

Capítol 2

Materials i Mètodes

2.1 MATÈRIA PRIMA

La matèria prima utilitzada a la tesi és pasta kraft d'eucaliptus (*Eucalyptus globulus*):

- ❖ Als capítols 3, 4 i part del capítol 5 s'ha utilitzat pasta kraft d'*Eucalyptus globulus* deslignificada amb oxigen, que prové directament de fàbrica. Aquesta és de procedència industrial i subministrada per l'empresa Torraspapel S.A. (Saragossa, Espanya). Les seves propietats inicials es mostren a la Taula 2-1.
- ❖ A una part del capítol 5, i als capítols 6-11 s'utilitza la mateixa pasta kraft d'*Eucalyptus globulus* deslignificada amb oxigen especificada anteriorment però abans de realitzar-hi els diferents tractaments la pasta és rentada al laboratori. El rentat es realitza en bosses de polietilè, al 10% de consistència ajustada amb el tampó Tris-HCl a pH durant 30 minuts a temperatura ambient. Passat el temps la pasta es renta 3 vegades amb aigua descalcificada i al final una vegada amb aigua destil·lada. Les propietats inicials d'aquesta pasta es mostren a la Taula 2-1.
- ❖ Als capítols 11-13 s'utilitza pasta kraft d'*Eucalyptus globulus* crua (sense haver estat deslignificada amb oxigen). Aquesta pasta és subministrada per l'empresa "Grupo Empresario ENCE" (Pontevedra, Espanya) i també es renta al laboratori abans de realitzar els diferents tractaments, a les mateixes condicions anteriorment descrites. Les seves propietats inicials, mesurades al laboratori es mostren a la Taula 2-1.

Taula 2-1. Propietats inicials de les diferents pastes kraft d'eucaliptus utilitzades

	Pasta deslignificada amb oxigen	Pasta deslignificada amb oxigen i rentada	Pasta crua rentada
Índex kappa	9,2	, -8,4	11,8
Blancor (%ISO)	50,2	51	41,3
Viscositat (mL/g)	958±24	9 2±20	-
HexA* (µmol/gps)	44,1±0,42	38,0-38,8±1,1	-

*HexA: contingut en àcids hexenurònics de la pasta

2.2 ENZIMS I MEDIADORS

A continuació es descriuen els diferents enzims i mediadors utilitzats al llarg de la tesi.

2.2.1 Xilanases

Al llarg dels capítols 3-6 es realitza un anàlisi de diferents xilanases on s'utilitzen dues xilanases comercials i quatre xilanases noves de laboratori.

Les dues xilanases comercials són subministrades per Uckmann Laboratories S.A. i corresponen a la uzyme 2511 (X) i uzyme 2514 (X_C). Les condicions d'aplicació d'aquestes xilanases durant el tractament X han estat determinades per la Universitat de Barcelona i s'especifiquen més endavant (apartat 2.3.1).

Les quatre xilanases noves de laboratori han estat aïllades i caracteritzades per la Universitat de Barcelona a partir de dues soques bacterianes amb alta activitat sobre xilà: *acillus* sp. P- (López *et al.*, 1998) i *Paenibacillus barcinonensis* (Sánchez *et al.*, 2005). A la Taula 2-2 s'indica la família i la soca bacteriana de la qual prové cadascuna.

Taula 2-2. Característiques de les xilanases noves

Ref. Xilanasa	Família glicosil hidrolases	Soca bacteriana	Xilanasa (UB)	Referència
X _A	10	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	Xyn	Ianco <i>et al.</i> , 1996 Gallardo <i>et al.</i> , 2003 Gallardo <i>et al.</i> , 200
X _G	11	<i>acillus</i> sp. P-	Xyn A	Gallardo <i>et al.</i> , 2004
X _J	5	<i>acillus</i> sp. P-	Ynff	Gallardo, 200
X _K	10	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	Xyn C	Ianco <i>et al.</i> , 1999

Als capítols 11-13 s'ha utilitzat una xilanasa comercial (Pulzyme HC) subministrada per NOVOZYMES® i amb una activitat de 332 U/mL, on una unitat d'activitat enzimàtica és definida com la quantitat d'enzim que transforma 1 μmol de sucre reductor (mesurat com a equivalents de xilosa) de xilà per minut a 50°C i pH 5.

2.2.2 Lacasa i mediador

La lacasa utilitzada als capítols 11-13 és una lacasa comercial de *Trametes villosa* (NS-51002) proporcionada per NOVOZYMES®.

Als capítols 11-13 s'ha utilitzat la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* produïda per l'IN A a Marsella, França (Lomascolo *et al.*, 2002) de la soca monocariòtica hiperproductora ss3, amb una activitat d'1,95 U/mg. Una unitat d'activitat enzimàtica és definida com la quantitat d'enzim que transforma 1 µmol de substrat per minut.

Al capítol 11 també s'ha utilitzat una lacasa recombinant amb un mòdul d'unió a la cel·lulosa (lacasa-C M) produïda pels laboratoris de l'IN A.

Els mediadors utilitzats han estat els mediadors sintètics 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonat) o A TS (capítol 11), 1-hidroxibenzotriazol o H T (capítols 11 i 13) i N-hidroxiacetanilida o NHA (capítols 11 i 13). L'A TS i l'H T han estat subministrats per Sigma-Aldrich i l'NHA ha estat sintetitzat segons Oxley, *et al.*, 1989, per l'Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II".

2.2.3 Altres enzims

Al capítol 11 s'ha utilitzat la ferulat esterasa (FAE A) per a realitzar una etapa de pretractament enzimàtic. Aquesta ha estat produïda a partir d'una soca recombinant d'*Aspergillus Niger* (ecord *et al.*, 2003) a l'IN A (Marsella, França) amb una activitat de 38,6 U/mL, on una unitat d'activitat enzimàtica és definida com la quantitat d'enzim que catalitza l'alliberació d'1 µmol d'àcid ferúlic per minut.

Al capítol 13 s'ha utilitzat la tirosinasa de *P.sanguineus* que ha estat clonada a *A.Niger* (Halaouli *et al.*, 2005 i 2006), i obtinguda als laboratoris de l'IN A (Marsella, França). Al capítol 13 s'explica detalladament la seva producció.

2.3 ETAPES DE BLANQUEIG

A continuació s'indiquen les diferents etapes de blanqueig realitzades als laboratoris de l'Especialitat Paperera i Gràfica de l'UPC. Se n'especifiquen les condicions i l'equip utilitzat en cada cas.

2.3.1 Pretractament enzimàtic amb xilanasa (X)

Aquest tractament consisteix en l'aplicació d'una xilanasa a unes condicions determinades les quals són específiques per a cada enzim. Al llarg de la tesi s'han utilitzat dues xilanases comercials: l'X (capítol 3), l'X_C (capítols 3 i 4) i quatre xilanases noves de laboratori: l'X_A (capítol 3 i 5), l'X_G (capítols 5-10), l'X_J (capítols 5 i 6), i l'X_K (capítol 5). Les condicions òptimes d'aplicació en el blanqueig de cadascuna s'han

determinat pel Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona i es mostren a la Taula 2-3.

Taula 2-3. Condicions òptimes (determinades per l'UB) d'aplicació de cada xilanasa sobre la pasta

Enzim	Activitat (U/mL)	Temp. (°C)	pH	Dosi (U/gps)	Tampó	Temps (h)	Consist. (%)
X_B	4085	60	8	1	Tris-HCl	2	10
X_C	44	0	6	0,5-2	Fosfat	2	10
X_A	33	40	8	1-2	Tris-HCl	2	10
X_G	41,8	50		2-3	Tris-HCl	2	10
X_J	91,8	60		2-3	Tris-HCl	2	10
X_K	0,4	40		2	Tris-HCl	2	10

On una unitat d'activitat enzimàtica és definida com la quantitat d'enzim que transforma 1 µmol de xilà per minut.

