

## Capítol 11

# Avaluació de l'NHA pel sistema lacasa-mediador

### RESUM

L'elevat cost i la potencial toxicitat dels mediadors constitueix un dels principals problemes del sistema lacasa-mediador. L'NHA, igual que l'HBT, pertany al grup de mediadors amb un grup funcional N-OH els quals constitueixen els mediadors de la lacasa més efectius descrits fins el moment. L'NHA presenta l'avantatge respecte l'HBT de ser més barat i potencialment menys tòxic el què fa interessant el seu estudi per aplicar-lo en el sistema lacasa-mediador. En aquest capítol es demostra que l'NHA és millor substrat per la lacasa que l'HBT i que l'activitat de la lacasa evoluciona semblant front els dos mediadors durant el tractament L observant-se en els dos casos un efecte protector de la pasta d'eucaliptus. S'obté que el sistema  $L_{NHA}$  és igual d'eficient que el sistema  $L_{HBT}$  en deslignificar la pasta d'eucaliptus, i es demostra que amb un pretractament enzimàtic amb xilanasa i sobre pasta crua és quan s'obtenen les millors propietats de la pasta. Per últim, la voltametria cíclica reforça la utilització de l'NHA ja que s'obté que aquest presenta un potencial redox menor que l'HBT i a més mostra una reacció d'oxidació reversible i dependent de pH. A pH 5 el tractament  $L_{NHA}$  actua amb més eficiència sobre la pasta.

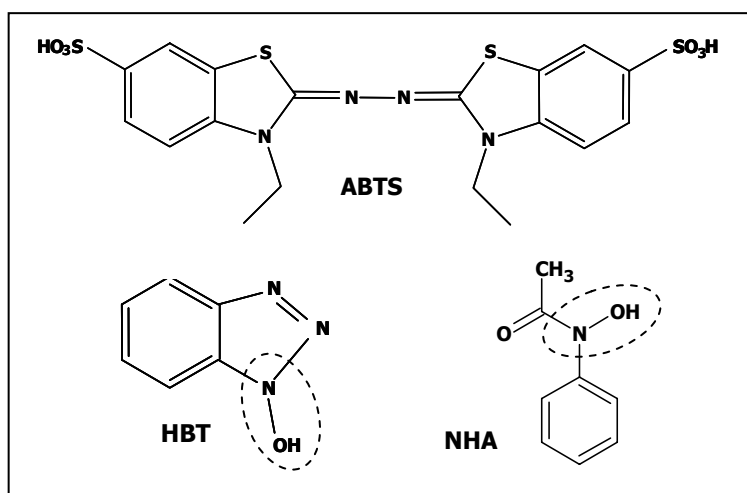
### 11.1 INTRODUCCIÓ

L'efectivitat d'un sistema lacasa-mediador per a degradar lignina depèn de les propietats de la lacasa, del mediador i de la seva combinació (Li *et al.*, 1999). El mediador d'un efectiu sistema lacasa-mediador ha de ser un bon mediador redox per a deslignificar bé la pasta, ha de ser un bon substrat per a la lacasa, tenir una vida mitja en la seva forma oxidada suficientment llarga per a permetre la difusió a la lignina heterogènea i el seu radical ha de tenir una alta potència d'oxidació per a oxidar la lignina efectivament. D'altra banda, la lacasa ha de tenir un alt potencial redox i ha de ser resistent a la inactivació pels radicals lliures del mediador (Li *et al.*, 1999). Els mediadors amb grups funcionals N-OH s'oxiden al seu radical corresponent (NO $\cdot$ ) en el tractament amb lacasa el qual és el responsable de l'alta oxidació de la lignina (Rocheffort *et al.*, 2004). Tanmateix, la seva naturalesa de radical causa alguns

problemes d'estabilitat el què limita el seu ús en la deslignificació ja que pot atacar la lacasa provocant una disminució en la seva activitat (Sigoillot *et al.*, 2005). Aquesta inactivació de la lacasa per part de la forma oxidada dels mediadors depèn del mediador utilitzat (Li *et al.*, 1999) i representa un inconvenient pel sistema lacasa-mediador.

