fig. 4-1 (b). Se observa que la etapa W ya 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. La pasta se blanquea durante la etapa E, principalmente por la disolución de la lignina, como lo demuestra la disminución de índice kappa. La etapa W tiene un efecto positivo en la acción de la etapa E.

En cuanto a la viscosidad de la pasta, no se observan diferencias apreciables tras aplicar una etapa W ni disminuye tras realizar una etapa E, indicando que la etapa E por sí sola no degrada la pasta (Fig. 4-1 c).

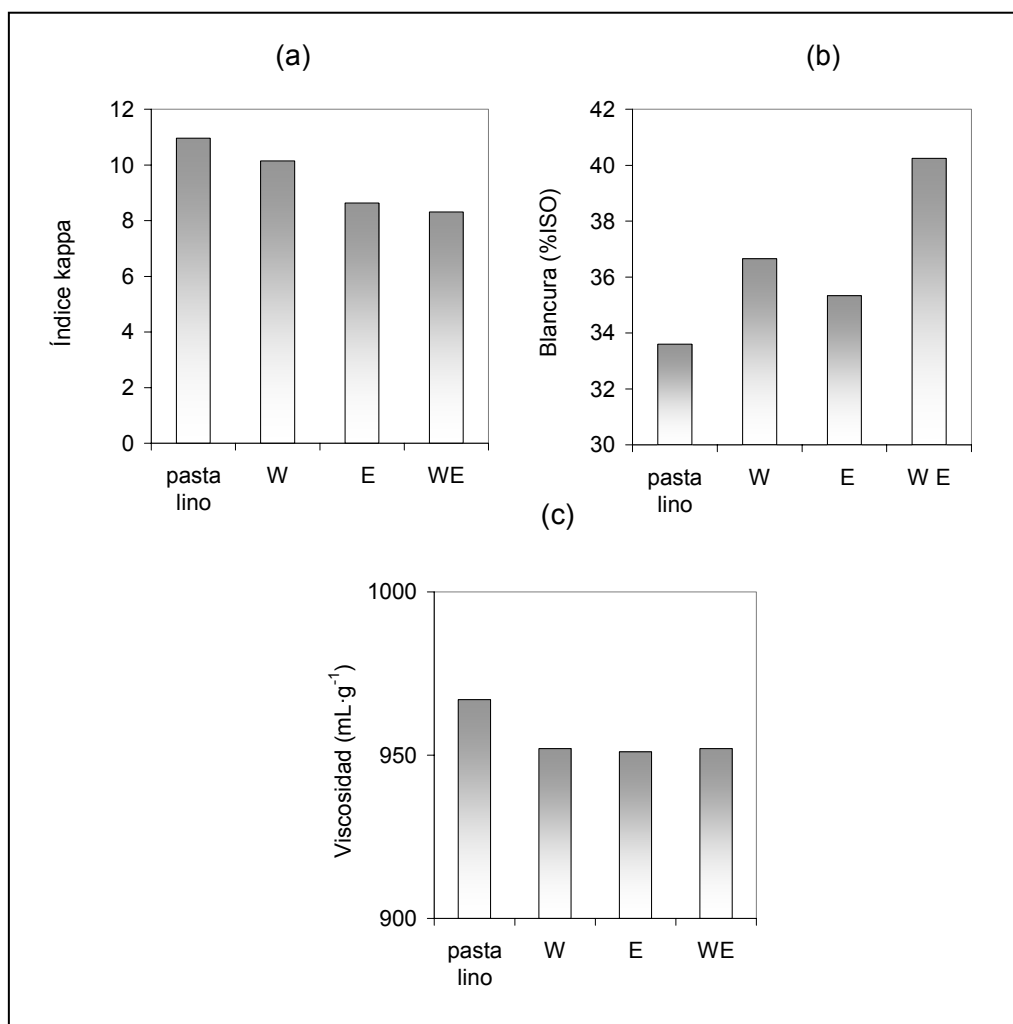


Fig. 4-1. Índice kappa (a), blancura (b) y viscosidad (c) de la pasta tras las etapas W y E.

4.3.2 ESTUDIO CINÉTICO DEL SISTEMA LACASA MEDIADOR

En este apartado se realizan diferentes tratamientos sistema lacasa mediador (L) a la pasta en un vaso de precipitados abierto. En todas las experiencias se adiciona una misma dosis de lacasa y de mediador HBT a la pasta. Para cada tiempo de tratamiento se realizan tres experiencias según el tipo de adición de gas, experiencia sin adición de gas (Ls), con adición de aire (Lair) y con adición de oxígeno (Lo). Los tiempos de tratamiento se varían entre 0,5 y 30 h. Se realizan determinaciones del potencial redox y de la concentración de oxígeno disuelto durante los tratamientos sistema lacasa-mediador. Después de la etapa L se realiza una etapa de extracción alcalina (E).

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

En la Fig. 4-2 se presentan los potenciales redox medidos en el sistema según el reactivo que se adiciona en él. 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, el potencial redox medido es de unos 230 mV. El potencial redox no depende del tipo de adición de gas al sistema. En las tres experiencias, Ls, Lair y Lo, el potencial redox se mantiene constante en torno a 660 mV durante todo el tiempo de tratamiento. El potencial redox de un sistema con el tampón tartrato sódico, enzima lacasa y mediador sin presencia de pasta es algo superior, alrededor de 675 mV. 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.

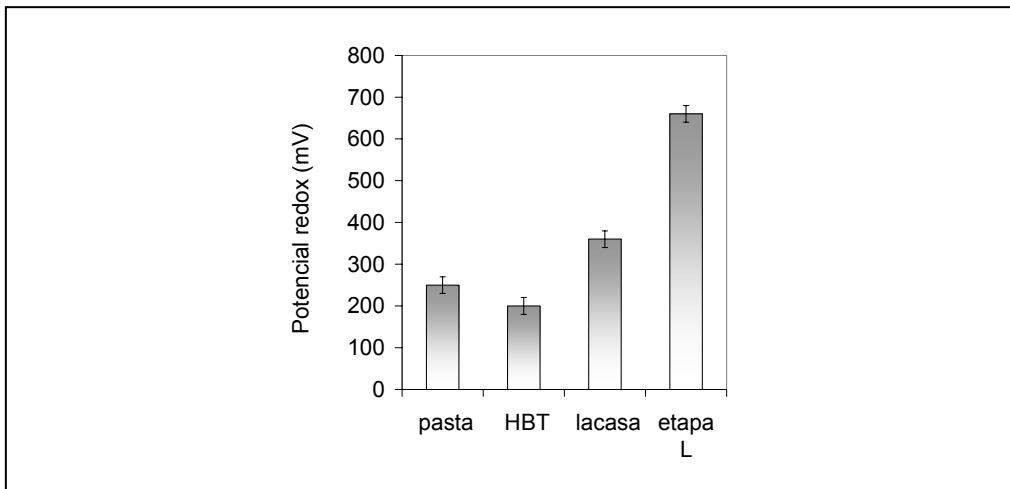


Fig. 4-2. Medidas de potencial redox en los tratamientos L.

En la Fig. 4-3 se presenta la concentración de oxígeno disuelto durante los tratamientos sin adición de gas (Ls) y con adición de aire (Lair). En el tratamiento con adición de oxígeno la concentración de oxígeno es superior a 20 ppm y no se puede medir con el oxímetro que se dispone en el laboratorio. En la Fig. 4-3 (a) se observa que la concentración de oxígeno en el tratamiento sin gas es de 7 ppm antes de añadir los reactivos. Un instante después la concentración disminuye rápidamente hasta llegar a las 4 ppm a los 30 minutos de tratamiento; a partir de este momento la concentración aumenta de nuevo, se alcanzan 5,5 ppm a las 5 h y se llega hasta 6,7

ppm a las 24 h. En el tratamiento con aire (Fig. 4-3 b) se puede observar que la concentración de oxígeno es de 7,5 ppm antes de adicionar los reactivos. Una vez se han introducido los reactivos en el sistema la concentración disminuye hasta 7 ppm y se mantiene durante 0,5 h, posteriormente aumenta hasta que llega a las 8,5 ppm a las 4 h y se mantiene esta concentración hasta el final del ensayo, a las 9 h. En general, es de esperar que cuanto mayor es el aporte de oxígeno en el sistema mayor es la concentración de oxígeno disuelto. 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, cuando el sistema alcanza el equilibrio.

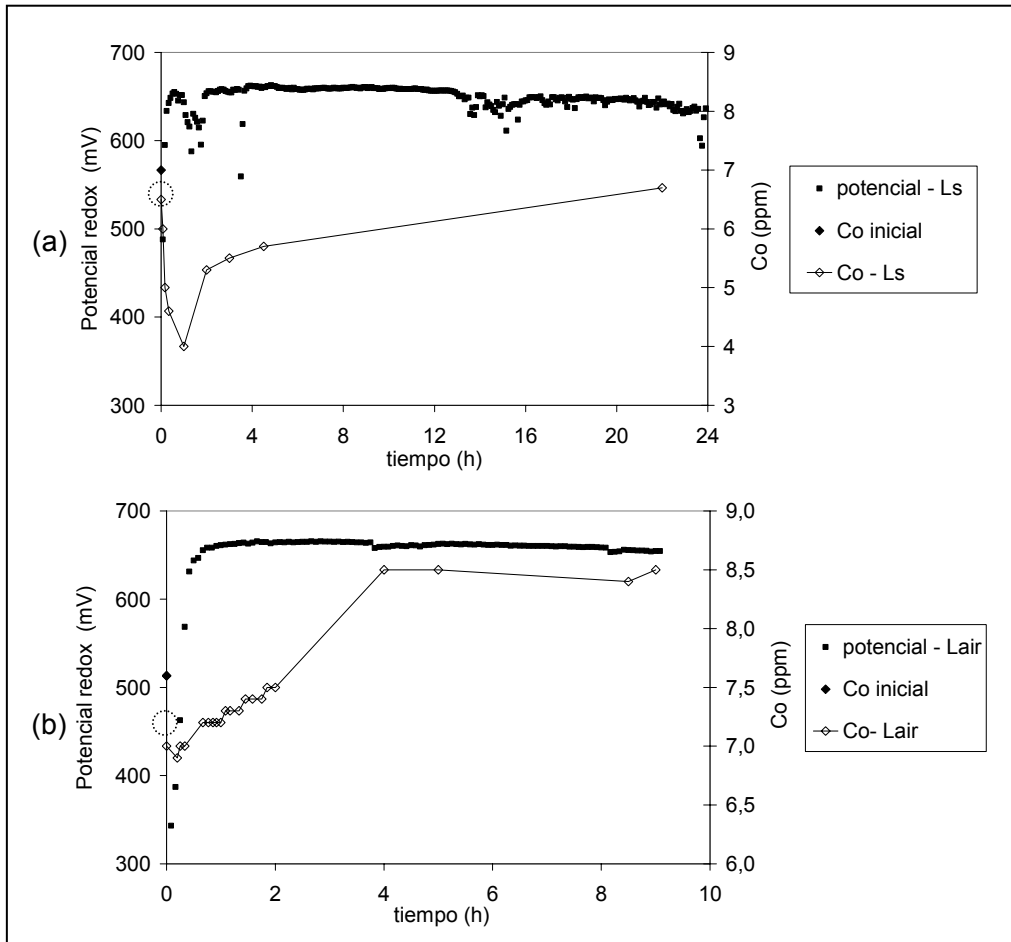


Fig. 4-3. Potencial redox y concentración de oxígeno en las experiencias Ls (a) y Lair (b).

4.3.2.2 Estudio de la variación del índice kappa

En la Tabla 4-3 y la Fig. 4-4 se muestran los valores de índice kappa en las pastas obtenidas tras la etapa L y la secuencia LE.

Índice kappa. Etapa L

En la Tabla 4-3 y la Fig. 4-4 se pueden observar las diferencias de índice kappa entre cada uno de los tres tratamientos para cada tiempo de reacción ensayado después de aplicar la etapa L.

El porcentaje de deslignificación de la pasta se calcula según la ecuación Ec. 4-1, en este caso IK_0 es el valor de índice kappa de la pasta inicial y IK_f es el índice kappa de la pasta después de aplicar la etapa L o la secuencia LE. Los porcentajes de deslignificación obtenidos después de aplicar la etapa L y la secuencia LE se muestran en la Tabla 4-4 y la Fig. 4-5.

Durante las tres primeras horas de tratamiento no se aprecian diferencias significativas entre los tres tratamientos. Sin embargo, a tiempos superiores, a partir de las tres horas, se observan diferencias, obteniéndose que el porcentaje de deslignificación es superior en el tratamiento realizado con aire (Lair) respecto al tratamiento sin introducción de gas (Ls), las diferencias son entre un 3 y un 11 %. Las diferencias en el porcentaje de deslignificación entre el tratamiento Lair y el tratamiento con adición de oxígeno (Lo) son menos significativas, aunque se observa que el porcentaje de deslignificación es algo superior en el tratamiento Lo.