El tractament X es realitza en bosses de polietilè en un bany termostàtic d'aigua (Figura 2-1) a la temperatura requerida en cada cas. La pasta s'agita manualment cada vint minuts. Una vegada finalitzat el temps de reacció, la pasta es filtra i es recullen els lleixius residuals. Seguidament es renta tres vegades amb aigua descalcificada i per últim amb aigua destil·lada. La pasta s'esmicola i se'n determinen les propietats corresponents.

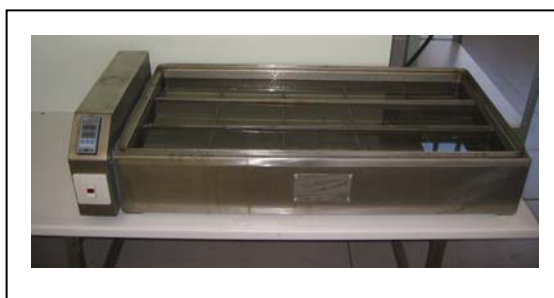


Figura 2-1. Bany termostàtic d'aigua

2.3.2 Tractament amb diòxid de clor (D)

Aquesta etapa es realitza en bosses de polietilè en un bany termostàtic d'aigua (Figura 2-1) a la temperatura requerida en cada cas. La pasta s'agita manualment cada vint minuts. Una vegada finalitzat el temps de reacció, la pasta es filtra, es recullen lleixius i se'n mesura el diòxid de clor residual. Seguidament es renta tres vegades amb aigua

descalcificada i per últim amb aigua destil·lada. La pasta s'esmicola i se'n determinen les propietats corresponents. Les condicions d'aquesta etapa es mostren a la Taula 2-4 (etapes D i D₁).

Taula 2-4. Condicions d'aplicació de les diferents etapes de blanqueig

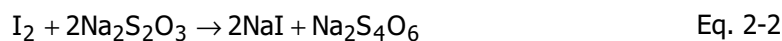
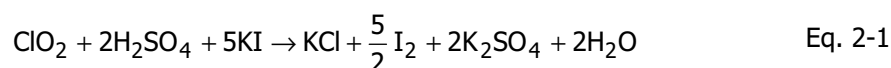
	D	P	Eop	D₁	E
Consistència (% sps*)	10	5	10	10	5
Temperatura (°C)	56	90	0	65	90
Temps (min)	60	120	65	215	120
H₂O₂ (% sps*)	-	3	0,3	-	-
NaOH (% sps*)	-	1,5	1,1	-	1,5
ClO₂ (% sps* com Cl₂ actiu)	3	-	-	1,5	-
DTPA	-	1	-	-	-
MgSO₄	-	0,2	-	-	-
O₂ (Kg/Tad)	-	-	5	-	-

*sps: sobre pasta seca

2.3.2.1 Determinació del diòxid de clor residual

Dels lleixius que es recullen a l'etapa D es mesura la concentració de diòxid de clor residual que permet conèixer exactament la quantitat de diòxid que s'ha consumit durant el blanqueig de la pasta.

En medi àcid, el diòxid de clor (ClO₂) present a la dissolució oxida el ió iodur (I⁻) a iode (I₂). Mitjançant l'addició d'una solució de tiosulfat de sodi es determina la quantitat de iode format segons la reacció:



eactius:

- Àcid sulfúric al 20%
- Solució de iodur potàssic 1N
- Solució de tiosulfat de sodi 0,1N

Procediment:

En un vas de precipitats de 250 mL s'afegeixen 100 mL de lleixiu, 15 mL de solució de iodur potàssic 1N i 5 mL d'àcid sulfúric al 20%. El iode format es valora amb una solució de tiosulfat de sodi 0,1N mitjançant el valorador automàtic KEM.

Càlculs

$$\% \text{ClO}_2 \text{ (com ClO}_2\text{) sps} = \frac{1,35 * V_T * N_T * (100 - c)}{100 * c} \quad \text{Eq. 2-3}$$

c consistència

V_T volum de tiosulfat de sodi en mL consumit durant la valoració

N_T normalitat del tiosulfat de sodi

2.3.3 Tractament amb peròxid d'hidrogen (P)

Les condicions d'aplicació d'aquesta etapa es mostren a la Taula 2-4. Aquesta etapa es realitza a l'aparell individual oscil·lant Easydye de Datacolor (Figura 2-2).



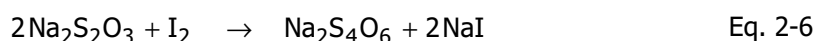
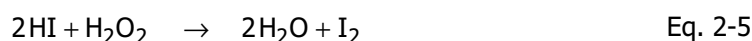
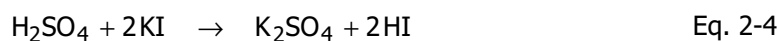
Figura 2-2. Reactor individual oscil·lant Easydye de Datacolor

Aquest aparell permet realitzar varis tractaments a la vegada. S'addiciona la pasta amb els reactius necessaris i a les condicions corresponents. Passat el temps de reacció es refreden els reactors amb aigua freda. Seguidament la pasta es filtra, es recullen els

lleixius i es renta tres vegades amb aigua descalcificada i per últim amb aigua destil·lada.

2.3.3.1 Peròxid d'hidrogen residual

Amb el propòsit de conèixer la quantitat exacta de H₂O₂ consumit a l'etapa de blanqueig, es mesura la concentració de peròxid d'hidrogen residual a partir dels lleixius residuals de l'etapa de blanqueig. El mètode consisteix en l'oxidació del iodur potàssic pel peròxid d'hidrogen en medi àcid en presència de molibdat amònic com a catalitzador, i valoració del iode alliberat mitjançant tiosulfat sòdic (García i Vidal, 1984). Les reaccions que tenen lloc són les següents (Eq. 2-4 - Eq. 2-6):



reactius:

- Àcid sulfúric 4N
- Solució de iodur potàssic 166 g/L
- Solució de molibdat amònic a 50 g/L
- Solució de tiosulfat sòdic 0,1 N

Procediment:

S'agafen 10 mL de la solució de peròxid d'hidrogen a analitzar (lleixius) i s'introdueixen en un erlenmeyer de 250 mL que conté 100 mL d'aigua destil·lada, 10 mL d'àcid sulfúric 4N, 15 mL de solució de iodur potàssic 166 g/L i 2 mL de solució de molibdat amònic a 50 g/L que actua com a catalitzador accelerant la reacció de formació de iode. S'agita i a continuació es deixa reposar 5 min i el iode lliure es valora amb solució de tiosulfat sòdic 0,1N, mitjançant el valorador automàtic KEM.

El pes en g L⁻¹ o en % sps del peròxid d'hidrogen residual es calcula segons les següents expressions:

$$\text{g L}^{-1} \text{ de H}_2\text{O}_2 = 0,1 * V_T * N_T \quad \text{Eq. 2-}$$

$$\% \text{H}_2\text{O}_2 \text{ sps} = 0,01 * (V_T * N_T) * \left(\frac{100}{c} - 1 \right) \quad \text{Eq. 2-8}$$

V_T volum en mL de tiosulfat sòdic utilitzat en la valoració

N_T normalitat del tiosulfat sòdic (0,1 N)

sps sobre pasta seca

c consistència (%)

2.3.4 Extracció alcalina amb oxigen i peròxid (Eop)

Aquesta etapa es realitza en un reactor a pressió amb agitació, desenvolupat en el laboratori de l'Especialització Paperera i Gràfica. El reactor és d'acer inoxidable, perfectament hermètic, i consta d'una vàlvula a través de la qual s'introdueix la pressió a la que s'efectua l'assaig. La particularitat més important és el sistema de pales, que permet mantenir la pasta a mitjana consistència i perfectament homogeneïtzada, amb una quantitat mínima de pasta de 25 grams secs (Figura 2-3).