Un altre dels problemes que presenta el sistema lacasa-mediador és l'elevat cost, la limitada biodegradabilitat i la potencial toxicitat dels mediadors. Per aquest motiu s'està impulsant la recerca de nous mediadors més barats i més respectuosos pel medi ambient. L'ABTS va ser el primer mediador utilitzat capaç de deslignificar la pasta (Bourbonnais i Paice, 1992) però actualment han estat estudiats altres tipus de mediadors, sent els que contenen un grup funcional N-OH els mediadors de la lacasa més efectius descrits per a deslignificar la pasta (Xu *et al.*, 2000), entre ells, l'HBT sembla ser el més eficaç descrit fins el moment (García *et al.*, 2003; Camarero *et al.*, 2004; Sigoillot *et al.*, 2005).

Recentment s'ha descobert la N-hydroxyacetanilida (NHA) que és un mediador sintètic, més barat i potencialment menys tòxic que l'HBT. Igual que aquest últim, pertany al grup de mediadors amb un grup funcional N-OH (Figura 11-1) i la seva efectivitat en deslignificar la pasta ha estat demostrada (Chakar i Ragauskas 2000; Balakshin *et al.*, 2001; Poppius-Levlin *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001).



**Figura 11-1. Estructura química dels mediadors de la lacasa ABTS, HBT i NHA**

En capítols anteriors (7-10) s'ha avaluat l'efecte del sistema lacasa-mediador en les diferents propietats de la pasta d'eucaliptus utilitzant com a mediador l'HBT, en els quals s'ha realitzat un pla estadístic per tal de reduir-ne la seva dosi d'aplicació. En

aquest capítol es vol avaluar la capacitat del sistema lacasa-NHA ( $L_{NHA}$ ) per a deslignificar i blanquejar la pasta kraft d'eucaliptus en comparació amb el sistema lacasa-HBT ( $L_{HBT}$ ).

## 11.2 MATERIALS I MÈTODES

### 11.2.1 Matèria prima

S'han utilitzat dos tipus de pastes kraft d' *Eucalyptus globulus*, una pasta crua (C) produïda per la fàbrica ENCE (Pontevedra, Espanya) i una pasta deslignificada amb oxigen (O) produïda a la fàbrica de Torraspapel.S.A (Saragossa, Espanya). Les característiques inicials d'aquestes pastes són les que s'indiquen a la Taula 11-1.

**Taula 11-1. Propietats inicials de les pastes**

	<b>Pasta C</b>	<b>Pasta O</b>
<b>Índex kappa</b>	11,8	7,7
<b>Blancor (%ISO)</b>	41,3	51,3

### 11.2.2 Enzims i mediadors

L'enzim principal utilitzat en aquest estudi ha estat una lacasa, però pels assajos de deslignificació s'ha utilitzat també una xilanasa i una ferulat esterasa.

La lacasa utilitzada és de *Pycnoporus cinnabarinus* (Lomascolo *et al.*, 2002) produïda per l'INRA (Marsella, França) de la soca monocariòtica hiperproductora ss3, amb una activitat de 1,95 U/mg. L'activitat de la lacasa ha estat determinada mesurant l'oxidació del 5mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic àcid) (ABTS) amb el tampó tartrat de sodi 50mM pH4 a 30°C durant 30 segons. La formació del catió radical de l'ABTS 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  $\mu\text{mol}$  de substrat per minut.

A l'apartat 11.3.5 s'ha utilitzat una lacasa recombinant amb un mòdul d'unió a la cel·lulosa (lacasa-CBM) produïda pels laboratoris de l'INRA.