El índice kappa mínimo es de 6,0, consiguiéndose un porcentaje de deslignificación del 41 %, y corresponde al tratamiento con adición de oxígeno a las 30 h, tiempo máximo de tratamiento utilizado.

Índice kappa. Secuencia LE

En la Fig. 4-4 se aprecia una disminución del índice kappa respecto a la pasta inicial desde el inicio del tratamiento. Se puede observar el mismo efecto 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 % (Fig. 4-5 y Tabla 4-4), y una segunda fase de deslignificación más lenta en la que se llega a un valor de índice kappa límite.

El índice kappa mínimo obtenido es de 3,1, consiguiéndose un porcentaje de deslignificación del 70 %, y correspondiente al tratamiento con adición de oxígeno a las 30 h, tiempo máximo de tratamiento utilizado. A diferencia de los resultados obtenidos después de aplicar la etapa L, en la Fig. 4-4 se observa que durante todo el

tratamiento la designificación es superior en las experiencias realizadas con adición de aire y oxígeno (LairE y LoE) respecto al tratamiento sin adición de gas (LsE). En el tratamiento LsE el índice kappa límite (4,5) se obtiene a las 30 h de tratamiento, mientras que en LoE se obtiene a las 9 horas de tratamiento.

Tabla 4-3. Resultados de índice kappa en la etapa L y la secuencia LE.

tiempo (h)	Etapa L			Secuencia LE		
	Ls	Lair	Lo	LsE	LairE	LoE
0,5	8,8 ± 0,3	9,0 ± 0,1	8,9 ± 0,2	6,8 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,1 ± 0,3
1	8,8 ± 0,2	8,4 ± 0,2	9,0 ± 0,3	7,0 ± 0,2	6,4 ± 0,2	5,3 ± 0,1
1,5	8,7 ± 0,1	8,7 ± 0,1	8,7 ± 0,1	-	6,1 ± 0,3	5,4 ± 0,1
2	9,0 ± 0,2	9,0 ± 0,3	8,7 ± 0,1	6,7 ± 0,2	6,5 ± 0,2	5,6 ± 0,3
2,5	8,8 ± 0,1	8,4 ± 0,3	8,5 ± 0,2	6,4 ± 0,2	6,2 ± 0,1	5,4 ± 0,2
3	8,7 ± 0,2	8,1 ± 0,2	8,2 ± 0,1	6,4 ± 0,3	6,0 ± 0,2	5,4 ± 0,2
4	8,7 ± 0,2	8,1 ± 0,1	8,2 ± 0,2	6,2 ± 0,3	5,0 ± 0,1	5,0 ± 0,2
5	8,2 ± 0,2	7,6 ± 0,1	8,0 ± 0,0	6,1 ± 0,1	4,6 ± 0,0	4,8 ± 0,0
9	-	-	-	6,0 ± 0,2	-	4,5 ± 0,2
16	8,6 ± 0,0	7,5 ± 0,6	7,0 ± 0,2	4,8 ± 0,8	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,2
24	8,2 ± 0,1	7,1 ± 0,0	6,6 ± 0,1	5,5 ± 0,2	4,0 ± 0,1	3,8 ± 0,2
30	7,6 ± 0,2	6,9 ± 0,1	6,0 ± 0,2	4,5 ± 0,1	3,9 ± 0,1	3,1 ± 0,2

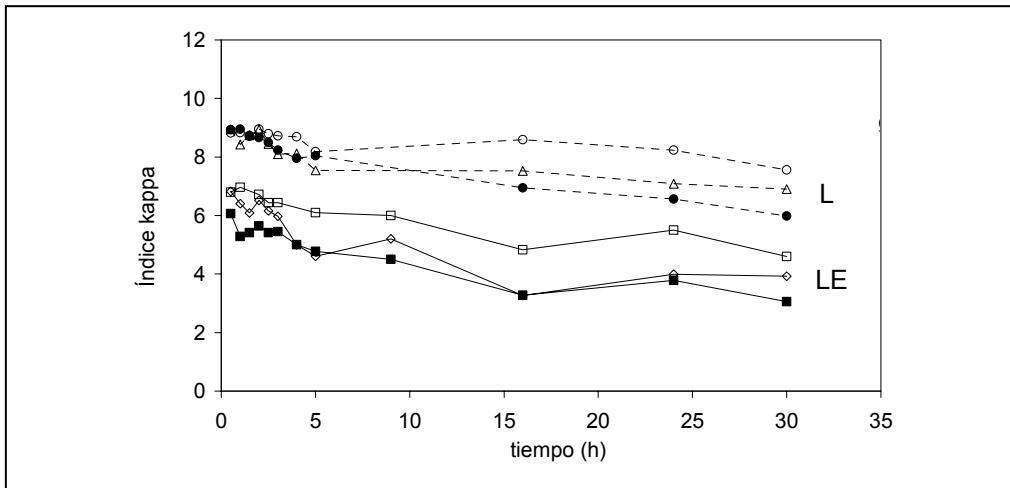


Fig. 4-4. Índice kappa después de aplicar la etapa L y la secuencia LE en función del tiempo. En la figura, Ls(○), Lair(Δ), Lo(●), LsE(□), LairE(◇) y LoE(■).

En la Tabla 4-4 se observa que las diferencias en el porcentaje de designificación entre el tratamiento LairE y el tratamiento LoE son menos significativas que las diferencias entre LsE y los tratamientos LairE y LoE a tiempos largos de tratamiento,

aunque se observa que el porcentaje de deslignificación es, en general, ligeramente superior en el tratamiento LoE. En cambio, sí se observan diferencias apreciables entre ambos tratamientos al inicio del tratamiento, el tratamiento con adición de oxígeno (LoE) presenta valores inferiores de índice kappa respecto al tratamiento con adición de aire (LairE) a un mismo tiempo de tratamiento durante las primeras 3 horas.

Tabla 4-4. Porcentajes de deslignificación después de aplicar la etapa L y la secuencia LE.

tiempo (h)	Etapa L			Secuencia LE		
	Ls	Lair	Lo	LsE	LairE	LoE
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

El hecho de que se llegue a un índice kappa límite, a partir del cual un aumento del tiempo de tratamiento no supone una mayor deslignificación, ya se ha observado en trabajos anteriores (Balakshin et al. 1999; Balakshin et al. 2000b; Balakshin et al. 2001b; Camarero et al. 2004) por lo 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 (García 2003; Ibarra et al. 2006), a la oxidación del HBT a su forma no activa (Li et al. 1998; Potthast et al. 2001), a la acumulación de fragmentos oxidados de la lignina de alta reactividad y 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, permite una mayor oxidación de la lignina presente en la pasta, por lo que el índice kappa límite al final del tratamiento es más bajo (1,2 puntos de índice 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 índice kappa respecto al tiempo en el tratamiento Lo respecto al Lair. El índice 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.

El hecho de que el incremento del aporte de oxígeno en el sistema produzca una disminución en el índice kappa límite y por tanto una disminución de la cantidad de lignina residual en la pasta, sugiere que el valor de índice kappa límite está fuertemente relacionado con factores físicos, de difusión de reactivos en la pasta (Balakshin et al. 2001b; Call and Mücke 1997).

Índice kappa. Comparación etapa L y secuencia LE

El efecto principal de la extracción alcalina en los procesos de blanqueo industrial es la disolución de la lignina, que tiene lugar por la ionización de los grupos ácidos formados en la lignina durante las etapas previas (Dence and Reeve 1996). En todos los tratamientos la aplicación de una etapa E aumenta el porcentaje de deslignificación respecto a la etapa L (Fig. 4-5). En la Fig. 4-4 se observa que la forma de las curvas de índice kappa en función del tiempo son similares en todos los tratamientos, tanto después de la etapa L como de la secuencia LE.

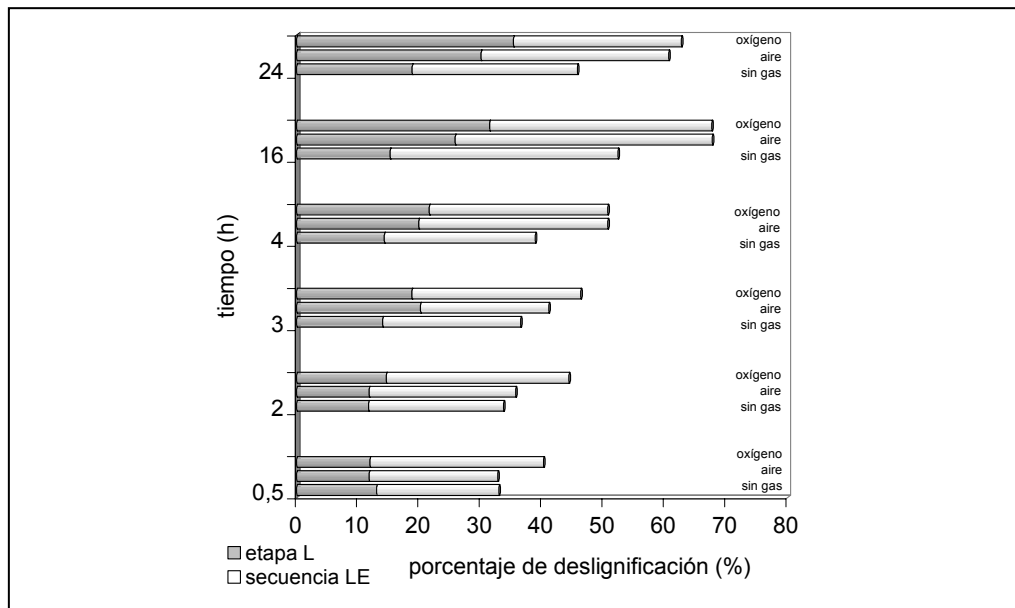


Fig. 4-5. Porcentaje de deslignificación después de aplicar la etapa L y la secuencia LE.

Si se realiza una etapa E a la pasta inicial (sin etapa L) se produce una disminución del índice 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 índice kappa de la pasta tratada después de la secuencia LE respecto al índice kappa obtenido tras la etapa L es superior durante todo el tratamiento a 1,8 (Tabla 4-5). 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. El sistema lacasa mediador produce la formación de grupos carbonilo y carboxilo (Ibarra et al. 2005) en la estructura de la lignina, estos últimos hacen que la lignina sea más hidrofílica y que se pueda disolver en una etapa alcalina posterior (Chakar and Ragauskas 2000a; Poppius-Levlin et al. 1999), por lo que es necesario aplicar dicha etapa alcalina posterior para extraer la lignina que ha modificado el sistema enzimático (Call and Mücke 1997).

Tabla 4-5. Diferencias de índice kappa entre la etapa L y la secuencia LE.

tiempo (h)	Δ índice kappa		
	Ls - LsE	Lair-LairE	Lo - LoE
inicial	1,8	1,8	1,8
0,5	2,0	2,1	2,9
1	1,9	2,0	3,7
1,5	-	2,7	3,3
2	2,2	2,4	3,0
2,5	2,4	2,3	3,1
3	2,3	2,1	2,8
4	2,5	3,3	2,3
5	2,1	2,9	3,3
16	3,8	4,3	3,7
24	2,7	3,1	2,8
30	3,0	3,0	2,9

Las diferencias de índice kappa entre la etapa L y la secuencia LE aumentan ligeramente al aumentar el tiempo de tratamiento, hasta una unidad de índice kappa, Tabla 4-5 y Fig. 4-6. Por otro lado, la disminución de índice kappa en la etapa L puede llegar hasta dos unidades de índice kappa, Tabla 4-3, por lo que la etapa L elimina más lignina que aquella que es capaz de modificar y es susceptible de eliminarse en la siguiente etapa de extracción alcalina. Las pastas del tratamiento LoE son las que presentan una mayor disminución del índice kappa al aplicar la etapa E en la secuencia LE a tiempos cortos de tratamiento, Tabla 4-5 y Fig. 4-6, por lo que la presencia de una mayor cantidad de oxígeno en el tratamiento hace aumentar la capacidad del sistema lacasa mediador de modificar la lignina presente en la pasta en mayor medida que la capacidad de eliminar lignina en esta etapa de tratamiento enzimático.