Figura 2-3. Fotografies del reactor a pressió

Les condicions d'aplicació d'aquesta etapa es mostren a la Taula 2-4. Una vegada s'arriba al temps de reacció, es despressuritza el reactor, es recullen els lleixius residuals i la pasta es renta tres vegades amb aigua descalcificada i per últim amb aigua destil·lada.

2.3.5 Tractament amb el sistema lacasa mediador (L)

Els tractaments L (capítols -10) s'efectuen al 5% de consistència amb una solució tamponada de tartrat de sodi 50 mM a pH 4. L'assaig es realitza en el reactor a pressió (Figura 2-3) a 590 kPa, a 30°C i amb agitació a 60 rpm. Al tractament L s'hi afegeixen unes gotes de Tween 80 al 0,05% p/v com a tensioactiu. Després de l'etapa L es recuperen els lleixius i es renta la pasta dues vegades amb aigua descalcificada i per últim una vegada amb aigua destil·lada. La dosi de lacasa, la dosi de mediador i el temps de tractament són les tres variables del disseny experimental i les seves condicions varien en els següents rangs: x_1 ≡ dosi de lacasa (1-20 U/gps), x_2 ≡ dosi de mediador (0,5-2,5% sps), x_3 ≡ temps de tractament (1- h).

2.3.6 Extracció alcalina (E)

De les pastes obtingudes després de l'etapa L se'ls realitza una etapa d'extracció alcalina (E). L'etapa E es realitza al reactor individual oscil·lant Easydye de Datacolor (Figura 2-2) i les condicions d'aquesta etapa s'especifiquen a la Taula 2-4. Passat el temps de tractament, es recuperen els lleixius i es renta la pasta abans de determinar-ne les seves propietats.

2.4 CARACTERITZACIÓ DE LA PASTA

Per a la caracterització de les pastes es mesuren les propietats d'índex kappa, blancor i viscositat segons les normes: ISO-302, ISO-3688 i ISO-5351-1, respectivament.

2.4.1 Àcids Hexenurònics (HexA)

El mètode utilitzat per la determinació quantitativa d'àcids hexenurònics (HexA) presents a la pasta es basa en la metòdica proposada per Li (Gellerstedt i Li, 1996; Chai *et al.*, 2001) en la que es realitza l'anàlisi per espectroscòpia UV.

1. Preparació de solucions

- Solució d'acetat de mercuri 60 mM en tampó acetat de sodi. Dissoldre 4,84 g d'acetat de mercuri ($\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) en aproximadament 80 mL d'aigua desionitzada. Addicionar

0, 2 mL d'àcid acètic glacial (CH_3COOH) per tal d'ajudar a la dissolució de l'acetat de mercuri i protegir la seva hidròlisi. En altres 80 mL d'aigua desionitzada addicionar 4,66 g d'acetat de sodi (CH_3COONa) i dissoldre. Mesclar les dues solucions anteriors i enrasar amb aigua fins un volum de 250 mL en un matràs aforat. Corroborar que el pH és aproximadament 5,4. Aquesta solució és bastant estable i pot mantenir-se fora de la nevera a temperatura ambient.

- Solució de periodat. Es prepara una solució de periodat de sodi (NaIO_4) 0,1M, dissolt en àcid fosfòric (H_3PO_4) 2,8M. S'ha de conservar en una botella fosca.

- Solució d'arsenit de sodi. Es prepara una solució d'arsenit de sodi (NaAsO_2) al 4% en àcid clorhídric (HCl) 0,5M. Si no s'aconsegueix dissoldre totalment, la solució es filtra mitjançant un filtre número 4 i es recull el filtrat.

- Àcid tiobarbitúric. Es prepara una solució d'àcid tiobarbitúric ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) al 0,3% en aigua desionitzada. Aquesta solució és bastant inestable (l'indicatiu és que es va agafant un color groc), pel què és convenient preparar-la el mateix dia de la seva utilització. Si el T A sòlid (àcid tiobarbitúric) agafa un color groc no s'ha d'utilitzar.

2. Procediment operatori

- En un erlenmeyer de 100 mL es pesa aproximadament 1 g de pasta seca¹ en una balança de precisió. És convenient realitzar un duplicat. Paral·lelament es determina la sequetat de la pasta segons la norma ISO 638.

- S'introdueixen a cada erlenmeyer 30 mL d'aigua desionitzada, mesurats amb proveta de 50 mL, i es col·loquen en un agitador magnètic per tal de desintegrar completament la pasta².

- Hidròlisi. A cada erlenmeyer s'afegeixen 30 mL de solució d'acetat de mercuri³ mesurats amb una proveta de 50 mL i s'agita durant un temps mínim de 20 minuts, a temperatura ambient. La mostra es filtra amb un filtre del número 2, rentant amb aigua desionitzada i recollint el filtrat i l'aigua de rentat, per després enrasar a 100 mL amb aigua desionitzada en un matràs aforat. Aquest filtrat es conserva a la nevera un màxim de 3 dies, encara que és convenient realitzar l'assaig el mateix dia.

- Oxidació. A partir d'aquest apartat es realitzen 4 repeticions per a cada mostra filtrada a l'etapa d'hidròlisi. S'agafen 500 μL del filtrat amb una micropipeta de 1000 μL i s'introdueixen en un tub d'assaig acabat en cunya, graduat a 10 mL i que contingui tap. Sota una campana d'extracció s'afegeix 1 gota d'HCl concentrat mitjançant una pipeta Pasteur⁴ i s'agita suau i manualment. L'addició d'HCl és per separar el mercuri

de l'estructura, el qual passa ràpidament. Quan la solució es vegi de nou transparent s'addicionen 500 µL de la solució de periodat. Agitar de nou manualment o amb un vòrtex si se'n disposa i deixar en repòs durant 20 minuts, a temperatura ambient. És important realitzar les agitacions sempre de la mateixa manera.

- Passats els 20 minuts agitar una mica, afegir 2 mL de solució d'arsenit i agitar immediatament després fins aconseguir una bona mescla. A continuació tancar i observar el canvi de color de la solució, passant d'incolòr a groc, després a marró, posteriorment a groc i finalment a incolòr de nou. Això passa entre 30 segons a 2 minuts i a la paret del tub és possible que es vegin unes taques que ajudaran a la formació de I₂ sòlid (color marró), que és un catalitzador de la reacció. Agitar manualment fins aconseguir que desaparegui el color marró de la mostra. Si no desapareix i s'observa un precipitat, afegir solució KI, gota a gota, realitzant una agitació després de cada gota, fins que desaparegui el precipitat de color marró.

- Ajustar a un volum de 10 mL amb la solució d'àcid tiobarbitúric i agitar manualment 2 o 3 vegades assegurant una mescla eficient (mantenir tancat). Escalfar en un bany d'aigua a 50°C durant 10 min. És important que el temps de reacció sigui el més exacte possible, principalment si la medició es realitza mitjançant espectroscòpia UV i no mitjançant HPLC.

- Finalitzat el temps de reacció ja es pot mesurar directament l'absorbància a 549 nm i a 700 nm en un espectrofotòmetre UV, realitzant prèviament una línia de base amb aigua desionitzada. No agitar o refredar els tubs per evitar que es produeixi una ràpida precipitació. Normalment es poden mesurar fins a 30 mostres abans que comenci a produir-se la precipitació. Tenir la precaució d'introduir la solució a les cubetes de l'espectrofotòmetre mitjançant una pipeta Pasteur, agafant del sobrenedant, per tal d'evitar que es remogui la mostra, i recollir part del precipitat format.

La Figura 2-4 mostra les reaccions bàsiques que tenen lloc durant el procés d'hidròlisi i oxidació de la mostra per la determinació dels grups HexA.