Pels assajos de deslignificació s'han utilitzat dos enzims diferents (xilanasa i ferulat esterasa) a l'etapa de pretractament enzimàtic. La xilanasa (Pulzyme HC) ha estat subministrada per NOVOZYMES® i presenta una activitat de 332 U/mL, on una unitat d'activitat enzimàtica és definida com la quantitat d'enzim que transforma 1  $\mu\text{mol}$  de sucre reductor (mesurat com a equivalents de xilosa) de xilà per minut a 50°C i pH 5.

La ferulat esterasa (FAE A) ha estat produïda a partir d'una soca recombinant d'*Aspergillus Niger* (Record, *et al.*, 2003 ) a l'INRA (Marsella, França) amb una activitat de 38,76 U/mL, on una unitat d'activitat enzimàtica és definida com la quantitat d'enzim que catalitza l'alliberació d'1  $\mu\text{mol}$  d'àcid ferúlic per minut.

Els mediadors utilitzats han estat els mediadors sintètics 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic àcid) (ABTS), 1-hidroxibenzotriazol (HBT) i N-hidroxiacetanilida (NHA). L'ABTS i l'HBT han estat subministrats per Sigma-Aldrich i l'NHA ha estat sintetitzat segons Oxley, *et al.*, 1989, per la "Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II".

### **11.2.3 Paràmetres cinètics dels mediadors amb la lacasa**

#### **11.2.3.1 Oxidació de l'NHA per la lacasa. Longitud d'ona del radical**

Es realitzen espectres d'absorbància UV-Visible per tal de trobar la longitud d'ona a la qual absorbeix el radical de l'NHA. S'efectuen espectres de la lacasa sola, de l'NHA sol i de l'NHA amb la lacasa a diferents temps (0, 5 i 15 minuts). Per a realitzar aquest anàlisi s'utilitzen cubetes de quars i tampó tartrat de sodi 0,1M a pH 4. La concentració de lacasa és de 0,6U/mL i la concentració d'NHA és de 16,5 mM.

#### **11.2.3.2 Constants cinètiques de la lacasa amb l'ABTS, l'HBT i l'NHA**

L'objectiu és trobar les constants cinètiques de la lacasa de *P. cinnabarinus* ss3 utilitzada amb els mediadors ABTS, HBT i NHA.

Per a calcular els paràmetres cinètics d'un enzim amb un substrat cal conèixer la longitud d'ona en la qual es pot detectar el radical format a causa de l'oxidació del mediador, així com el coeficient d'extinció molar ( $\epsilon$ ) característic de cada longitud d'ona.

La formació del radical ABTS es determina monitoritzant l'absorbància a 420nm ( $A_{420}$ ),  $\epsilon_{420} = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Bourbonnais *et al.*, 1998). La formació del radical de l'HBT es determina monitoritzant l'absorbància a 408 nm ( $A_{408}$ ) (Ander i Messner, 1998), l' $\epsilon_{408}$  s'ha hagut de determinar. A l'apartat anterior es determina la longitud d'ona per a monitoritzar l'NHA i un cop coneguda se'n determina l' $\epsilon$  corresponent. Per a calcular l' $\epsilon$  es deixa la lacasa amb el corresponent mediador el temps necessari per a què la lacasa l'oxidi tot, en aquest moment ja no augmentarà el valor d'absorbància ja que tot el mediador estarà en forma de radical. A partir de la llei de Beer-Lambert es calcula l' $\epsilon$ :  $A = \epsilon lc$ , on  $\epsilon$  és el coeficient d'absortivitat molar,  $l$  és la distància que

travessa la llum a través del material (1 cm),  $c$  és la concentració inicial del mediador i  $A$  és el valor d'absorbància quan tot el mediador està oxidat.