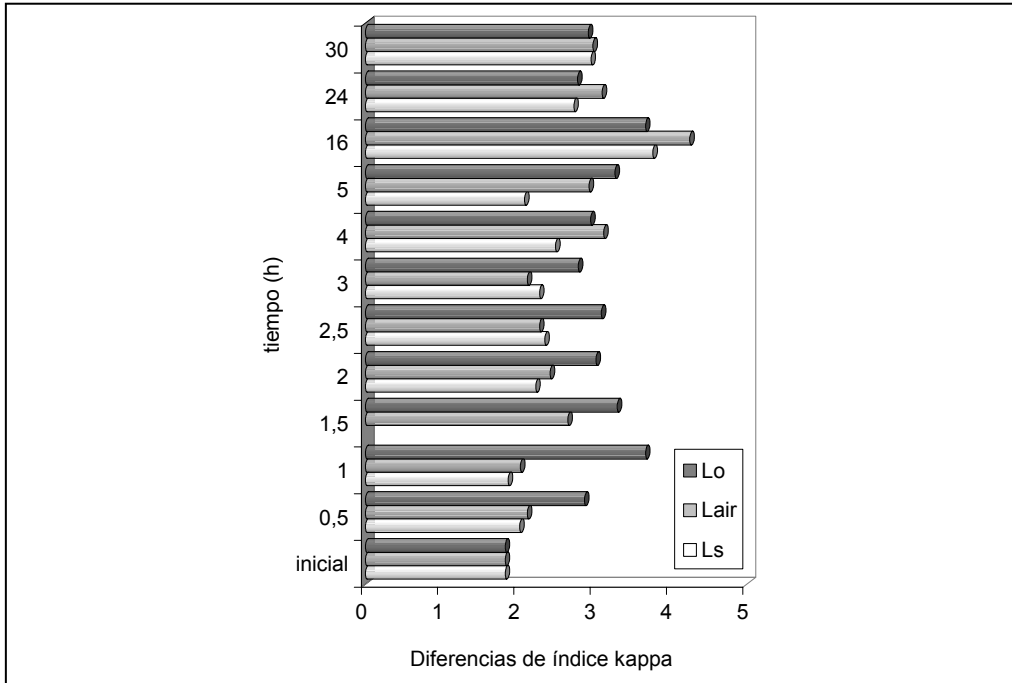


Fig. 4-6. Diferencias de índice kappa después de la etapa E en la pasta inicial y en LE.

4.3.2.3 Estudio de la variación de la blancura

En la Fig. 4-7 y la Tabla 4-6 se muestran los resultados de blancura en las pastas obtenidas tras una etapa L y una secuencia LE.

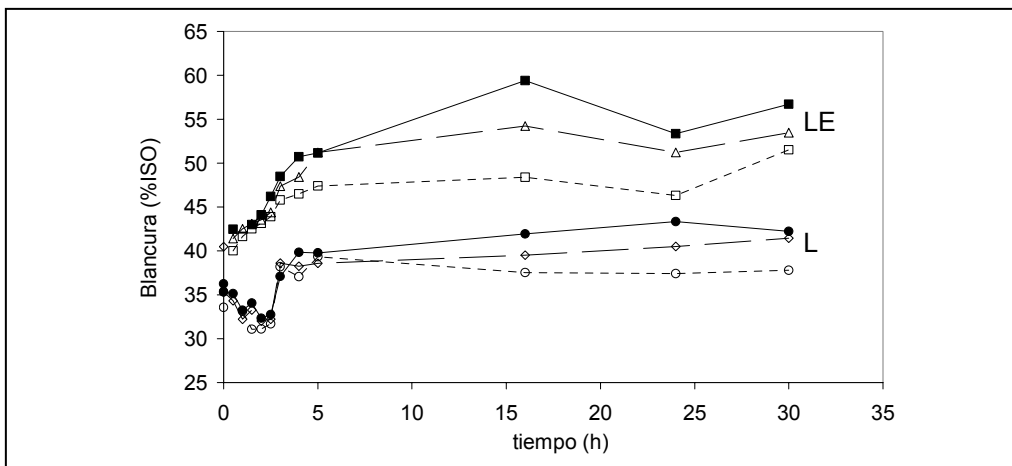


Fig. 4-7. Blancura en función del tiempo de tratamiento después de las secuencias L y LE. En las figuras, Ls(◻), Lair (▲), Lo (●), LsE (◻), LairE (◊) y LoE (■).

Tabla 4-6. Resultados de blancura (%ISO) en la etapa L y la secuencia LE.

tiempo (h)	Etapa L			Secuencia LE		
	Ls	Lair	Lo	LsE	LairE	LoE
0,5	37,7	34,3	35,1	40,0	41,4	42,5
1	33,1	32,2	33,2	41,6	42,5	45,2
1,5	31,1	33,3	34,1	42,5	43,1	43,0
2	31,1	32,0	32,3	43,1	43,5	44,1
2,5	31,7	32,2	32,7	43,9	44,4	46,2
3	38,2	38,6	37,1	45,8	47,4	48,5
4	37,1	38,3	39,8	46,5	48,4	50,7
5	39,3	38,6	39,8	47,4	51,2	51,2
16	37,5	39,5	41,9	48,4	54,2	59,4
24	37,4	40,5	43,4	46,3	51,2	53,4
30	37,8	41,4	42,2	51,5	53,5	56,7

Blancura. Etapa L

En la Fig. 4-7 se observa que las curvas en los tres tratamientos, Ls, Lair y Lo son similares. Al inicio del tratamiento se produce una disminución de la blancura respecto a la blancura de la pasta inicial, a partir de las 2,5 horas la blancura aumenta rápidamente hasta llegar a un valor prácticamente constante y superior a la blancura de la pasta inicial a partir de las 3 h de tratamiento. Durante las primeras cinco horas de tratamiento no se observan diferencias apreciables entre los tratamientos Ls, Lair y Lo. A partir de las 16 h se puede observar que el tratamiento Lo es el que permite obtener grados de blanco más elevados, seguido del tratamiento Lair. Las diferencias de blancura entre los tratamientos Ls y Lair y entre postratamientos Lair y Lo son del orden de 2 unidades %ISO (Tabla 4-7). Aunque el índice kappa es similar entre Lair y Lo, la lignina es más blanca en Lo.

Blancura. Secuencia LE

Desde el inicio del tratamiento se aprecia un aumento de la blancura respecto a la de la pasta inicial. Durante las 5 primeras horas la blancura aumenta de forma rápida. A las 16 h se alcanza el grado máximo de blanco, a partir de este momento la blancura prácticamente se mantiene constante hasta las 30 h de tratamiento. Al igual que en el índice kappa, se pueden observar dos fases en el sistema, en una primera fase rápida, durante las 5 primeras horas de tratamiento, la blancura aumenta unas 10 unidades %ISO; en una segunda fase más lenta se llega al máximo valor de blancura. De manera similar a lo que se observa en la pasta obtenida después de una etapa L, al inicio del tratamiento no se observan diferencias apreciables entre los tratamientos LsE, LairE y LoE (Tabla 4-7), en cambio, a tiempos largos se puede observar que el

tratamiento LoE es el que permite obtener grados de blanco más elevados, seguido del tratamiento LairE. Aunque en las pastas obtenidas mediante la secuencia LE las diferencias de blancura entre los tratamientos se aprecian a partir de las 4 h y son superiores a las diferencias observadas en la etapa L. Las diferencias entre los tratamientos LsE y LairE y entre postratamientos LairE y LoE se encuentran entre 2 y 5 unidades %ISO.

Tabla 4-7. Diferencias de blancura entre los tratamientos.

tiempo (h)	Etapa L			Secuencia LE		
	Lair - Ls	Lo - Ls	Lo - Lair	LairE - LsE	LoE - LsE	LoE - LairE
0,5	-	-	0,8	1,4	2,5	1,1
1	-0,9	0,1	1,0	0,9	-	-
1,5	2,2	3,0	0,8	0,6	0,5	-0,1
2	0,9	1,2	0,3	0,4	1,0	0,6
2,5	0,5	1,0	0,5	0,5	2,3	1,8
3	0,4	-1,1	-1,5	1,6	2,7	1,1
4	1,2	2,8	1,6	1,9	4,2	2,3
5	-0,8	0,4	1,2	3,8	3,8	-0,1
16	2,0	4,4	2,4	5,8	11,0	5,2
24	3,1	6,0	2,9	4,9	7,1	2,1
30	3,7	4,5	0,8	2,0	5,2	3,2

Blancura. Comparación etapa L y secuencia LE

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. 4-7, Fig. 4-8 y Tabla 4-8). Los resultados de blancura obtenidos tienen un comportamiento distinto en función del tiempo según se aplica la etapa L o la secuencia LE. La secuencia LsE aumenta la blancura respecto a la etapa Ls hasta un 38 % (12 unidades %ISO), la etapa LairE aumenta la blancura respecto a la etapa Lair hasta un 41% (14 unidades %ISO) y la etapa LoE aumenta la blancura respecto a Lo hasta un 51% (17 unidades %ISO).

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 (Tabla 4-8).

Tabla 4-8. Diferencias de blancura entre la etapa L y la secuencia LE.

tiempo (h)	LsE - Ls (%ISO)	LairE - Lair (%ISO)	LoE - Lo (%ISO)
inicial	5	5	5
0,5	-	7	7
1	9	10	-
1,5	11	10	9
2	12	12	12
2,5	12	12	13
3	8	9	11
4	9	10	11
5	8	13	11
16	11	15	17
24	9	11	10
30	14	12	14

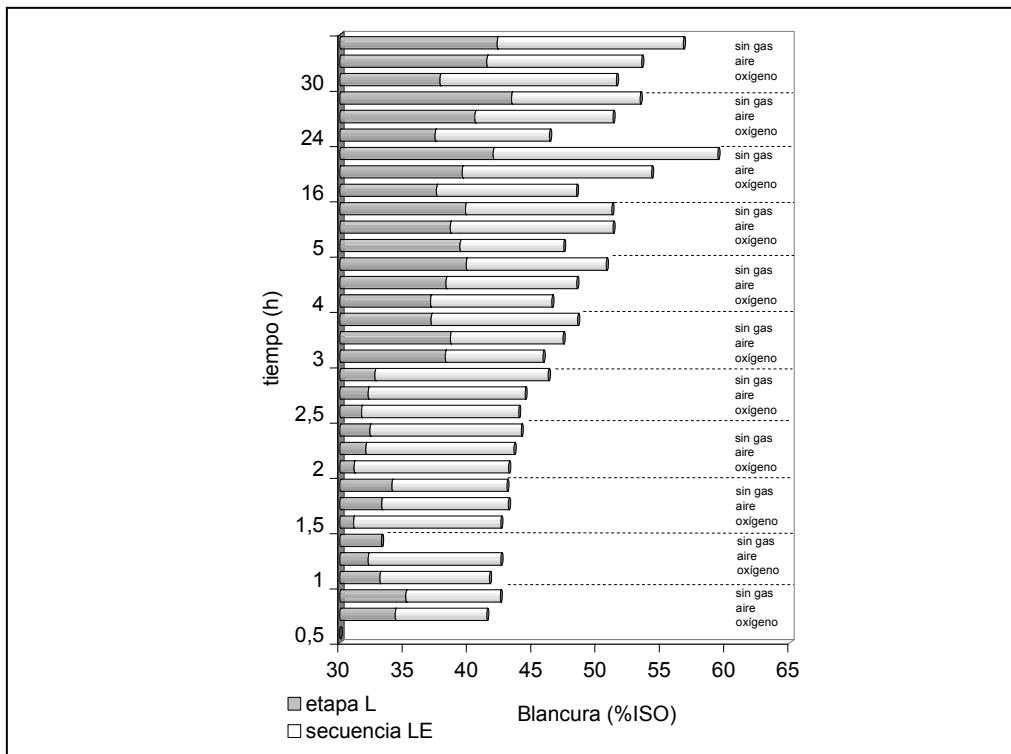


Fig. 4-8. Aumento de blancura después de la etapa L y la secuencia LE.

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 2000b;Freudenreich et al. 1998). Sin embargo,

estudios anteriores en pasta de lino no predicen una disminución de blancura de la pasta después de la etapa L. 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 durante la biodegradación de lignina (Camarero et al. 1997;García 2003), también la formación de quinonas durante la reacción lacasa-HBT con compuestos modelo de lignina (Crestini and Argyropoulos 2001) y el incremento de la señal de espectroscopia FTIR correspondiente a grupos carbonilo en ligninas aisladas de pastas tratadas con el sistema lacasa-HBT (Crestini et al. 2003;Ibarra et al. 2005;Poppius-Levlin et al. 1999). Estas estructuras formadas en la lignina se eliminarían en el tratamiento alcalino posterior (Srebotnik and Hammel 2000) que se traduce en un aumento de blancura después de la etapa E

4.3.2.4 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 $L^*a^*b^*$ y CIE L^*h^*C y las curvas espectrofotométricas de las pastas obtenidas después de la etapa L y la secuencia LE (Tabla 4-9, Fig. 4-9 y Fig. 4-10). El estudio del color de la pasta blanqueada enzimáticamente es novedoso ya que no se han encontrado referencias en la bibliografía sobre el estudio de las coordenadas cromáticas ni de las curvas espectrofotométricas de color en el blanqueo de pasta con el sistema lacasa mediador.

El espacio CIE $L^*a^*b^*$ se define como un espacio tridimensional basado en colores opuestos. La coordenada L^* (Lightness) indica la cantidad de luz que tiene un determinado color, si la pasta es más clara u oscura. La coordenada a^* positiva indica color rojo, si es negativa, color verde; la coordenada b^* positiva indica color amarillo, si es negativa color azul. En el espacio CIE L^*C^*h el valor de C^* viene determinado por el módulo del vector que formado por a^* y b^* , 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.

En todos los tratamientos las coordenadas cromáticas a^* y b^* son positivas (Tabla 4-9), por lo que un aumento de la coordenada a^* y b^* supone un aumento del color rojo y amarillo respectivamente. De igual forma un aumento en el ángulo h supone un cambio de color, pérdida de color rojo en favor del color amarillo.