3. Càlculs

A partir dels valors d'absorbància a 549 y 700 nm, i havent calculat el pes sec de pasta a partir de la sequetat de la mostra, es pot calcular el contingut en HexA segons la següent expressió:

$$\text{HexA} = 0,1318 \cdot \frac{V_T}{V_p} \cdot \frac{A_{549} - A_{700}}{P_s} \quad \text{Eq. 2-9}$$

on:

HexA Contingut de grups hexenurònics expressat en $\left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{g. p.s.}} \right)$

V_T Volum total preparat en mL (100 mL)

V_p Volum parcial oxidat en mL ($0,5^5$ mL)

A_{549} Absorbància mesurada a 549 nm

A_{700} Absorbància mesurada a 700 nm

P_s Pes sec de la mostra en g

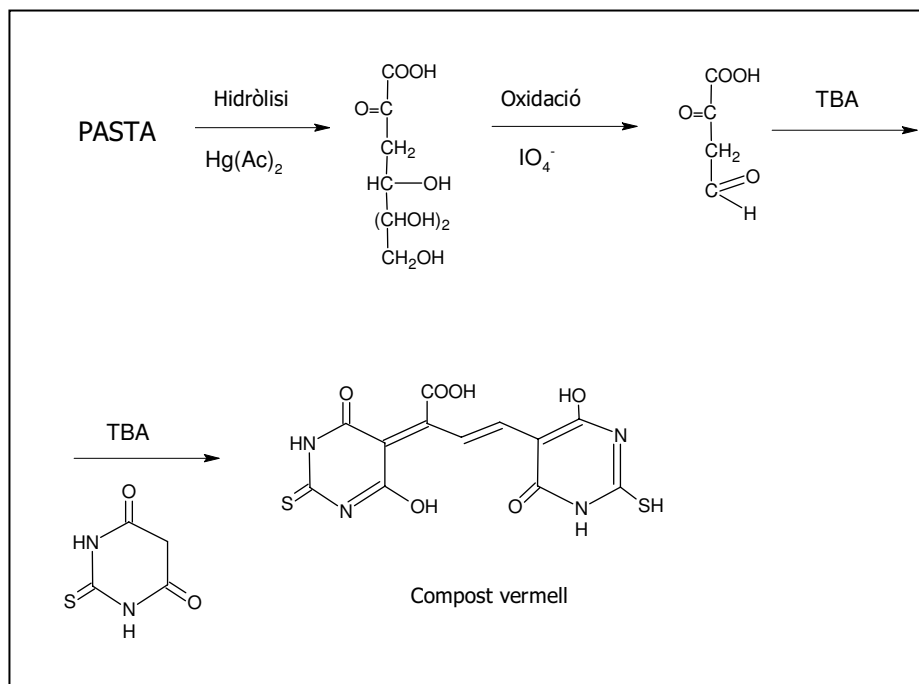


Figura 2-4. Reaccions bàsiques que tenen lloc durant la hidròlisi i l'oxidació de la pasta per la medició dels grups HexA (Gellerstedt i Li, 1996)

Notes

¹ La quantitat de mostra hauria de ser tal que donés un valor d'absorbància al final, entre 0,8 i 1,5, per tal de reduir els errors de lectura. Tot i així, es poden tenir alguns errors en pastes amb elevats índex kappa. No és necessari eliminar els extractius de la pasta, ja que aquest tipus d'extractius no interfereixen en la mesura dels grups HexA.

² L'estat inicial de la pasta (és a dir, si està totalment seca o humida) no afecta a la determinació dels HexA. L'important és que la mostra quedi ben inflada i desfibrada, abans de realitzar la hidròlisi i oxidació, pel què s'ha de deixar la pasta en aigua el temps necessari (pot ser aconsellable deixar-la una nit).

³ Si la mostra no és d'1 g, variar els volums segons la relació 1 (g de pasta) : 30 (mL d'aigua) : 30 (mL de solució d'acetat).

⁴ Les addicions de tots els reactius en el tub d'assaig sempre es realitzaran recolzant la punta de la pipeta a la paret del tub i el més a prop possible de la solució interior, però sense tocar-la.

⁵ El valor d'absorbància de les mostres analitzades ha d'estar entre 0,8 i 1,5, per reduir els errors de lectura. Si no és així, es pot variar la quantitat de pasta analitzada (pel què s'hauran de variar els volums de la hidròlisi (veure nota 3) o bé es pot variar el volum de filtrat que s'oxida, el què s'haurà de tenir en compte a la fórmula donat que aleshores V_p serà diferent a 0,5 mL.

2.5 CARACTERITZACIÓ DELS EFLUENTS

Per la caracterització dels efluents es determina la Demanda Química d'Oxigen (DQO) i el Color segons les normes ASTM D1252-00 i ASTM D1209-00, respectivament. Per a la realització d'aquestes propietats s'utilitza el procediment basat en la mesura mitjançant espectrofotòmetre UV (model UV-1603 de Shimadzu). Les longituds d'ona que s'utilitzen són de 600 nm per la DQO i 465 nm pel Color. Els resultats es corregeixen amb el factor de dilució utilitzat a cada mostra. També es mesura el pH final dels efluents de cada etapa.

2.5.1 Cromatografia en capa fina

Pels assaigs de cromatografia en capa fina s'apliquen 150 µl dels efluents gota a gota amb una micropipeta de 10 µl en una placa de sílica gel que és la fase sòlida. A continuació s'apliquen a la mateixa placa 10 µl del patró de Xiloses i 5 µl del patró de

Glucoses; el patró de xiloses consta de: X1 (xilosa); X2 (xilobiosa); X3 (xilotriosa) i X4 (xilotetraosa), i el patró de glucoses consta de: G1 (glucosa) i G2 (cel·lobiosa). Seguidament, s'introdueix la placa en una cubeta de vidre a on hi ha la fase mòbil, la qual consisteix en cloroform, àcid acètic glacial i H₂O en una relació de 6: :1, respectivament. Es deixa que pugi l'eluent fins arribar a una altura de 5 cm per sota de la part superior de la placa. Posteriorment, aquesta es retira i es deixa assecar a l'aire sota la campana extractora fins que s'evapori l'eluent; es repeteix l'elució dues vegades més. Posteriorment, la placa de sílica gel es polvoritza amb la solució de revelat que consisteix en un esprai Fungilab S.A. amb una solució del 5% d'H₂SO₄ en etanol. S'introdueix a l'estufa a 100°C durant un temps mínim de 5 minuts que podria prolongar-se fins a 1 hora. Aquest revelat permet identificar els diferents compostos dissolts a l'eluent que es determinen per comparació amb els patrons.



Figura 2-5. Muntatge de la cromatografia en capa fina

2.5.2 Espectre d'absorbància UV-Visible

Aquest anàlisi s'ha realitzat als capítols 5 i 6 dels efluents que s'obtenen del pretractament enzimàtic amb xilanasa (X). Es basa en la norma Tappi 222 om-02 per a determinar el contingut en lignina dissolta en els efluents a 205 nm. L'assaig consisteix en realitzar un espectre d'absorbància UV-Visible entre les longituds d'ona de 190 a 900 nm dels efluents a través d'un espectrofotòmetre UV (model UV-1603 de Shimadzu).

2.6 CONDICIONS ANALÍTIQUES DE LA PIRÒLISI

El present anàlisi ha estat realitzat a l'Institut de Recursos Naturals i Agrobiologia (I NA_S) del CSIC (Consell Superior d'Investigacions Científiques) a Sevilla, Espanya.