Els assaigs es realitzen amb cubetes de metacrilat, tampó tartrat de sodi pH4 i a 30°C. La concentració de lacasa és de  $3,7 \cdot 10^{-4}$   $\mu$ M pels assaigs amb ABTS i de  $3,7 \cdot 10^{-2}$   $\mu$ M pels assaigs amb HBT i NHA (amb ABTS la concentració és inferior ja que la lacasa l'oxida més ràpidament). La concentració dels mediadors varia de 0,01 a 0,1 mM per a l'ABTS, de 1 a 14,7mM per a l'HBT i de 0,5 a 16,5mM per a l'NHA. Es determina la constant de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) i la velocitat màxima de reacció ( $V_{max}$ ) i a partir d'aquestes es calcula la constant de catàlisi ( $K_{cat}$ ) i l'Eficàcia ( $E$ ) segons les Eq. 11-1 a l'Eq. 11-3 tenint en compte que l'activitat específica ( $A_s$ ) de la lacasa és de 234 U/mg i que el seu pes molecular és de 70000 mg/mmol (veure capítol 2 materials i mètodes).

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[lacasa]_{mM}} \quad \text{Eq. 11-1}$$

$$E = \frac{K_{cat}}{K_m} \quad \text{Eq. 11-2}$$

$$[lacasa]_{mM} = [lacasa]_{U/l} * \frac{1}{A_s \text{ lacasa}(U/mg)} * \frac{1}{PM \text{ lacasa}(mg/mmol)} \quad \text{Eq. 11-3}$$

#### 11.2.4 Estabilitat de l'enzim durant l'oxidació dels mediadors i efecte protector de la pasta d'eucaliptus

S'ha seguit l'evolució de l'activitat de la lacasa al llarg de 4 hores en presència i absència dels mediadors HBT o NHA i en presència o absència de pasta. Els tractaments es realitzen en erlenmeyers de 250 mL a 50°C, amb tampó tartrat de sodi a pH 4 i amb agitació de 190 rpm. Cada hora s'extreu una mostra de lleixiu i es realitza la mesura de l'activitat de la lacasa segons s'ha descrit a l'apartat 11.2.2.

Han estat 6 els tractaments realitzats: 1- lacasa sola, 2- lacasa amb HBT, 3- lacasa amb NHA, 4- lacasa amb pasta, 5- lacasa amb HBT i pasta, 6- lacasa amb NHA i pasta. La concentració de lacasa és de 1 U/mL (o bé de 20 U/gps), les concentracions dels mediadors utilitzades són de 9,9 mM (o 3% sps) per l'HBT i de 3,3 mM (o 1% sps) per a l'NHA. Pels tractaments amb pasta s'utilitza la pasta crua (C) i es realitzen amb 5 gps al 5% de consistència.

L'oxidació de l'HBT per la lacasa és notablement més baixa que l'oxidació d'ABTS i requereix concentracions de substrat significativament més altes per a saturar l'enzim, d'acord a les respectives  $K_m$  (Li *et al.*, 1999). Per aquesta raó, la presència d'HBT no hauria d'interferir en la mesura de l'activitat lacasa utilitzant ABTS com a substrat.

En els tractaments on hi ha mediadors es segueix l'evolució de l'oxidació d'aquests i de la formació del seu radical, per això es mesura l'absorbància del lleixiu a 408 nm en els tractaments amb HBT ja que és en aquesta longitud d'ona on absorbeix el radical HBT i pels tractaments amb NHA a la longitud d'ona escollida segons els resultats de l'apartat 11.2.3.1.

### **11.2.5 Tractament enzimàtic de la pasta d'eucaliptus**

L'objectiu d'aquest apartat és avaluar la capacitat del sistema  $L_{NHA}$  de deslignificar i blanquejar la pasta kraft d'eucaliptus en comparació amb el sistema  $L_{HBT}$  que és el sistema més efectiu descrit fins ara. També es vol estudiar si el fet d'aplicar una pasta crua (IK 11,8) o una pasta deslignificada amb oxigen (Ik 7,7) afecta en l'eficàcia del sistema lacasa-mediador, i també si afecta el fet de realitzar un pretractament enzimàtic amb ferulat esterasa o amb xilanasa abans del tractament L.