Tabla 4-9. Coordenadas cromáticas CIE L^{*}·a^{*}·b^{*} de las pastas obtenidas después de la etapa L y la secuencia LE.

tiempo (h)	Etapa L						Secuencia LE					
	muestra	L*	a*	b*	C*	h	muestra	L*	a*	b*	C*	h
-	inicial	73,0	1,6	13,0	13,0	83,0	inicial E	77,0	1,7	14	14	83,0
1	Ls	74,0	3,2	16,3	16,6	79,0	Ls E	79,0	1,7	14,8	15	83,5
1	Lair	74,0	3,2	16,2	16,6	79,0	Lair E	-	-	-	-	-
1	Lo	74,0	3,4	16,9	17,2	78,8	LoE	80,8	1,5	13,8	13,9	83,9
1,5	Lo	-	-	-	-	-	LoE	79,6	1,6	14,2	14,3	83,7
2	Ls	71,4	3,1	15,9	16,2	78,9	Ls E	79,5	1,5	14	14,1	84,0
2	Lair	72,8	3,1	16,1	16,4	79,0	Lair E	79,8	1,6	14,3	14,4	83,7
2	Lo	72,7	3,1	16,0	16,3	79,0	LoE	80,2	1,5	13,9	14	84,0
3	Ls	78,0	3,3	16,8	17,1	79,0	LsE	81,4	1,2	13,9	13,9	85,0
3	Lair	77,6	2,9	16,2	16,5	79,8	LairE	82,0	1,2	13,5	13,6	85,0
3	Lo	76,8	3,1	16,3	16,6	79,1	LoE	82,3	1,1	12,9	12,9	85,2
5	Ls	78,0	3,0	16,0	16,4	79,5	LsE	83,4	0,7	12,7	12,7	86,0
5	Lair	78,0	3,0	16,0	16,4	79,5	LairE	84,0	0,9	12,7	12,7	86,0
5	Lo	78,8	3,2	16,7	17,0	79,2	LoE	83,8	0,84	12,4	12,4	86,1
16	Ls	76,9	2,5	15,8	16	80,9	Ls E	82,0	0,9	12,4	12,4	85,6
16	Lair	78,35	2,4	16,3	16,5	81,7	Lair E	84,7	0,7	10,9	10,9	86,2
16	Lo	79,6	1,9	15,5	15,6	83,1	LoE	87,0	0,31	9,7	9,7	88,2
24	Ls	78,0	2,5	15,8	16	81,0	Ls E	80,9	1,2	12,7	12,7	84,7
24	Lair	79,5	2,8	17,0	17,3	80,6	Lair E	83,4	0,86	11,7	11,7	85,8
24	Lo	80,6	2,0	15,5	15,7	82,5	LoE	84,2	0,7	10,8	10,8	86,3
30	Ls	77,1	2,8	16,6	16,8	80,3	Ls E	83,8	0,91	11,2	11,2	85,4
30	Lair	79,6	2,6	16,1	16,3	80,8	Lair E	84,4	0,91	11,2	11,2	85,4
30	Lo	80,2	2,4	16,2	16,3	81,7	LoE	86,0	0,72	10,6	10,6	86,1

La pasta inicial presenta unos valores de las coordenadas cromáticas L*, a*, b*, C* y h de 73; 1,6; 13; 13 y 83, respectivamente. La pasta inicial E presenta unos valores de las coordenadas cromáticas L*, a*, b*, C* y h de 77, 1,7, 14, 14 y 83 respectivamente. Las coordenadas a*, b*, 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 de color en 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 índice kappa de la pasta inicial.

Coordenadas CIE L*a*b*

En la Fig. 4-9 (a y b) y la Tabla 4-9 se observa como después de la etapa L los valores de las coordenadas a^* y b^* son superiores a las coordenadas de la pasta inicial durante todo el tiempo de tratamiento, la pasta adquiere un color más intenso. Este aumento en el color se produce de manera muy rápida durante la primera hora de tratamiento. Los valores de las coordenadas a^* y b^* después de la secuencia LE son inferiores a los obtenidos después de la etapa L, por lo que la etapa de extracción alcalina elimina el color adquirido en la etapa L. La coordenada a^* en la secuencia LE es inferior en todo el tratamiento a la coordenada a^* de la pasta inicial; mientras que la coordenada b^* al inicio del tratamiento es algo superior a la de la pasta inicial.

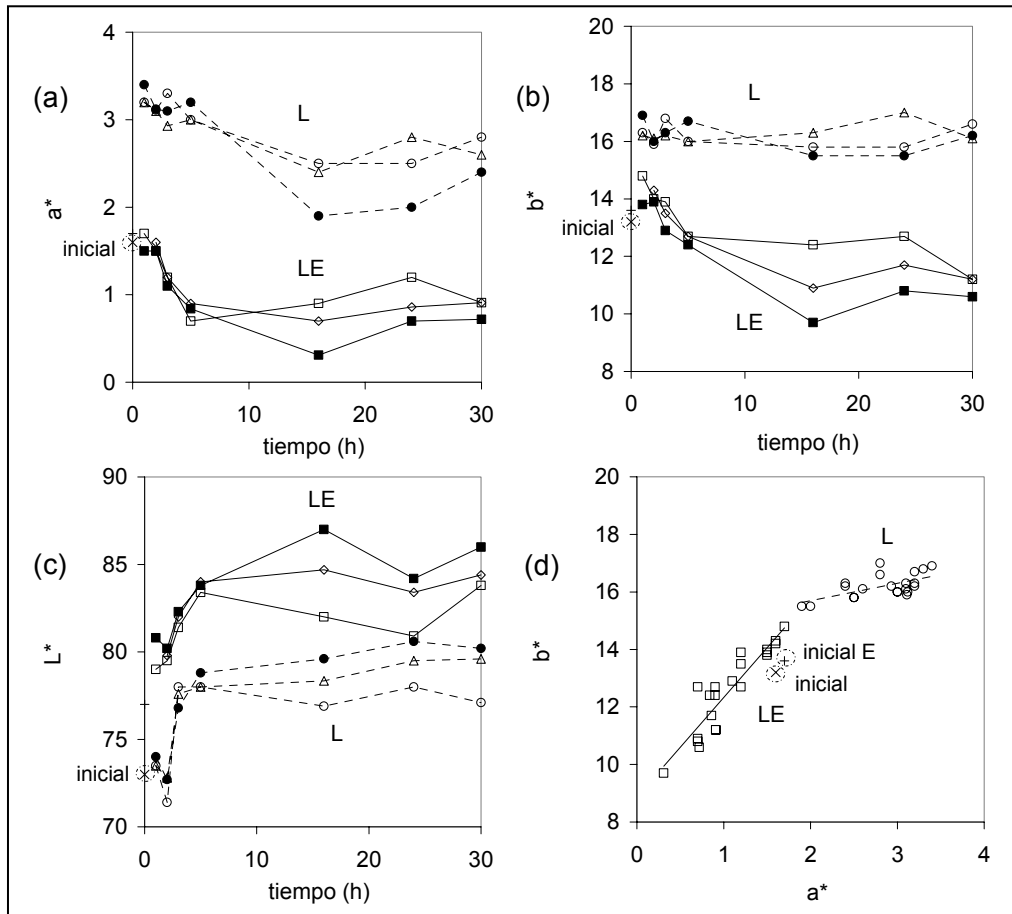


Fig. 4-9. Coordenadas CIE L*a*b* de las pastas obtenidas en la etapa L y la secuencia LE en función del tiempo de tratamiento (a, b y c). En las figuras pasta inicial (x), Ls(o), Lair (Δ), Lo (●), LsE (□), LairE (◇) y LoE (■). Relación entre las coordenadas a^* y b^* (d). En la figura, pasta inicial (x), pasta inicial E (+), L(o) y LE (□).

La coordenada b^* (color amarillo) en la etapa L se mantiene prácticamente constante durante todo el tiempo de tratamiento; en cambio, a medida que aumenta el tiempo de tratamiento disminuye el valor de la coordenada cromática a^* (color rojo). En general, en la secuencia LE ambas coordenadas (a^* y b^*) disminuyen al aumentar el tiempo de tratamiento. Se observan dos fases en el sistema, una fase de disminución rápida de ambas coordenadas cromáticas, a partir de las 5 h las coordenadas se mantienen prácticamente constantes y se observa un ligero aumento al final del tratamiento.

La coordenada L^* (Fig. 4-9 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. En la Fig. 4-9 se observan diferencias en las coordenadas cromáticas CIE $L^*a^*b^*$ entre los tres tratamientos según el tipo de adición de oxígeno al sistema.

Coordenadas CIE L^*C^*h

En las figuras Fig. 4-10, Fig. 4-11 y en la Tabla 4-9 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, la pasta tras el tratamiento enzimático presenta un color más intenso que la inicial.

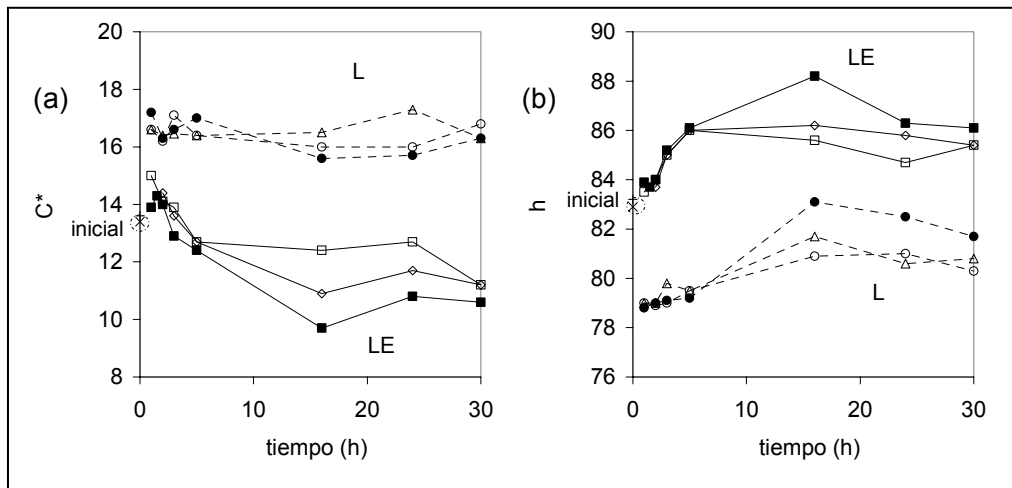


Fig. 4-10. Coordenadas CIE L^*C^*h de las pastas obtenidas en la etapa L y la secuencia LE en función del tiempo de tratamiento. En las figuras pasta inicial (x), Ls(o), Lair (Δ), Lo (●), LsE (□), LairE (◇) y LoE (■).

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. 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 adquiridas durante el tratamiento enzimático (Fig. 4-11).

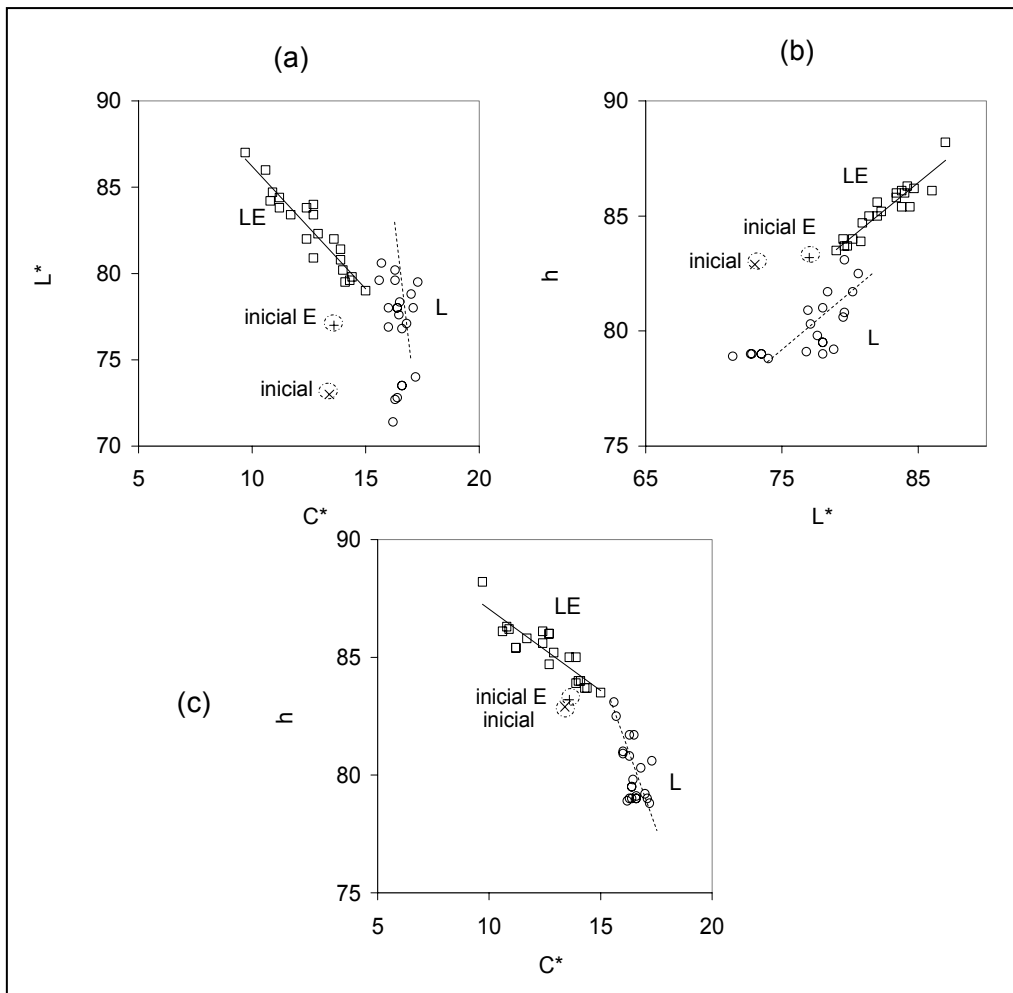


Fig. 4-11. Relación entre las coordenadas CIE $L^*C^* h$. En las figuras pasta inicial (x), pasta inicial E (+), L(o) y LE (□).