Per tal d'evidenciar els canvis produïts a la lignina de les pastes, aquesta s'analitza per piròlisi cromatografia de gasos - espectrometria de masses (Py-GC/MS) (del ío *et al.*, 2001). Aproximadament 0,1 mg de pasta seca s'introdueixen un tubs de quars, i s'introdueix en un porta mostres CDS Pyroprobe AS-2500. La piròlisi es du a terme a 550°C durant 10 s, i la càmera (250°C) es purga amb Heli. El pirolitzador es connecta a un cromatògraf de gas Agilent 6890, previst d'una columna injectora i una columna capil·lar de cristall de silici (DV-1 01, 60 m * 0,25 mm de diàmetre intern, i 0,25 µm d'espessor de pel·lícula) unit a un espectròmetre de masses Agilent 59 3 N. El forn de GC s'escalfa de 45°C (4 min) a 280°C a 4°C/min, i es manté durant 15 min. L'injector i la línia de transferència es mantenen a 250°C i 280°C, respectivament. Els compostos s'identifiquen per fragmentografia de masses, i comparant el seu espectre amb aquells disponibles a la literatura (Faix *et al.*, 1990; alph i Hatfield, 1991) i a les llibreries de Wiley i NIST.

2.7 CROMATOGRAFIA DE GASOS (GC) I CROMATOGRAFIA DE GASOS/ESPECTROMETRIA DE MASSES (GC/MS)

El present anàlisi ha estat realitzat a l'Institut de recursos Naturals i Agrobiologia (I NA_s) del CSIC (Consell Superior d'Investigacions Científiques) a Sevilla, Espanya. S'ha realitzat per a determinar els canvis produïts a la lignina, i el contingut en àcids grassos i esterols lliures de la pasta els quals es mostren al capítol 15 de discussió general.

Els anàlisis de GC i GC/MS es realitzen segons la metodologia prèviament desenvolupada (Gutiérrez *et al.*, 1998). **Els anàlisis de GC** es duen a terme en un sistema GC Agilent 6890N Network, utilitzant una curta columna capil·lar de cristall de silici (D -5HT; 5 m * 0,25 mm I.D., amb 0,1 µm d'espessor de pel·lícula) de J&W Scientific. La programació de la temperatura comença a 100°C i es manté durant 1 minut, i després s'augmenta a la temperatura final de 350°C a 15°C/min, i es manté durant 3 min. Les temperatures de l'injector, i del detector de ionització a la flama (FID) són de 300°C i 350°C, respectivament. El gas transportador és heli a una taxa de 5mL/min, i l'injecció es du a terme en el mode "splitless". Els pics es quantifiquen per àrea als cromatogrames GC.

Els anàlisis de GC/MS es realitzen en un cromatògraf de gasos Varian Star 3400 acoblat a un detector de trampa de ions (ITD, Varian Saturn 2000) utilitzant una columna capil·lar de mitjana longitud (12 m) de les mateixes característiques descrites anteriorment. El forn s'escalfa de 120°C (1 min) a 380°C a 10°C/min i es manté durant 5 minuts. També s'utilitzen columnes més llargues (30 m) quan és necessari. La línia

de transferència es manté a 300°C. L'injector es programa a la temperatura de 120°C (0,1 min) a 380°C amb una rampa de 200°C/min i es manté fins el final de l'anàlisi. L'heli s'utilitza com a gas transportador a una taxa de 2 mL/min. Els compostos s'identifiquen comparant el seu espectre de masses amb els de les llibreries de Wiley i NIST, per fragmentografia de masses, i comparant amb els estàndards.

2.8 REFÍ I PROPIETATS FÍSQUES DELS PAPERS

Les pastes blanquejades es refinan entre 4500 i 000 revolucions, mitjançant un molí PFI segons norma ISO 5264-2. De la pasta refinada es mesura la resistència al drenatge pel mètode Schöpfer-iegler (ISO 526) així com l'índex de retenció d'aigua (TAPPI 256 um-91), el consum específic i la longitud mitjana aritmètica de la fibra (TAPPI T 2 1 om-0) i el tant per cent de fins.

Amb les pastes sense refinar i refinades a diferents revolucions es realitzen 10 fulles (ISO 5269-2) per tal de determinar el gramatge, l'espessor i volum específic, així com les següents propietats físiques dels papers: permeabilitat endtsen, índex de tracció, longitud de ruptura, resistència al rebentament, índex de rebentament, i índex d'estripada, segons les normatives indicades a la Taula 2-5.

Taula 2-5. Propietats físico-mecàniques dels papers amb les seves normatives corresponents

Propietat	Norma ISO	Unitats
Gramatge	536	g/m ²
Espessor	534	µm
Volum específic	534	mL/g
Permeabilitat endtsen	5636	µm/Pa·s
Índex de tracció	1924	Nm/g
Longitud de ruptura	1924	km
esistència al rebentament	2 58	kPa
Índex de rebentament	2 58	kPa·m ² /g
Índex d'estripada	19 4	mN·m ² /g

2.9 ANÀLISI DE LES FIBRES PER MICROSCOPIA ELECTRÒNICA D'ESCOMBRAT (SEM)

Aquest anàlisi s'ha realitzat per l'empresa Torrasapel S.A., a Girona. Es du a terme un estudi de microscopia electrònica d'escombrat mitjançant un microscopi Stereoscan S-

260 Leica Cambridge, 25 kV. S'utilitza un Detector SE (scintillator backscattered detector), el qual permet identificar la composició elemental de la mostra analitzada a través d'un sistema de microanàlisi de raigs X (EDX), 260-ixl LINK, Leica Cambridge.

2.10 ENVELLIMENT DE LES PASTES

Es realitza un envelliment a la llum sobre les pastes. L'envelliment a la llum es realitza en un aparell *Suntest* (CPS+ de Heraeus Industrietechnik), equipat amb una font de Xenó i un filtre UV que permet simular la llum del dia. Es fixa la temperatura a 30°C y els temps d'exposició assajats són: 30 minuts, 1, 4, 8, 24, 48 i 2 hores. Després de l'assaig es mesura la blancor.

2.11 PLA D'EXPERIÈNCIES

Als capítols 7 i 8 s'utilitzen plans experimentals per optimitzar les condicions de tractament de l'etapa L. En aquest apartat es mostra l'esquema general de la planificació seqüencial que es du a terme (Figura 2-6).

D'una banda es realitza un anàlisi del factorial a 2 nivells: s'obté el model saturat, es calculen les semizetes per poder eliminar els efectes no significatius i estimar, així, els coeficients significatius, a més de realitzar l'anàlisi de la variància. D'altra banda, amb les tres repeticions en el centre i la seva variància, juntament amb la variància del model saturat, es calcula el valor de la F de Snedecor per determinar si la variància és homogènia o heterogènia. Si és homogènia, es calcula el model lineal, obtenint els termes significatius i observant si hi ha curvatures. En el cas d'existir termes quadràtics, s'hauran de desconfondre realitzant noves experiències. Si la variància és heterogènia s'ha de repetir dos cops el factorial per modelitzar la variabilitat i calcular el nou model lineal. Els resultats experimentals s'analitzen amb el programa "Excel" mitjançant el "mètode de regressió pas a pas cap enrere". Per la representació dels gràfics de tres variables s'utilitza el programa Sigmaplot (v 9.0).