#### **11.2.5.1 Disseny experimental**

Tenint en compte que es disposa de dos enzims per a realitzar una etapa de pretractament enzimàtic, la ferulat esterasa (F) i la xilanasa (X), de dos mediadors pel tractament amb lacasa (NHA i HBT) i de dues pastes que són la crua (C) i la deslignificada amb oxigen (O), es decideix realitzar un pla d'experiències per tal d'escollir la combinació més eficient per a realitzar una seqüència de blanqueig entre tipus de pretractament, tipus de mediador i tipus de pasta. Són 4 les variables que es volen estudiar:  $x_1 \equiv$  pretractament amb ferulat esterasa (absència (0) o presència (10)),  $x_2 \equiv$  pretractament amb xilanasa (absència (0) o presència (3)),  $x_3 \equiv$  mediador utilitzat (HBT o NHA) i  $x_4 \equiv$  tipus de pasta (C, O). Per a la realització del disseny factorial les variables s'han codificat en factors de dos nivells (-1 i +1) tal com es mostra a la Taula 11-2.

**Taula 11-2. Variables a estudiar amb els factors de cada nivell**

VARIABLES		-1	+1
Pretractament amb ferulat esterasa	$x_1$	0	10
Pretractament amb xilanasa	$x_2$	0	3
Tipus de mediador	$x_3$	HBT	NHA
Tipus de pasta	$x_4$	C	O

Com que es tenen 4 variables i dos nivells (-1 i +1), el pla d'experiències seria un disseny factorial  $2^4$  en el qual caldria realitzar 16 experiències, però se suposa que no hi ha interacció entre la variable ferulat esterasa ( $x_1$ ) i el mediador utilitzat ( $x_3$ ). Així doncs, la interacció doble entre els dos ( $x_1x_3$ ) fa de generador de la variable pasta ( $x_4$ ), quedant confosa la variable pasta amb la interacció doble  $x_1x_3 \equiv x_4$ . D'aquesta manera el disseny correspon a un disseny factorial fraccionat  $2^{4-1}$  on les experiències que calen realitzar es redueixen a 8. A la Taula 11-3 es mostren les experiències del model factorial fraccionat així com les condicions de cada experiència. L'objectiu d'aquest pla experimental és determinar els efectes individuals de cada variable i les seves interaccions.

**Taula 11-3. Experiències del model factorial fraccionat  $2^{4-1}$  amb les seves condicions**

$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	Dosi de Ferulat esterasa ( $U g^{-1}$ )	Dosi de xilanasa ( $U g^{-1}$ )	Mediador utilitzat	Tipus de pasta
-1	-1	-1	+1	0	0	HBT	O
+1	-1	-1	-1	10	0	HBT	C
-1	+1	-1	+1	0	3	HBT	O
+1	+1	-1	-1	10	3	HBT	C
-1	-1	+1	-1	0	0	NHA	C
+1	-1	+1	+1	10	0	NHA	O
-1	+1	+1	-1	0	3	NHA	C
+1	+1	+1	+1	10	3	NHA	O

Els resultats experimentals s'analitzen amb el programa "Excel" mitjançant el "mètode de regressió pas a pas cap enrere" (es descarten els termes amb probabilitat inferior a 0,05).

#### **11.2.5.2 Etapa de pretractament enzimàtic ( X o F )**

Els pretractaments amb ferulat esterasa (F) es realitzen sobre 10 gps, amb 10 U/gps de FAE, 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 xilanasa (X) es realitzen sobre 10 gps, 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.

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

#### **11.2.5.3 Etapa de tractament amb el sistema lacasa mediador (L)**

Els tractaments L es realitzen sobre 10 gps, amb 20 U/gps de lacasa, al 3 % sps d'HBT ( $L_{HBT}$ ) 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'O<sub>2</sub>.