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 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, 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 , disminuye a^* , pero la coordenada b^* se mantiene constante). Sin embargo, durante la secuencia LE, el aumento 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 y disminuye a^* y b^*).

Curvas de reflectancia

Las curvas espectrofotométricas de las pastas de la etapa L (Fig. 4-12) 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 Fig. 4-12 (a) 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.

El índice k/s permite evaluar la cantidad de grupos cromóforos presentes en una pasta. En la Fig. 4-14 (a) se observa como las experiencias L_0 entre 1 y 2,5 h presentan una mayor cantidad de cromóforos que la pasta inicial. A partir de las 3 h la cantidad de cromóforos ya es inferior a la inicial. Las pastas obtenidas en la secuencia LE presentan una menor cantidad de cromóforos que la inicial y que la inicial E (Fig. 4-14 b y c).

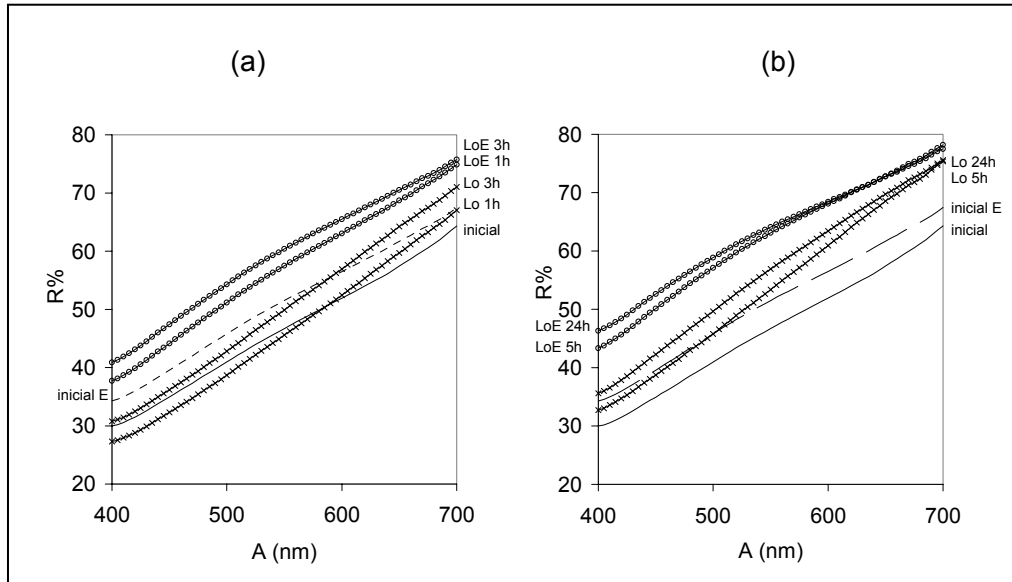


Fig. 4-12. Curvas de reflectancia (R%) de las pastas inicial e inicial E, experiencias Lo y LoE a tiempos de 1 h y 3 h (a) y 5 h y 24 h (b). En las figuras, inicial (línea continua), inicial E (línea discontinua), Lo (x) y LoE (o).

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, tal como se muestra en la Fig. 4-13. 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.

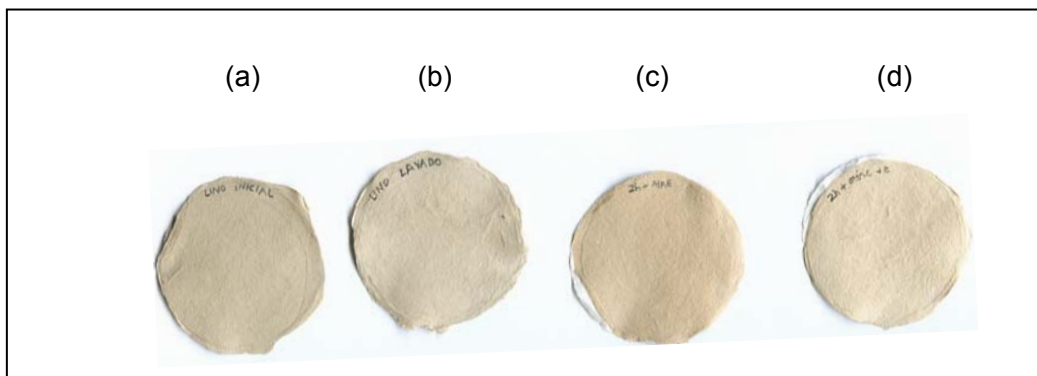


Fig. 4-13. Formetas correspondientes a la pasta cruda de lino (a), inicial (b) y las pastas obtenidas a las 2 h de tratamiento después de Lair (c) y LairE (d).

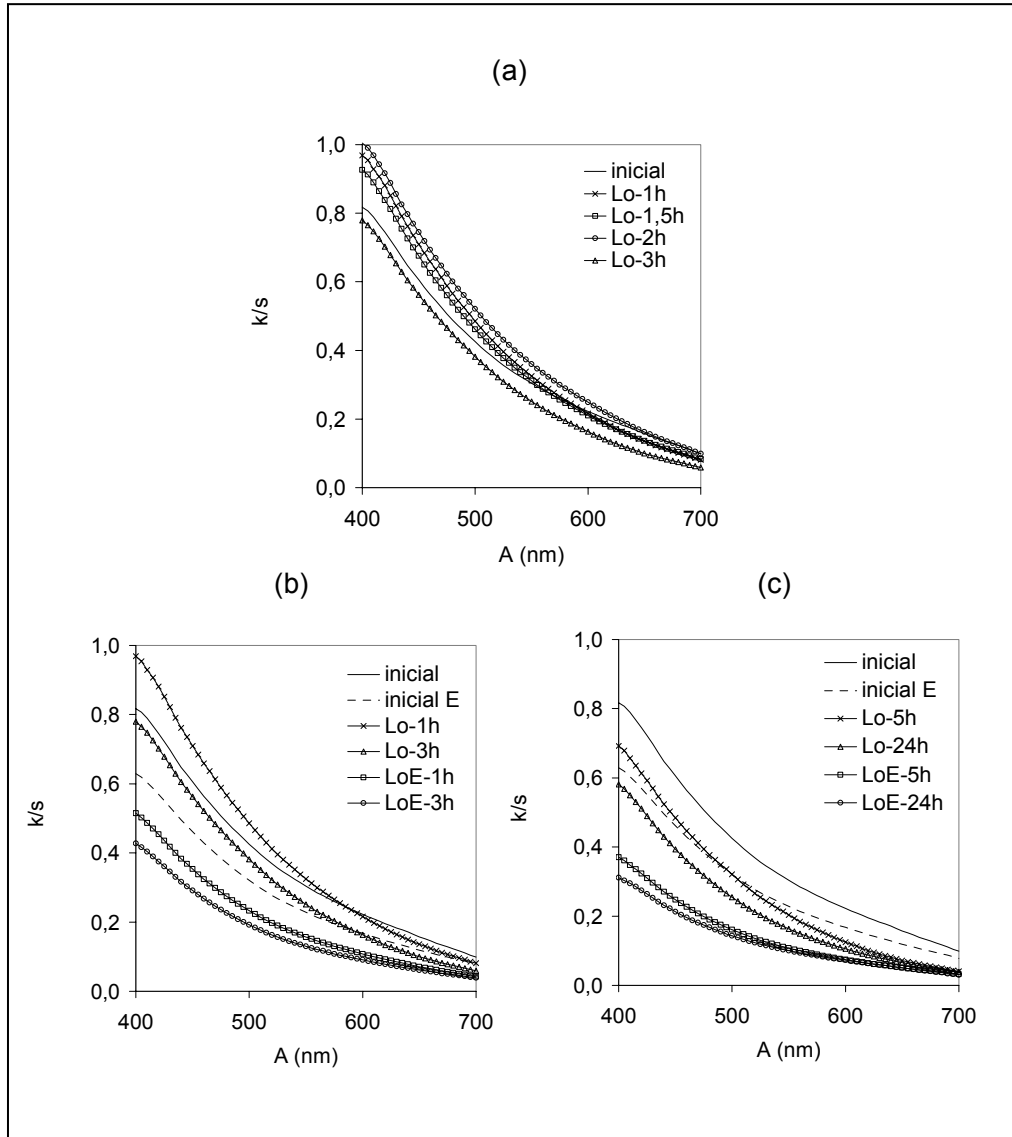


Fig. 4-14. Curvas k/s de las experiencias Lo y LoE. Experiencias inicial y Lo a 1; 1,5; 2 y 3 h (a), experiencias Lo y LoE a 1 y 3 h (b) y experiencias Lo y LoE a 5 y 24 h (c). En las figuras inicial (línea continua), inicial E (línea discontinua).

4.3.2.5 Estudio de la variación de la viscosidad

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 (Dence and Reeve 1996; Rochefort et al. 2004).

El comportamiento de la viscosidad en función del tiempo es similar en los tres tratamientos, tanto después de la etapa L como de la secuencia LE, Tabla 4-10 y Fig. 4-15. Se observa una ligera disminución de la viscosidad de la pasta inicial durante las cuatro primeras horas de tratamiento. A partir de ese momento se observa una disminución de la viscosidad de más de $100 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ hasta las 9 h, para mantenerse prácticamente constante hasta el final del tratamiento en que se produce una ligera disminución.

Tabla 4-10. Viscosidad ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$) de la pasta tras aplicar la etapa L y la secuencia LE.

Tiempo (h)	Etapa L			Secuencia LE		
	Ls	Lair	Lo	LsE	LairE	LoE
0,5	991 ± 12	988 ± 12	982 ± 3	967 ± 15	945 ± 4	944 ± 4
1	986 ± 8	982 ± 11	976 ± 14	961 ± 17	935 ± 16	944 ± 12
1,5	988 ± 8	978 ± 4	978 ± 16	948 ± 6	945 ± 17	934 ± 3
2	985 ± 8	981 ± 17	967 ± 3	947 ± 9	932 ± 8	929 ± 6
2,5	981 ± 4	969 ± 4	963 ± 5	937 ± 7	927 ± 6	922 ± 6
3	972 ± 3	964 ± 3	955 ± 9	940 ± 16	933 ± 18	914 ± 5
5	933 ± 34	926 ± 6	935 ± 15	860 ± 14	871 ± 14	886 ± 20
9	885 ± 15	842 ± 11	824 ± 5	837 ± 22	803 ± 2	789 ± 1
16	904 ± 10	846 ± 20	828 ± 7	809 ± 14	788 ± 15	756 ± 9
24	890 ± 3	872 ± 42	845 ± 11	838 ± 1	765 ± 21	767 ± 9
30	860 ± 10	865 ± 1	789 ± 9	763 ± 5	748 ± 5	734 ± 32

En cuanto a la influencia de la adición de oxígeno, tanto después de la etapa L como de la secuencia LE, durante las cuatro primeras horas de tratamiento no se observan diferencias significativas en la viscosidad entre los tratamientos sin adición de gas, con adición de aire y con adición de oxígeno. A partir de 5 h, cuando se produce la caída de viscosidad, se pueden observar diferencias de viscosidad apreciables (entre 15 y $75 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$) entre el tratamiento sin adición de gas (Ls y LsE) y los tratamientos con adición de aire (Lair y LairE) y de oxígeno (Lo y LoE) (Tabla 4-10 y la Fig. 4-15). Las diferencias de viscosidad a tiempos largos entre los tratamientos con adición de aire y con adición de oxígeno son menos significativas, aunque la viscosidad en los tratamientos Lo y LoE es ligeramente inferior que en los tratamientos Lair y LairE.