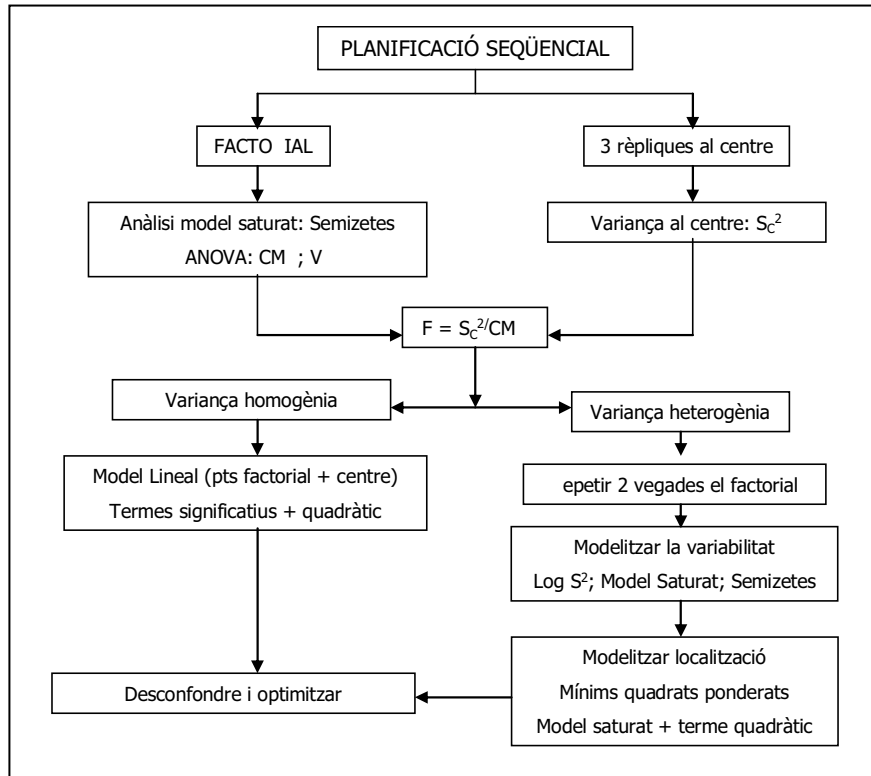


Figura 2-6. Esquema de la planificació seqüencial (Pepió i Polo, 2000)

2.12 TRACTAMENTS REALITZATS A L'INRA (MARSELLA)

A continuació es descriuen diferents tractaments realitzats a l'UM 1163 IN A "Universités de Provence et de la Méditerranée de iotechnologie des Champignons Filamenteux de Marseille", Marsella, França. Els resultats d'aquests tractaments es discuteixen als capítols 11, 12 i 13.

2.12.1 Determinació de les constants cinètiques

Per tal de realitzar els assaigs per a calcular els paràmetres cinètics d'un enzim amb un substrat (en aquest cas el substrat és el mediador) cal conèixer la longitud d'ona a la qual es pot detectar el radical format a causa de l'oxidació del mediador, així com l'epsilon (ϵ) d'aquella longitud d'ona. Per a realitzar aquests assajos s'utilitza l' "escalfa cubetes" que es mostra a la Figura 2- (a) i un espectrofotòmetre "Perkin elmer UV/Vis, Lambda 12" (Figura 2- (b)).

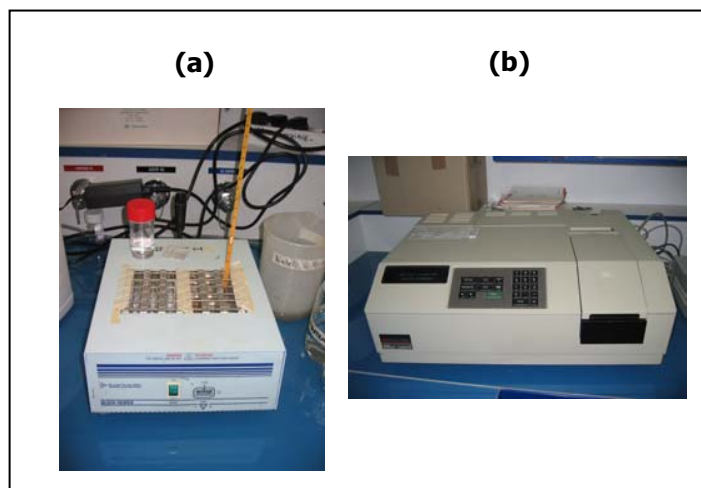


Figura 2-7. Estufa "escalfa cubetes" (a) i espectrofotòmetre (b)

Per calcular les constants cinètiques, primer de tot s'ha d'obtenir una corba de formació de producte (mediadors oxidats) en funció del temps. Per obtenir aquesta corba s'utilitzen cubetes de metacrilat que contenen tartrat de sodi i el mediador a diferents concentracions; al afegir la lacasa a la mostra es desencadena la reacció (la concentració de substrat ha de ser gran front la concentració d'enzim). En el moment d'afegir la lacasa es mesura l'absorbància de la mostra a la longitud d'ona determinada per a cada mediador. A mesura que els mediadors siguin oxidats per la lacasa, anirà augmentant l'absorbància ja que augmentarà la quantitat del radical del mediador que és el que absorbeix en aquella longitud d'ona. Es deixa que la reacció continuï durant un temps determinat que dependrà de la velocitat en què la lacasa oxidi el mediador. D'aquí s'obtenen rectes que corresponen a la formació de producte en funció del temps, el pendent de la recta és més pronunciat al augmentar la concentració de mediador.

A partir d'aquestes rectes es pot calcular la **velocitat inicial**, la qual correspon a la tangent de la corba, a partir de les Eq. 2-10 - Eq. 2-13:

$$\nabla \text{Abs} = \text{Abs final} - \text{Abs inicial} \quad \text{Eq. 2-10}$$

$$\nabla [\text{Mediador}] = \nabla \text{Abs} / \epsilon \quad \text{Eq. 2-11}$$

$$\nabla \text{Temps} = \text{Temps final} - \text{Temps inicial} \quad \text{Eq. 2-12}$$

$$\text{Velocitat inicial} = \nabla [\text{Mediador}] / \nabla \text{ Temps}$$

Eq. 2-13

on "Abs." indica absorbància

Càlcul de l' ϵ

L'èpsilon (ϵ) és característic per a cada longitud d'ona i relaciona la l'absorbància amb les propietats del material travessat. Les mostres que contenen el mediador a diferents concentracions i la lacasa amb el tampó tartrat, s'atemperen en un "escalfa cubetes" a 30°C el temps necessari per a què la lacasa oxidi tot el mediador. En aquest punt l'absorbància de la mostra correspon a la concentració de mediador inicial. A partir de la llei de Beer-Lambert es pot calcular l'èpsilon. En òptica, la llei de Beer-Lambert és una relació empírica que posa en relació l'absorbància de la llum amb les propietats del material en el qual passa. Àsicamente, la llei estableix que l'absorbància és proporcional a la concentració de molècules que absorbeixen llum a la mostra (Eq. 2-14).

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Eq. 2-14

on "A" és el valor d'absorbància quan tot el mediador està oxidat; " ϵ " és el coeficient d'absortivitat molar; "l" és la distància que travessa la llum a través del material (1 cm) i "c" és la concentració de les molècules absorbents dins el material.

L' ϵ es pot calcular representant gràficament l'absorbància en funció de la concentració de mediador. La pendent de la recta que s'obté correspon a l'èpsilon.

Càlcul de V_{MAX} , K_M , K_{CAT} i E

Les constants de Michaelis (K_m) i les velocitats màximes de reacció (V_{max}) s'han determinat a partir de la representació en doble inversa de Lineweaver-Burk, fent variar les concentracions respectives dels diferents mediadors dins el medi de reacció a pH 4 i 30°C. A la Figura 2-8 es mostra gràficament un exemple de representació de Lineweaver-Burk, on [Mediador] indica la concentració de mediador i V indica velocitat inicial.

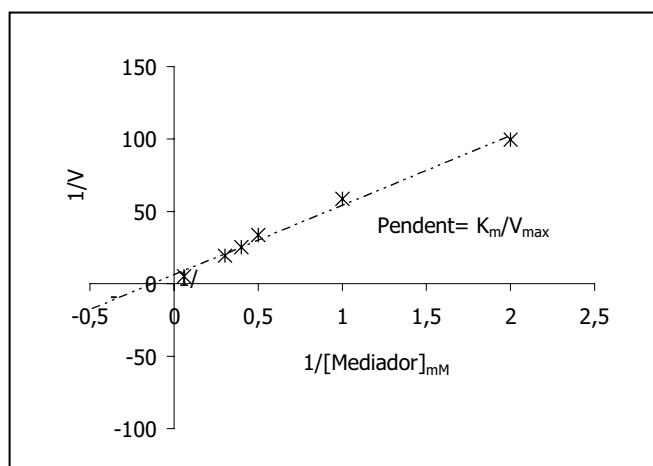


Figura 2-8. Representació de Lineweaver-Burk

Una vegada es coneixen la K_m i la V_{max} es calcula la constant de catàlisi (K_{cat}) i l'eficàcia catalítica de l'enzim (E) segons les Eq. 2-15 - Eq. 2-1 , tenint en compte que l'activitat específica (A_s) de la lacasa és de 234 U/mg i que el seu pes molecular (PM) és de 0000 mg/mmol.