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'O<sub>2</sub>.

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.

#### **11.2.5.4 Etapa d'extracció alcalina (E)**

L'etapa d'extracció alcalina (E) es realitza sobre 10 grams de pasta seca, al 2% de NaOH, al 5 % de consistència ajustada amb aigua destil·lada, a 70°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.

#### **11.2.5.5 Propietats de les pastes**

Per a la caracterització de les pastes s'ha determinat l'índex kappa segons la norma ISO-302 i la blancor segons la norma ISO-3688 després de l'etapa E.



A partir de l'índex kappa s'ha calculat el tant per cent de disminució de l'Ik o deslignificació segons l'Eq. 11-4.

$$\text{Deslignificació (\%)} = \frac{Ik_i - Ik_f}{Ik_i} * 100 \quad \text{Eq. 11-4}$$

on,

$Ik_i$  = índex kappa de la pasta inicial (C o O depenent del tractament)

$Ik_f$  = índex kappa final de la seqüència després de l'etapa E

A partir de la blancor obtinguda, s'ha calculat el tant per cent d'increment de blancor segons l'Eq. 11-5.

$$\text{Increment Blancor (\%)} = \frac{Bl_f - Bl_i}{Bl_f} * 100 \quad \text{Eq. 11-5}$$

on,

$Bl_i$  = blancor de la pasta inicial (C o O depenent del tractament )

$Bl_f$  = blancor final de la seqüència després de l'etapa E

### **11.2.6 Voltametria cíclica**

Els assajos de voltametria cíclica es realitzen al CNRS ("Centre National de la Recherche Scientifique", Marsella, França). L'elèctrode de treball utilitzat per aquesta experiència és un microelèctrode estacionari de platí i l'elèctrode de referència és de calomelans saturat (ECS). Per a convertir el resultat a l'elèctrode d'hidrogen (NHE) s'ha de sumar al resultat ECS 240 mV.

## **11.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ**

Per avaluar la capacitat del sistema lacasa-NHA ( $L_{NHA}$ ) per a deslignificar i blanquejar la pasta kraft d'eucaliptus en comparació amb el sistema lacasa-HBT ( $L_{HBT}$ ), primer de tot es comprova que la lacasa utilitzada és capaç d'oxidar l'NHA de manera eficient comparant els paràmetres cinètics de la lacasa-NHA amb els de la lacasa-ABTS i

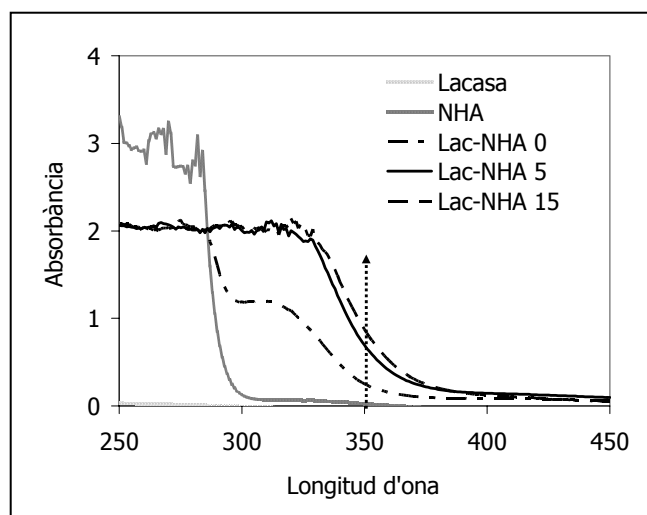
lacasa-HBT. Seguidament s'avalua l'estabilitat de la lacasa front l'NHA durant les condicions de tractament L i es compara amb l'estabilitat de la lacasa front l'HBT i posteriorment s'aplica el sistema  $L_{NHA}$  a la pasta d'eucaliptus i s'avalua el seu efecte en deslignificar i blanquejar la pasta en comparació amb el sistema  $L_{HBT}$ . Finalment es realitza un anàlisi per voltametria cíclica dels dos mediadors i es realitza un assaig de l'NHA amb gran quantitat de pasta.