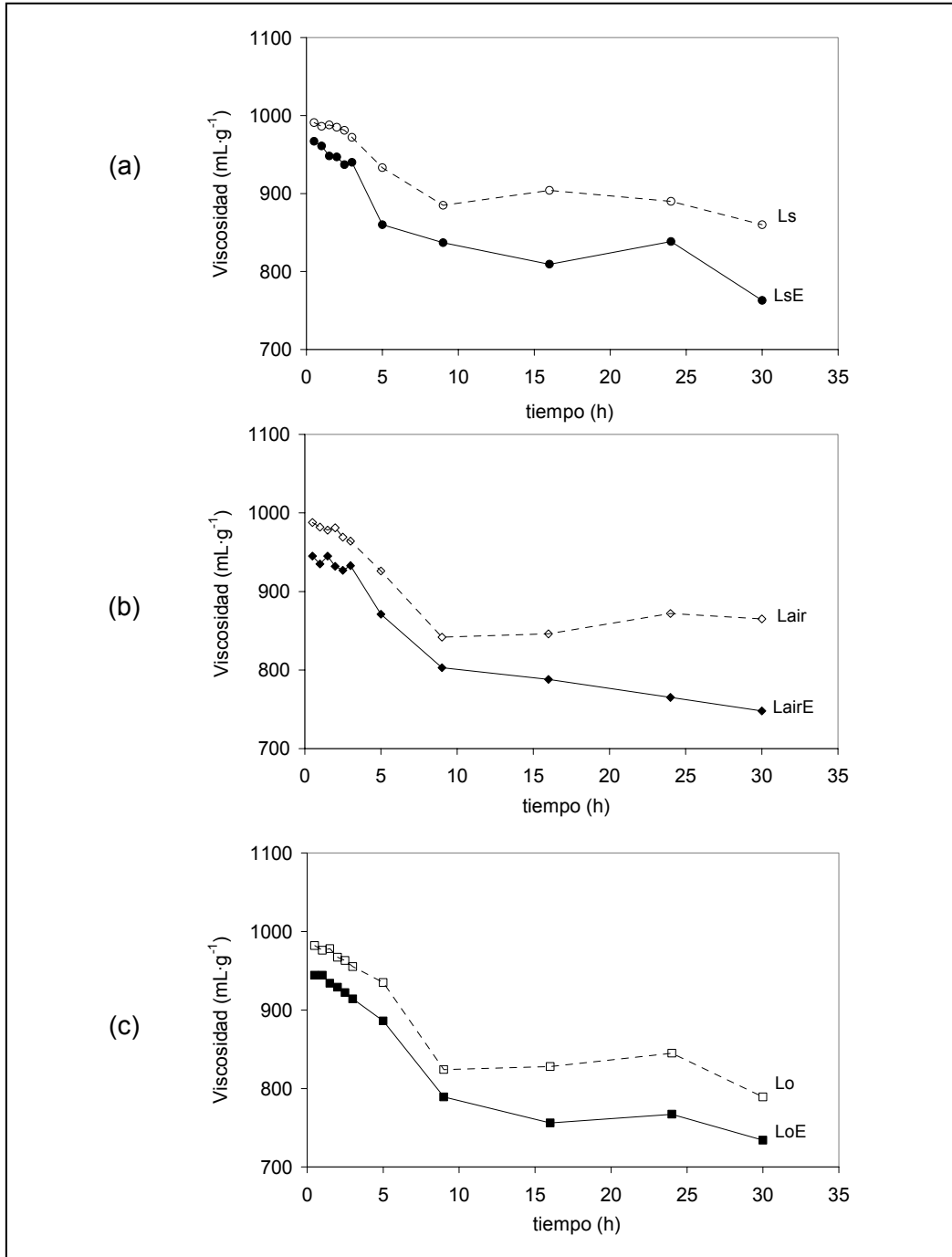


Fig. 4-15. Viscosidad (mL·g⁻¹) de la pasta tras aplicar la etapa L y la secuencia LE, en experiencia Ls (a), Lair (b) y Lo (c). En las figuras Ls (○), LsE (●), Lair (◇), LairE (◆), Lo (□) y LoE (■).

Viscosidad. Comparación etapa L y secuencia LE

Al inicio del tratamiento, durante las tres primeras horas, las diferencias de viscosidad entre las pastas después de la etapa L y la secuencia LE son pequeñas, del orden de 30 mL·g⁻¹. Al aumentar el tiempo de tratamiento aumentan las diferencias de viscosidad, a partir de las cinco horas siempre es superior a 50 mL·g⁻¹ y puede llegar hasta los 100 mL·g⁻¹ (Tabla 4-11).

Tabla 4-11. Diferencias de viscosidad entre la etapa L y la secuencia LE.

tiempo (h)	Δ viscosidad (mL·g ⁻¹)		
	Ls – LsE	Lair-LairE	Lo – LoE
0,5	24	43	38
1	25	47	32
1,5	40	33	44
2	38	49	38
2,5	44	42	41
3	32	31	41
5	73	55	49
9	48	39	35
16	95	58	72
24	52	107	78
30	97	117	55

La etapa L puede producir dos efectos sobre la celulosa de la pasta; una degradación directa de la celulosa o puede también modificar los grupos funcionales de ésta, de manera que esta celulosa modificada se degrada en el tratamiento alcalino posterior, o sea, en la etapa E. 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 en la etapa L.

4.3.2.6 Relación entre las propiedades de las pastas obtenidas en L y LE

En la Fig. 4-16 se muestra la relación entre los resultados de blancura, índice kappa y viscosidad obtenidos en los tratamientos L y LE para todos los tiempos de tratamientos ensayados. Se puede observar como una disminución en el índice kappa se correlaciona con un aumento en el grado de blanco de la pasta, tanto después de

una etapa L como de una secuencia LE. Aunque se observa que, en general, una disminución del índice kappa y un aumento de blancura producen una disminución de viscosidad, no se puede establecer una correlación entre ambos pares de propiedades debido a la gran dispersión de los datos. Para un determinado valor de viscosidad el índice kappa es menor en la secuencia LE que en la etapa L. Igualmente en el caso de la blancura, para un determinado valor de viscosidad, la blancura es más elevada en la secuencia LE que en la etapa L.

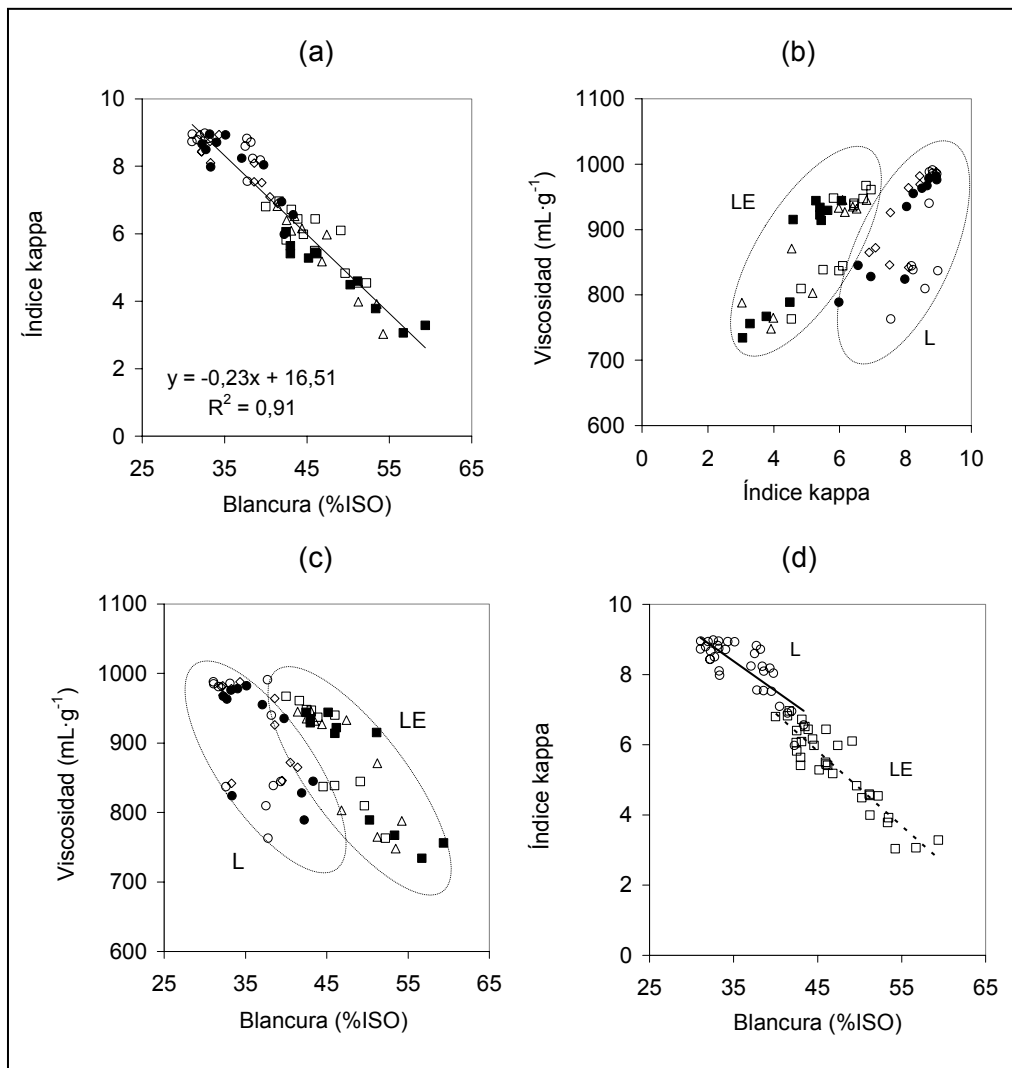


Fig. 4-16. Relación entre las propiedades de las pastas después de aplicar L y LE. En las figuras a, b y c, Ls(o), Lair (◇), Lo (•), LsE (◻), LairE (△) y LoE (◻). En la figura d, L(o) y LE (◻).

En la Fig. 4-18 se muestran gráficamente los resultados de índice kappa y viscosidad correspondientes a la etapa L y la secuencia LE en función del tiempo de tratamiento. Si se analiza la influencia del tiempo de tratamiento en las propiedades de índice kappa y viscosidad tanto en L como en LE se puede observar como al inicio del tratamiento la viscosidad disminuye lentamente mientras se produce una deslignificación muy rápida de la pasta. Cuando la velocidad de deslignificación disminuye se produce una disminución muy rápida de la viscosidad de la pasta hasta que ambas propiedades llegan al estado estacionario.

Cuando disminuye la cantidad de lignina hasta un determinado valor de índice kappa, el sistema deja de degradar lignina y comienza a oxidar celulosa hasta que se llega a un determinado valor de viscosidad, en ese momento el sistema ya no degrada la pasta aunque podría seguir oxidando los compuestos disueltos en los efluentes. La relación entre la deslignificación y la disminución de viscosidad se determina a partir de la medida de selectividad. La que se usa con más frecuencia se presenta en la ecuación Ec. 4-2 y Ec. 4-3.

$$Sel_{IK} \% = \frac{IK_o - IK_f}{\mu_o - \mu_f} \cdot 100 \quad \text{Ec. 4-2}$$

$$Sel_B \% = \frac{B_o - B_f}{\mu_o - \mu_f} \cdot 100 \quad \text{Ec. 4-3}$$

Donde, IK_o , μ_o y B_o son los valores de índice kappa, viscosidad y blancura de la pasta inicial y IK_f , μ_f y B_f son el índice kappa, la viscosidad y la blancura de la pasta después de aplicar la secuencia LE.

En la Fig. 4-17 se observa como la selectividad disminuye al aumentar el tiempo de tratamiento, sobre todo a partir de las dos primeras horas de tratamiento. En cuanto a las propiedades de blancura e índice kappa, se observa que después de la secuencia LE no hay diferencias apreciables en el índice kappa entre los tratamientos LoE y LairE, en cambio la blancura es superior en LoE. Este aumento de blancura no se debe a una menor cantidad de lignina en la pasta, la lignina en el tratamiento LoE podría presentar un grado de oxidación distinto, una menor cantidad de grupos cromóforos, que la del tratamiento LairE. Un mayor aporte de oxígeno superior a un determinado valor no supone una mayor deslignificación, pero sí una modificación de los grupos cromóforos de la lignina residual en la pasta.