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[lacasa]} \quad \text{Eq. 2-15}$$

$$E = \frac{K_{cat}}{K_m} \quad \text{Eq. 2-16}$$

$$[lacasa]_{mM} = [lacasa \text{ tractaments}]_{U/l} * \frac{1}{A_s \text{ lacasa}(U/mg)} * \frac{1}{PM \text{ lacasa} (mg / mmol)} \quad \text{Eq. 2-1}$$

2.12.2 Activitat de la lacasa

L'activitat de la lacasa ha estat determinada mesurant l'oxidació del 5mM 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonat) (A TS) amb el tampó tartrat de sodi 50 mM, pH 4 a 30°C durant 30 segons. La formació del catió radical de l'A TS és monitoritzat a 420 nm ($\epsilon_{420}=36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Una unitat d'activitat enzimàtica és definida com la quantitat d'enzim que transforma 1 μmol de substrat per minut.

2.12.3 Activitat de la tirosinasa

Per a determinar l'activitat de la tirosinasa es mesura l'activitat monofenolasa i difenolasa. L'activitat monofenolasa correspon a la velocitat d'oxidació d' 1,25 mM d' L-tirosina en tampó fosfat de sodi (50mM, pH 6,8) a 30°C determinat a 484 nm ($\epsilon = 22300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en presència de 5 mM d' M TH (3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona) i de L-DOPA tal que $[\text{L-DOPA}]/[\text{L-tir}]=0,05$. L'activitat difenolasa correspon a la velocitat d'oxidació de 4,2 mM d' L-DOPA en tampó fosfat de sodi (50 mM, pH 6,8) a 30°C determinat a 484 nm ($\epsilon = 22300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en presència de 5 mM d' M TH.

2.12.4 Concentració de proteïnes

La dosificació de les proteïnes es realitza seguint la tècnica de Bradford mitjançant el reactiu Bradford. S'utilitzen cubetes de metacrilat d'1 mL. Primerament es realitza una recta patró amb BSA (albúmina sèrica bovina) a diferents concentracions (5, 10, 15 i 20 $\mu\text{g/mL}$). El blanc consisteix en aplicar 800 μl d'aigua i 200 μl de reactiu, i a la mostra, enlloc de l'aigua s'afegeix la mostra problema a la dilució corresponent. Una vegada afegit el reactiu, s'agita, es deixa reposar 10 minuts i es realitza la mesura d'absorbància a 595 nm.

2.12.5 Anàlisi electroforètic

Es realitza un anàlisi d'electroforesi de proteïnes en condicions desnaturalitzants: SDS-Page (gel de poliacrilamida amb dodecil sulfat de sodi). L'electroforesi es realitza sobre gels d'acrilamida al 10% segons el mètode de Laemmli, (1970). Abans de ser carregada sobre el gel, la mostra es dilueix dues vegades a la solució de Laemmli (tampó Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8 contenint 1% (p/v) d' SDS, 5% (v/v) de β -mercaptoetanol, 25% (v/v) de glicerol, i 0,01% (p/v) de blau de bromofenol), seguidament es desnaturalitzen escalfant-les a 100°C durant 5 minuts. La mostra es carrega a diferents concentracions (μg): 4, 10, 20 i 40. El tampó de migració és un tampó Tris-HCl 24,8 mM, pH 6,8, que conté 14,4 g/l de glicina i 0,5 g/l d' SDS. Les mostres es fan migrar 1 hora a 30 mA i 120 V, i després 2h a 60 mA i 200 V. Una mescla de proteïnes de masses moleculars conegudes (α -lactoalbúmina (14,4 KDa), inhibidor de tripsina (20,1 KDa), anhidrasa carbònica (30 KDa), ovalbúmina (45 KDa), albúmina bovina sèrica (66 KDa) i fosforilasa b (9,4 KDa)) és utilitzada com a marcador de pes.

Les proteïnes són revelades per una coloració al nitrat d'argent (blue) durant tota la nit. El gel es decolora amb una solució que conté 250 mL de metanol l^{-1} , 10 mL d'àcid acètic l^{-1} i 680 mL l^{-1} d'aigua destil·lada.

2.12.6 Purificació de la tirosinasa per "diaflow"

S'utilitza una membrana de 10 KDa per a retenir les proteïnes. Primer de tot es renta la membrana amb alcohol i aigua. Un cop realitzat el muntatge, es fa passar aigua destil·lada a través de la membrana. Quan tota l'aigua s'hagi filtrat es fa passar el tampó fosfat pH , seguidament (sense deixar que la membrana s'assequi) s'hi afegeix el líquid amb la proteïna que es vol concentrar. Finalment, realitzar un rentat amb tampó fosfat pH . Per últim, recollir el lleixiu en eppendorfs, mesurar l'activitat i congelar a -80°C al 5% en glicerol. També cal mesurar l'activitat del filtrat per assegurar-se que la proteïna no ha traspasat la membrana.

2.12.7 Ultrafiltració

Aquest tractament es realitza per a concentrar l'extracte obtingut de la fermentació per a la producció de tirosinasa. Cal rentar bé la membrana amb aigua destil·lada abans d'utilitzar-la. El mètode consisteix en fer passar l'extracte de la fermentació a través de la membrana. S'aconsegueix concentrar 6 vegades la mostra.

2.12.8 Tractament al sulfat de protamina

El tractament al sulfat de protamina es realitza amb la finalitat d'eliminar els pigments de l'extracte de la fermentació els quals han estat produïts per *A.niger*. També s'eliminen possibles àcids nucleics, lípids i polisacàrids (Kanda *et al.*, 1996)

El sulfat de protamina (0,0 5% p/v) s'afegeix lentament a l'extracte cel·lular, després, la mescla s'agita lentament durant 2 hores a 4°C. Seguidament es centrifuga a 3000 x g (rotor SH-3000, Sorvall C5C) i a 4°C, durant 30 minuts.

El sobrenedant es recupera i es dialitza per diaflow amb tampó fosfat de sodi 25 mM i pH .

2.12.9 Seqüències de blanqueig

A continuació es descriuen les condicions per a realitzar els diferents tractaments enzimàtics. Els tractaments que es realitzen amb poca quantitat de pasta (10 g) es realitzen amb el reactor a pressió que es mostra a la Figura 2-9. Els tractaments amb gran quantitat de pasta (150 g) es realitzen amb el reactor que es mostra a la Figura 2-10.

2.12.9.1 Etapes de pretractament enzimàtic (X o F)

Els pretractaments amb xilanasa (X) es realitzen amb 3 U/gps de xilanasa, al 5 % de consistència i pH 4 (ajustat amb tampó tartrat de sodi 50 mM), 0,1 % de tween 20, a 50°C i durant 2 hores amb agitació.

Els pretractaments amb ferulat esterasa (F) es realitzen amb 10 U/gps de ferulat esterasa, al 5 % de consistència i pH 4 (ajustat amb tampó tartrat de sodi 50 mM), 0,1 % de tween 20, a 50°C i durant 2 hores amb agitació.

Passat el temps de pretractament la pasta no es renta i es realitza directament l'etapa L a les condicions corresponents.