### **11.3.1 Paràmetres cinètics dels mediadors amb la lacasa**

#### **11.3.1.1 Oxidació de l'NHA per la lacasa. Longitud d'ona del radical**

L'objectiu d'aquest apartat és trobar la longitud d'ona a la qual absorbeix el radical de l'NHA. Per això s'ha realitzat un espectre d'absorbància entre 450 i 250 nm de la lacasa sola, de l'NHA sol, i de l'NHA amb lacasa a temps 0, al cap de 5 minuts de reacció i al cap de 15 minuts (Figura 11-2). La lacasa sola no presenta gairebé absorbància en les longituds d'ona mesurades, l'NHA sol (sense lacasa i per tant sense ser oxidat) presenta un pic d'absorbància entre 300 i 250 nm. Al afegir la lacasa a l'NHA s'observa un canvi en l'espectre d'absorbància de l'NHA que és conseqüència de que la lacasa l'està oxidant i s'està formant el seu radical. Aquest radical presenta absorbància a una longitud d'ona determinada: a temps 0 augmenta l'absorbància entre 400 i 300 nm, de 400 a 315 va augmentant fins a les longituds d'ona entre 315 i 300 que s'estabilitza. De 300 a 250 nm que correspon a l'absorbància de l'NHA sense oxidar l'absorbància és menor que en l'espectre de l'NHA sol. Al cap de 5 minuts d'estar reaccionant la lacasa amb l'NHA s'observa el mateix espectre que a temps 0 però amb més absorbància, el què indica que ha augmentat la quantitat de radical NHA. Després de 15 minuts l'absorbància entre les longituds d'ona de 370 i 330 nm augmenta només lleugerament respecte els 5 minuts la qual cosa indica que ja gairebé no es forma més radical NHA, segurament perquè està sent tot oxidat per la lacasa.

A partir d'aquests resultats es decideix utilitzar la longitud d'ona de 350 nm per a realitzar els estudis d'oxidació de l'NHA ja que en aquesta longitud d'ona s'observa bé l'augment del radical NHA al llarg dels diferents temps d'estar sent oxidat per la lacasa.



**Figura 11-2. Espectre d'absorbància de la lacasa, de l'NHA i de la lacasa amb l'NHA a diferents temps (0, 5 i 15 minuts)**

### 11.3.1.2 Constants cinètiques de la lacasa amb l'ABTS, l'HBT i l'NHA

L'objectiu d'aquest apartat és trobar les constants cinètiques de la lacasa de *P. cinnabarinus* ss3 amb els mediadors ABTS, HBT i NHA per tal de poder veure l'eficiència de la lacasa oxidant l'NHA en comparació amb els mediadors coneguts ABTS i HBT.

A la Taula 11-4 es mostren les condicions per a cada mediador per a realitzar els assaigs de les seves constants cinètiques amb la lacasa. Es mostra la longitud d'ona en cada cas, per a l'NHA és la de 350 nm tal com s'ha demostrat a l'apartat anterior, també es mostren l'  $\epsilon_{408}$  i l'  $\epsilon_{350}$  calculats, així com les diferents concentracions de mediador, de lacasa i el temps de reacció en cada cas.

**Taula 11-4. Condicions pels assaigs de cinètica de cada mediador**

	$\lambda$ (nm)	$\epsilon_{\lambda}$ ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	[Mediador] mM	[Lacasa] $\mu\text{M}$	Temps (min)
<b>ABTS</b>	420	36	0,01-0,1	$3,7 \cdot 10^{-4}$	1
<b>HBT</b>	408	0,5108	1-14,7	$3,7 \cdot 10^{-2}$	15
<b>NHA</b>	350	0,5657	0,5-16,5	$3,7 \cdot 10^{-2}$	15

Una vegada especificades les condicions es realitzen els assaigs de cinètica i s'obtenen les constants cinètiques de  $K_m$ ,  $V_{\max}$ ,  $K_{\text{cat}}$  i E de la lacasa amb cada mediador les quals es mostren a la taula Taula 11-5.