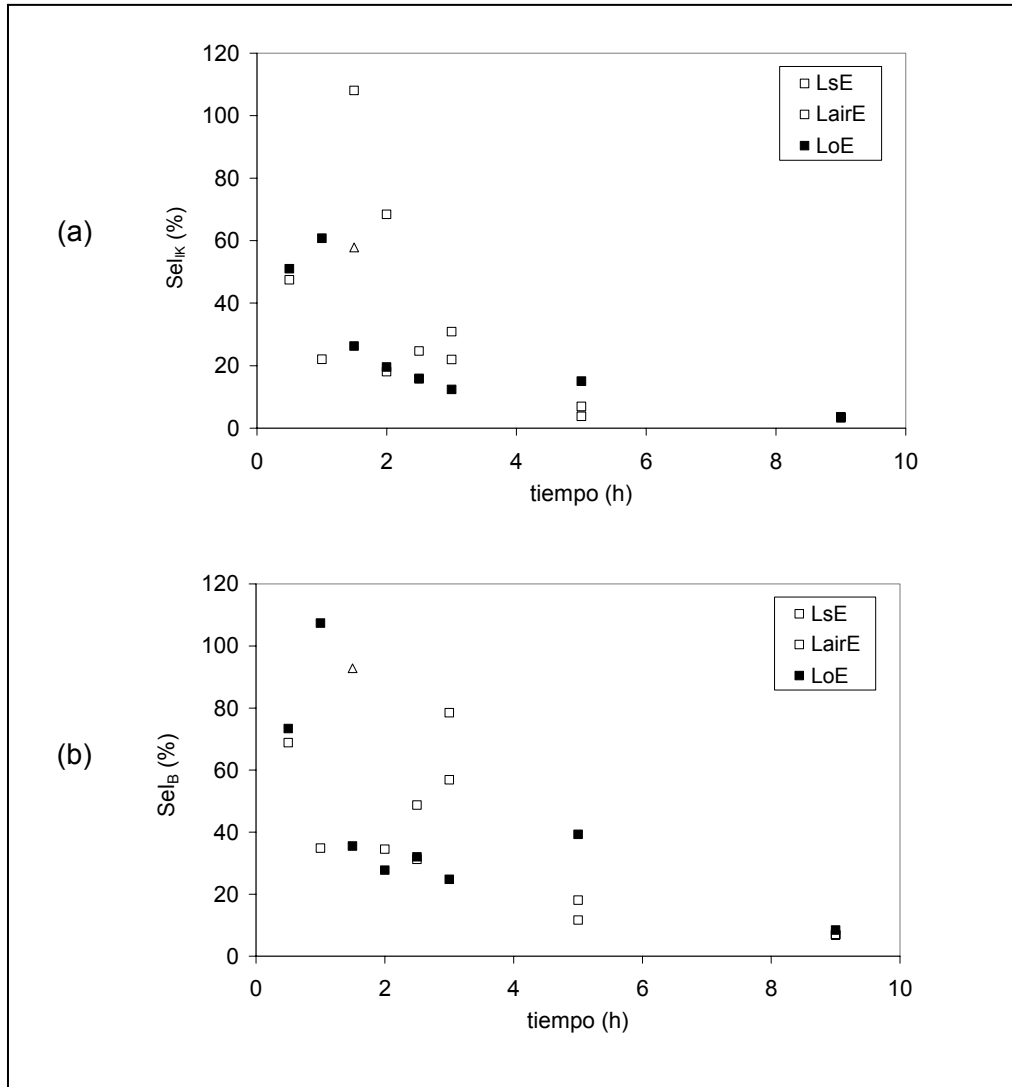


Fig. 4-17. Selectividad de índice kappa (a) y blancura (b) de la secuencia LE.

Relación con el tipo de aporte de oxígeno. Índice kappa y viscosidad

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.

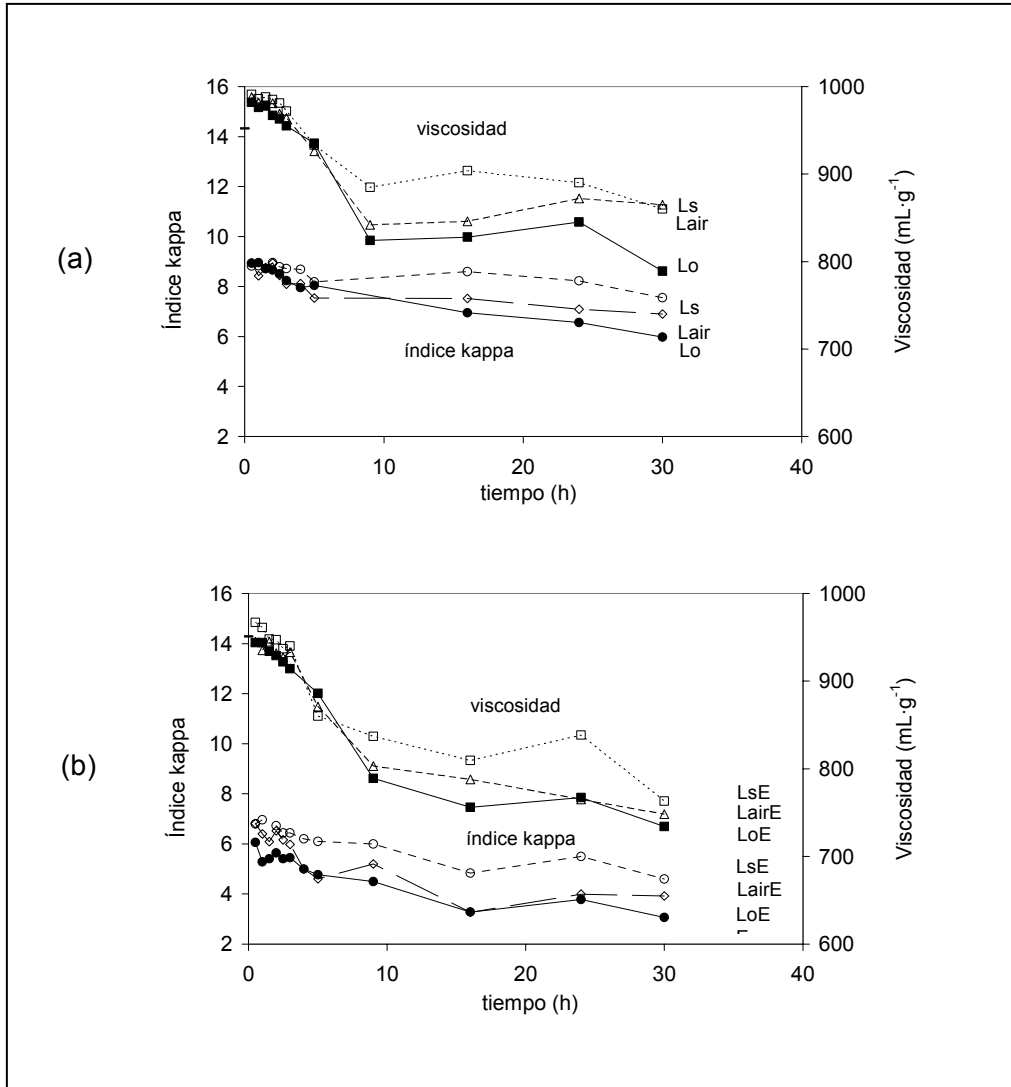


Fig. 4-18. Índice kappa y viscosidad en función del tiempo de tratamiento después de aplicar L (a) y LE (b). En las figuras, índice kappa de Ls y LsE (○), Lair y LairE (◇), Lo y LoE (●) y viscosidad de Ls y LsE (□), Lair y LairE (△) y Lo y LoE (■).

4.3.2.7 Estudio de la oxidación de la celulosa: Etapa R

Debido a la posible degradación de la celulosa durante la etapa L comentada anteriormente, 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 durante la etapa L, de manera que en una etapa alcalina posterior no se produce la degradación de esta

celulosa modificada. La mayor disminución de la viscosidad se produce a partir de las 5 h de tratamiento por lo que el estudio de la etapa R se realiza a tiempos largos de aplicación.

Los resultados de blancura tras aplicar la etapa R (Tabla 4-12 y Fig. 4-19) son superiores a los obtenidos en la etapa L e inferiores a los obtenidos tras aplicar la secuencia LE. La etapa R se lleva a cabo en medio alcalino suave, pH 10 y temperatura ambiente, por lo que se puede producir una cierta solubilización de la lignina que produciría un aumento de blancura en la pasta respecto a la etapa L.

Tabla 4-12. Resultados de blancura y viscosidad tras aplicar la secuencia LR.

tiempo (h)	Blancura (ISO%)			Viscosidad (mL·g ⁻¹)		
	LsR	LairR	LoR	LsR	LairR	LoR
5	40,1	41,8	44,5	891 ± 14	-	-
9	38,3	39,0	40,3	892 ± 16	887 ± 12	864 ± 12
16	41,2	43,9	45,5	898 ± 11	871 ± 3	-
24	43,2	45,3	47,4	969 ± 17	961 ± 0	949 ± 9
30	45,7	45,6	49,7	923 ± 23	915 ± 11	901 ± 32

A partir de las 9 h las diferencias de viscosidad entre la etapa L y la secuencia LR y entre las secuencias LE y LR aumentan con el tiempo de tratamiento desde 7 a 100 mL·g⁻¹ y 60 a 190 mL·g⁻¹, respectivamente, por lo que a tiempos largos de aplicación la viscosidad que se ha perdido en la secuencias L y LE se puede recuperar en parte al aplicar una etapa reductora después de la etapa L (Camarero et al. 2002; Camarero et al. 2004).

La disminución de viscosidad observada después de la etapa L y la secuencia LE se debe en gran medida a la oxidación de la celulosa durante la etapa L. Las medidas de viscosidad después de la secuencia LR son algo superiores a la viscosidad de las pastas después de la etapa L, una parte de la celulosa oxidada en la etapa L se degrada en el análisis de medida de viscosidad (que se realiza en medio alcalino). 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.

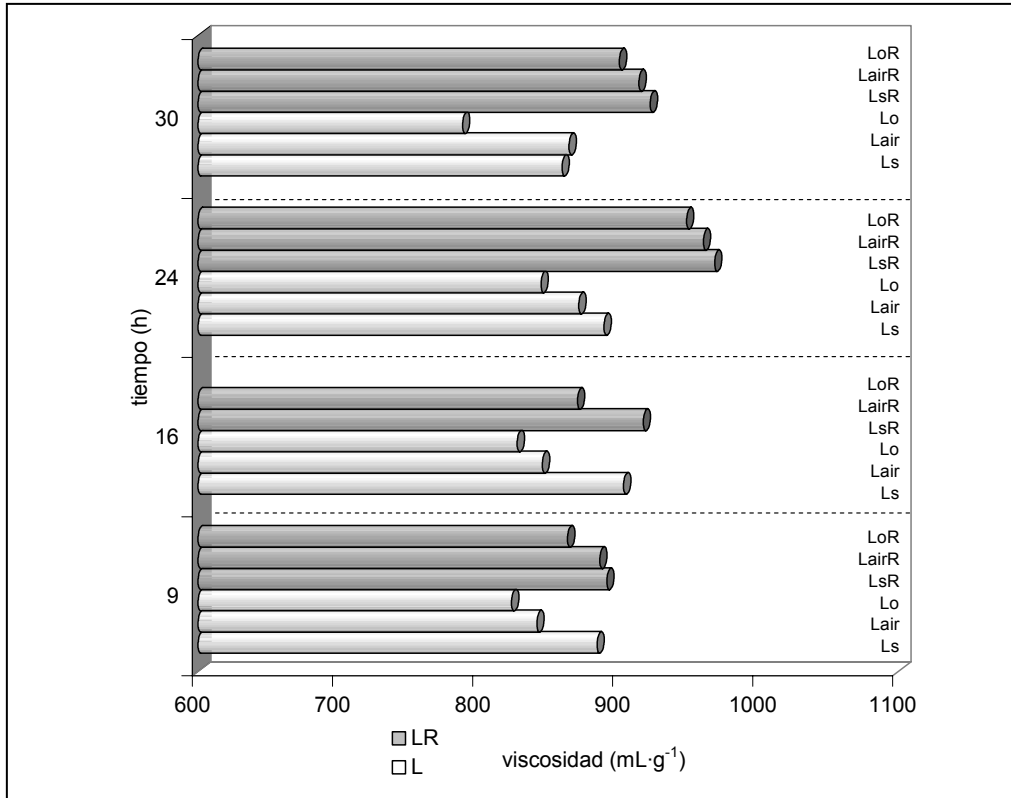


Fig. 4-19. Resultados de viscosidad tras aplicar la etapa L y la secuencia LR.

4.3.2.8 Evaluación de los efluentes de la etapa L: color y DQO

Se han determinado las propiedades de color y demanda química de oxígeno (DQO) de los efluentes obtenidos en la etapa L durante las tres primeras horas de tratamiento. (Tabla 4-13 y Fig. 4-20).

En la Fig. 4-20 se puede observar que ambas propiedades, color y DQO de los efluentes, aumentan al aumentar el tiempo de aplicación y el aporte de oxígeno al sistema. El color y la DQO en la etapa Ls son inferiores a las obtenidas tanto en la etapa Lair como en la etapa Lo. Las diferencias en los resultados entre la etapa Lair y Lo comienzan a ser significativas a partir de 1,5 h de tratamiento. Las propiedades de color y DQO dependen del tipo y la concentración de compuestos químicos presentes en un efluente. Un mayor tiempo de tratamiento y un mayor aporte de oxígeno en el sistema producen una mayor degradación de lignina; una parte de esta lignina degradada es soluble al pH de tratamiento, pH 4; por lo que aumenta la concentración de lignina disuelta en los efluentes. Es posible que el color y la DQO aumenten debido a una mayor concentración de lignina en el efluente; pero también se debe considerar

que otras especies químicas como la enzima lacasa, el mediador HBT y productos de degradación de éstos y los hidratos de carbono procedentes de la celulosa, se encuentran presentes en el medio de reacción y también pueden tener influencia en ambas propiedades.