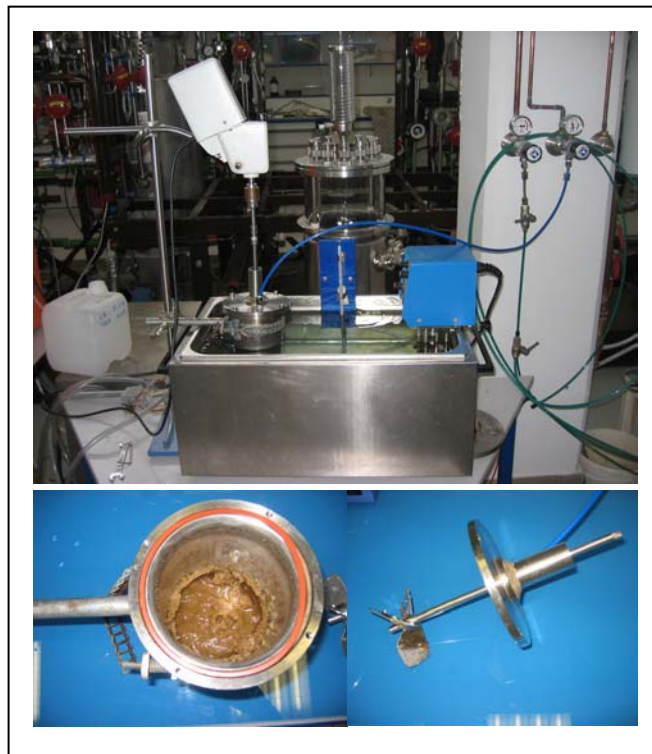


Figura 2-9. Reactor per a tractar poca quantitat de pasta

2.12.9.2 Etapa de tractament amb el sistema lacasa mediador (L)

Els tractaments L es realitzen amb 20 U/gps de lacasa, al 3 % sps d'H T ($L_H \tau$) o bé a l'1% sps d'NHA (L_{NHA}), al 5 % de consistència i pH 4 (ajustat amb tampó tartrat de

sodi 50 mM), 0,1 % de tween 20, a 50°C durant 4 hores amb agitació, i a 100 kPa de pressió d'O₂.

En els casos on hi ha hagut una etapa prèvia de pretractament enzimàtic, ja sigui una etapa F o una etapa X, en l'etapa de tractament L només cal afegir la lacasa, el mediador i la pressió d'O₂.

Després del tractament L es filtra la pasta, es recuperen els lleixius i es renta amb aigua destil·lada abans de realitzar-hi l'extracció alcalina.



Figura 2-10. Reactor per a tractar gran quantitat de pasta

2.12.9.3 Etapa d'extracció alcalina (E)

L'etapa d'extracció alcalina (E) es realitza al 2% de NaOH, al 5 % de consistència ajustada amb aigua destil·lada, a 0°C durant 90 minuts amb agitació.

Després de l'etapa E es filtra la pasta, es recuperen els lleixius, es renta amb aigua destil·lada i se'n caracteritzen les seves propietats.

2.13 REFERÈNCIES

Ianco, A., Díaz, P., Zueco, J., Parascandola, P. i Pastor, F.I.J. (1999) A multidomain xylanase from a *acillus* sp. with a region homologous to thermostabilizing domains of thermophilic enzymes. *Microbiology* 145:2163-21 0.

- Ianco, A., Díaz, P., Martínez, J., Lopez, O., Soler, C. i Pastor, F.I.J. (1996) Cloning of a *acillus* sp. P-23 gene encoding a xylanase with high activity against aryl xylosides. FEMS Microbiology Letters 13 (2):285-290.
- Chai, X.S., Zhu, J.Y. i Li, J. (2001) A Simple and rapid Method to Determine Hexeneuronic Acid Groups in Chemical Pulps. Journal of Pulp and Paper Science 2 (5):165-170.
- del Río, J.C., Gutiérrez, A., Romero, J., Martínez, M.J. i Martínez, A.T. (2001) Identification of residual lignin markers in eucalypt kraft pulps by Py-GC/MS. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 58/59:425-433.
- Faix, O., Meier, D. i Fortmann, I. (1990) Thermal degradation products of wood. Holzwerkstoff 48:281-285.
- Gallardo, O., Díaz, P. i Pastor, F.I.J. (2003) Characterization of a *Paenibacillus* cell-associated xylanase with high activity on aryl-xylosides: a new subclass of family 10 xylanases. Applied Microbiology and Biotechnology 61:226-233.
- Gallardo, O., Díaz, P. i Pastor, F.I.J. (2004) Cloning and characterisation of xylanase A from the strain *acillus* sp. P- : comparison with alkaline pH-low molecular weight xylanases of family 11. Current Microbiology 48:26-29.
- Gallardo, O. (200) Caracterización de nuevas xilanasas bacterianas. Ingeniería de enzimas con la xilanasas de *Paenibacillus barcinonensis*. Tesis Doctoral. Departament de Microbiologia. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Barcelona, Espanya.
- Gallardo, O., Díaz, P. i Pastor, F.I.J. (200) Cloning and production of Xylanase from *Paenibacillus barcinonensis* in *acillus subtilis* hosts. Biocatalysis and Bioprocess Engineering 25(2-4):157-162.
- García Hortal, J.A. i Vidal, T. (1984) Blanqueo de Pastas en la Industria Papelera. Escola Tècnica superior d'Enginyeria Industrial i Aeronàutica de Terrassa. Universitat Politècnica de Catalunya. Terrassa, Espanya.
- Gellerstedt, G. i Li, J. (1996) An HPLC method for the quantitative determination of hexeneuronic acid groups in chemical pulps. Carbohydrate Research 294:41-45.
- Gutiérrez, A., del Río, J.C., González-Vila, F.J. i Martín, F. (1998) Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. Journal of Chromatography 823:449-455.
- Halaouli, S., Asther, M., Kruus, K., Guo, L., Hamdi, M., Sigoillot, J.C., Asther, M. i Lomascolo, A. (2005) Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. Journal of Applied Microbiology 98:332-343.

- Halaouli, S., record, E., Casalot, L., Hamdi, M., Sigoillot, J., Asther, M. i Lomascolo, A. (2006) Cloning and characterization of a tyrosinase gene from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*, and overproduction of the recombinant protein in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and biotechnology* 0:580-589.
- Kanda, K., Sato, T., Ishii, S., Enei, H. i Ejiri, S.I. (1996) Purification and properties of tyrosinase isozymes from the gill of *Lentinus edodes* fruiting body. *bioscience biotechnology and biochemistry* 60:12 3-12 8.
- Laemmli, U.K. (19 0) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of bacteriophage T4. *Nature* 22 :680-685.
- Lomascolo, A., Cayol, J.L., oche, M., Guo, L., obert, J.L., record, E., Lesage-Meessen, L., Ollivier, ., Sigoillot, J.C. i Asther, M. (2002) Molecular clustering of *Pycnoporus* strains from various geographic origins and isolation of monokaryotic strains for laccase hyperproduction. *Mycological research* 106:1193-1203.
- López, C., lanco, A. i Pastor, F.I.J. (1998) Xylanase production by a new alkali-tolerant isolate of *acillus*. *biotechnology Letters* 20:243-246.
- Oxley, P.W., Adger, .M. i Sasse, M.J. (1989) N-acetyl-N-phenyl-hydroxylamine via catalytic transfer hydrogenation of nitrobenzene using hydrazine and rhodium on carbon. *Organic Syntheses* 6 :18 -191.
- Pepió, M. i Polo, C. (2000) Apunts de l'assignatura de tercer cicle: Disseny d'experiments i optimització de processos. Departament d'Estadística i Investigació Operativa, Universitat Politècnica de Catalunya, Espanya.
- alph, J. i Hatfield, .D. (1991) Pyrolysis-GC-MS characterization of forage materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39:1426-143 .
- ecord, E., Asther, M., Sigoillot, C. *et al.* (2003) Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application. *Applied Microbiology and biotechnology* 62(4):349-355.
- Sanchez, M.M., Fritze, D., lanco, A., Sproer, C., Tindall, .J., Schumann, P., Kroppenstedt, .M., Diaz, P. i Pastor, F.I.J. (2005) *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro river delta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(2):935-939.