Tabla 4-13. Color y DQO de los efluentes de la etapa L.

tiempo (h)	Color (kg Pt.t ⁻¹)			DQO (kg O ₂ .t ⁻¹)		
	Ls	Lair	Lo	Ls	Lair	Lo
0,5	19	26	30	11	22	19
1	26	36	38	15	36	40
1,5	26	34	39	30	53	55
2	31	43	54	48	66	92
2,5	32	47	57	52	92	113
3	33	47	59	54	103	116

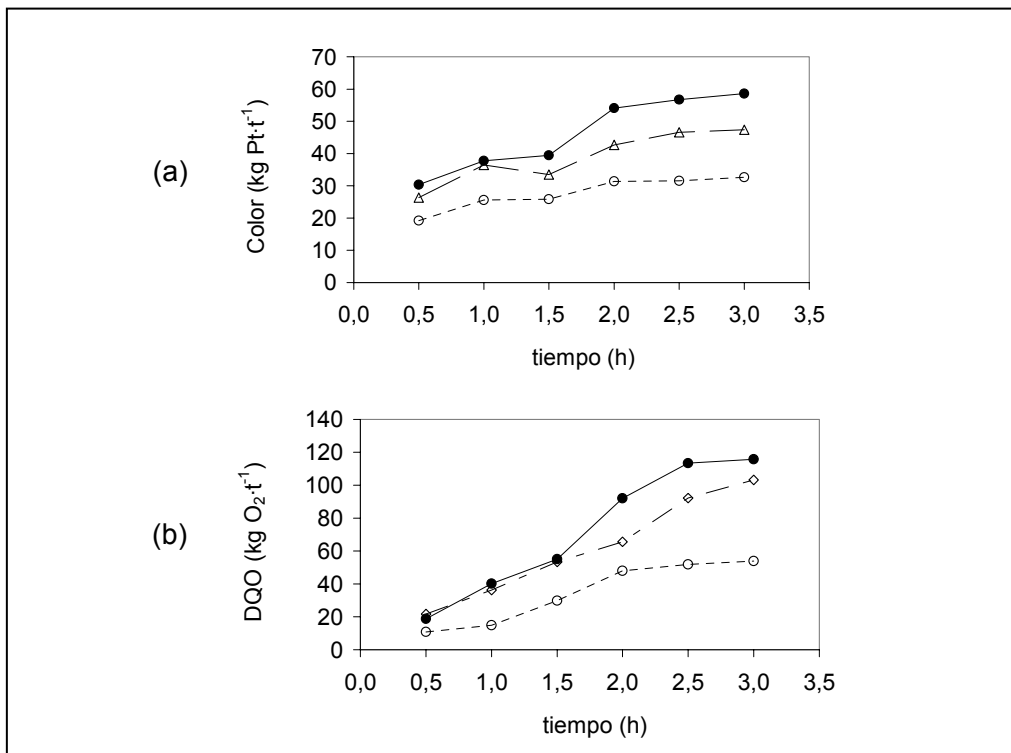


Fig. 4-20. Resultados de color (a) y DQO (b) de los efluentes de la etapa L. En las figuras Ls (o), Lair (Δ) y Lo (●).

En la Fig. 4-21 (a) se observa una correlación lineal entre el color y la DQO en todas las etapas L y tiempos de tratamiento estudiados. A partir de los datos anteriores se

puede deducir que existe una relación directa entre el color que presentan los compuestos químicos presentes en los efluentes y las determinaciones de DQO durante las tres primeras horas de tratamiento. No se encuentra una relación entre el índice kappa y color y DQO, por lo que no se debe directamente a la cantidad de lignina disuelta en los efluentes, el color podría deberse a que cambia el tipo de lignina disuelta u otros productos de degradación de HBT o de la enzima durante el tratamiento. El HBT se convierte parcialmente a BT (benzotriazol) en el sistema lacasa mediador (Bourbonnais et al. 1997; Potthast et al. 2001; Sealey and Ragauskas 1998; Sigoillot et al. 2005), por lo que este compuesto podría ser el responsable del aumento de color rojo en los efluentes a tiempos largos de tratamiento.

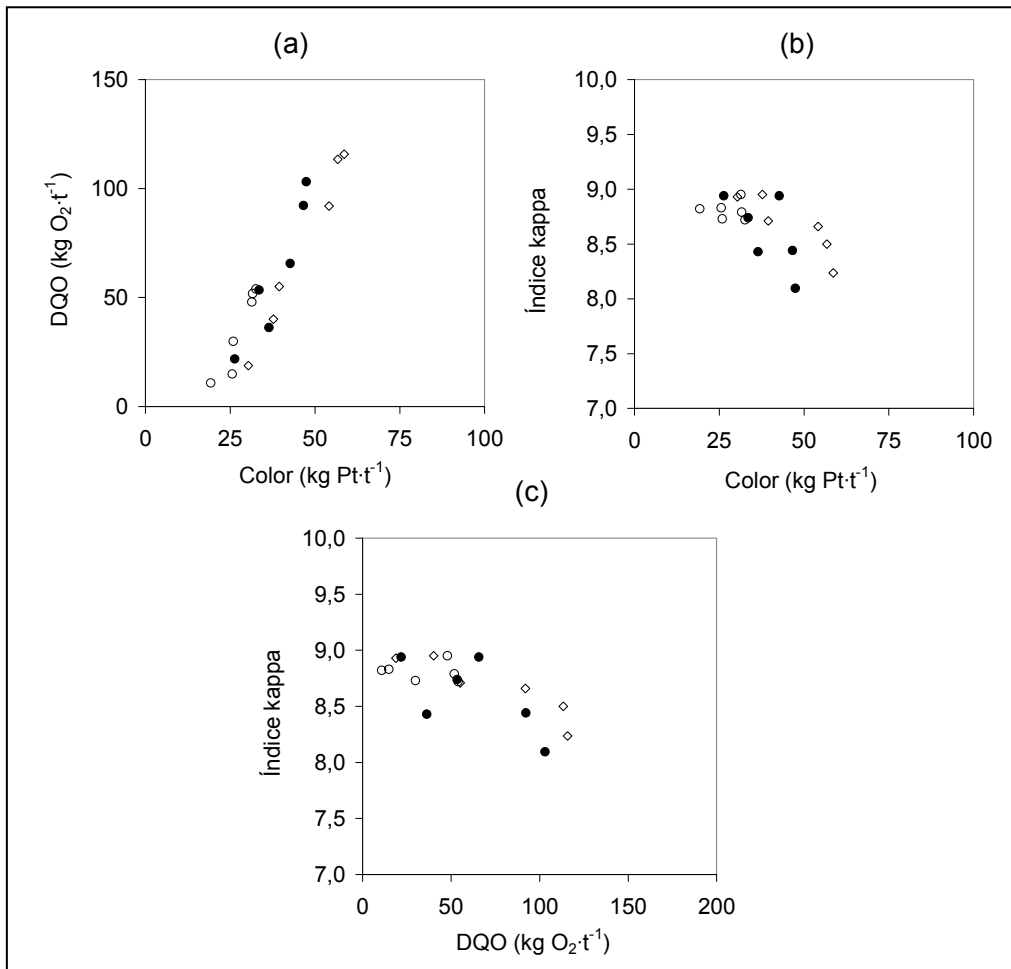


Fig. 4-21. Relación entre las propiedades de los efluentes y las pastas. Relación entre DQO y color (a), entre índice kappa y color (b) y entre índice kappa y DQO (c).

4.4 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 índice kappa límite y por tanto una disminución de la cantidad de lignina residual en la pasta, sugiere que el valor de índice 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 CIE L*h*C 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. El estudio del color de la pasta blanqueada enzimáticamente es novedoso ya que no se han encontrado referencias en la bibliografía sobre este tema.

La selectividad del tratamiento disminuye al aumentar el tiempo de tratamiento, principalmente a partir de las dos primeras horas. Si se analiza la influencia del tiempo de tratamiento en las propiedades de índice kappa y viscosidad tanto en L como en LE se puede observar como al inicio del tratamiento la viscosidad disminuye lentamente mientras se produce una deslignificación muy rápida de la pasta. Cuando la velocidad de deslignificación disminuye se produce una disminución muy rápida de la viscosidad

de la pasta, el sistema lacasa mediador deja de degradar lignina y comienza a oxidar la celulosa, hasta que ambas propiedades llegan al estado estacionario.

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 durante la etapa L 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 LRE permite la recuperación de la viscosidad de la pasta.

Las determinaciones de DQO y color en los efluentes aumentan en función del tiempo y del aporte de oxígeno al sistema. Existe una relación directa entre el color que presentan los compuestos químicos presentes en los efluentes y las determinaciones de DQO durante las tres primeras horas de tratamiento, en cambio no se encuentra una relación entre el índice kappa y color y DQO, por lo que estas propiedades no se pueden relacionar directamente a la cantidad de lignina eliminada durante el tratamiento.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

Balakshin,M., Capanema,E., Chen,C.-L., Gratzl,J., Kirkman,A. and Gracz,H. (2001a) Biobleaching of pulp with dioxygen in the laccase-mediator system - reaction mechanisms for degradation of residual lignin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 13, 1-16.

Balakshin,M., Chen,C.-L., Gratzl,J., Kirkman,A. and Jakob,H. (2000a) Kinetic studies on oxidation of veratryl alcohol by laccase-mediator system. Part 2. The kinetics of dioxygen uptake. *Holzsforschung* 54, 171-175.

Balakshin,M., Chen,C.-L., Gratzl,J., Kirkman,A. and Jakob,H. (2001b) 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.

Balakshin,M., Chen,C.-L., Gratzl,J., Kirkman,A. and Jakob,H. (1999) Biobleaching of pulp with dioxygen in the laccase-mediator system. Part 1. Kinetics of delignification. *Holzsforschung* 54, 390-396.

Balakshin,M., Chen,C.-L., Gratzl,J., Kirkman,A. and Jakob,H. (2000b) Kinetic studies on oxidation of veratryl alcohol by laccase-mediator system. Part 1. Effects of mediator concentration. *Holzsforschung* 54, 165-170.

Bourbonnais,R., Paice,M.G., Freiermuth,B., Bodie,E. and Borneman,S. (1997) Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4627-4632.

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.

Camarero, S., Galletti, G.C. and 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.

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.

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.

Chakar, F.S. and Ragauskas, A. (2000a) The kismet of residual lignins during LMS delignification of high-kappa kraft pulps. *Holzforschung* 54, 647-653.

Chakar, F.S. and Ragauskas, A.J. (2000b) The effects of oxidative alkaline extraction stages after laccaseHBT and laccaseNHAA treatments - an NMR study of residual lignins. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 20, 169-184.

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.

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.

Dence, C. and Reeve, D. (1996) *Pulp bleaching. Principles and practice*. Atlanta: Tappi Press.

Freudenreich, J., Amann, M., Fritz-Langhals, E. and Stohrer, J. (1998) Understanding the lignozym-process. *International Pulp Bleaching Conference* pp. 71-76.

García, O. (2003) Utilización de fibras de lino en la fabricación de papel. Nuevas secuencias de blanqueo y aplicación a sistemas enzimáticos. Terrassa, España: Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera, Universidad Politécnica de Cataluña.

Herpöel, I., Jeller, H., Fang, G., Petit-Conil, M., Bourbonnais, R., Robert, J.L., Asther, M. and Sigoiillot, J.C. (2002) Efficient enzymatic delignification of wheat straw pulp by a sequential xylanase-laccase mediator treatment. *Journal of Pulp and Paper Science* 28, 67-71.

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"*.

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.

Li,K., Helm,R.F. and Eriksson,K.-E. (1998) Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/1-hydroxybenzotriazole redox system. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 27, 239-243.

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.

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.

Potthast,A., Koch,H. and Fischer,K. (1997) The laccase-mediator system - Reaction with model compounds and pulp. *Iswpc - 9Th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry - Oral Presentations* F21-F24.

Potthast,A., Rosenau,T. and Fischer,K. (2001) Oxidation of benzyl alcohols by the laccase-mediator system (LMS) - A comprehensive kinetic description. *Holzforchung* 55, 47-56.

Rocheftort,D., Leech,D. and Bourbonnais,R. (2004) Electron transfer mediator systems for bleaching of paper pulp. *Green Chemistry* 6, 14-24.

Roncero,B. (2001) Obtención de una secuencia "TCF" con la aplicación de ozono y enzimas, para el blanqueo de pastas madereras y de origen agrícola. Optimización de la etapa Z. Análisis de los efectos en la fibra celulósica y sus componentes. Terrassa, España: Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera, Universidad Politécnica de Cataluña.

Sealey,J. and Ragauskas,A.J. (1998) Investigation of laccase/N-hydroxybenzotriazole delignification of kraft pulp. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 18, 403-416.

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.

Srebotnik,E. and Hammel,K.E. (2000) Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *Journal of Biotechnology* 81, 179-188.