**Taula 11-5. Constants cinètiques de la lacasa amb els tres mediadors**

	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mM/min)	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$E$ ( $\text{min}^{-1}/M$ )
<b>ABTS</b>	0,16	0,004	10800	$6,59 \cdot 10^7$
<b>HBT</b>	20,67	0,015	398	$1,93 \cdot 10^4$
<b>NHA</b>	8,05	0,17	4570	$5,67 \cdot 10^5$

La  $K_m$  és la constant de Michaelis-Menten i representa l'afinitat d'un enzim per un substrat. Com més petita sigui la  $K_m$  més afinitat tindrà la lacasa pel mediador. Segons els resultats de la Taula 11-5, l'ABTS és el mediador més afí per la lacasa, és a dir, que la lacasa oxida l'ABTS més ràpidament que oxida l'HBT i l'NHA. L'ABTS és conegut que presenta alta reactivitat amb la lacasa ja que l'estructura aromàtica de l'ABTS és semblant als substrats naturals de la lacasa, els fenols. Si es comparen l'HBT i l'NHA, l'NHA presenta una  $K_m$  més baixa que l'HBT el què indica que la lacasa presenta més afinitat en oxidar l'NHA que l'HBT.

La  $V_{max}$  és la velocitat constant de formació de producte corresponent al moment en que tots els llocs actius de l'enzim estan saturats amb el substrat. L'ABTS és el que presenta la  $V_{max}$  més baixa, seguit de l'HBT i de l'NHA.

La  $K_{cat}$  és una mesura de l'eficàcia de la catàlisi de la lacasa sobre el mediador. La  $K_{cat}$  més elevada és la de l'ABTS seguida de l'NHA i de l'HBT. L'  $E$  representa la constant d'especificitat i és una mesura de l'especificitat global de la lacasa amb el mediador. L' $E$  més elevada és per l'ABTS seguida per l'NHA i per l'HBT.

Així doncs, segons les constants cinètiques trobades de la lacasa amb els diferents mediadors, es pot dir que el substrat més afí per la lacasa és l'ABTS, seguit de l'NHA i per últim de l'HBT. Altres autors (Li *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000 i 2001; Sigoillot *et al.*, 2004) també han determinat les constants cinètiques de diferents lacases amb aquests mediadors on s'obtenen resultats semblants. Cal destacar que les constants cinètiques obtingudes aquí són més altes a les obtingudes per Sigoillot *et al.*, 2004, amb la lacasa de *Pycnoporus* el que deu ser degut a que la lacasa utilitzada en aquest capítol no és del tot pura, de tota manera l'important l'objectiu de determinar les constants cinètiques era poder comparar els tres mediadors entre ells.

Aquests paràmetres obtinguts, no són del tot indicatius d'un sistema lacasa-mediador eficaç ja que mentre que la lacasa és més afí per l'ABTS, és conegut que l'HBT és el sistema lacasa-mediador més eficient descrit fins ara per la seva aplicació amb pasta. Això podria ser degut a que en comparació amb els radicals fenoxi que produeix l'ABTS, l'activitat i estabilitat de l' $\text{NO}\cdot$  (produïts per l'oxidació de l'HBT i NHA) sembla ser millor, el què podria contribuir a la millor acció d'aquest com un mediador per a la deslignificació amb el sistema lacasa-mediador (Xu *et al.*, 2000).

### **11.3.2 Estabilitat de l'enzim durant l'oxidació dels mediadors i efecte protector de la pasta d'eucaliptus**

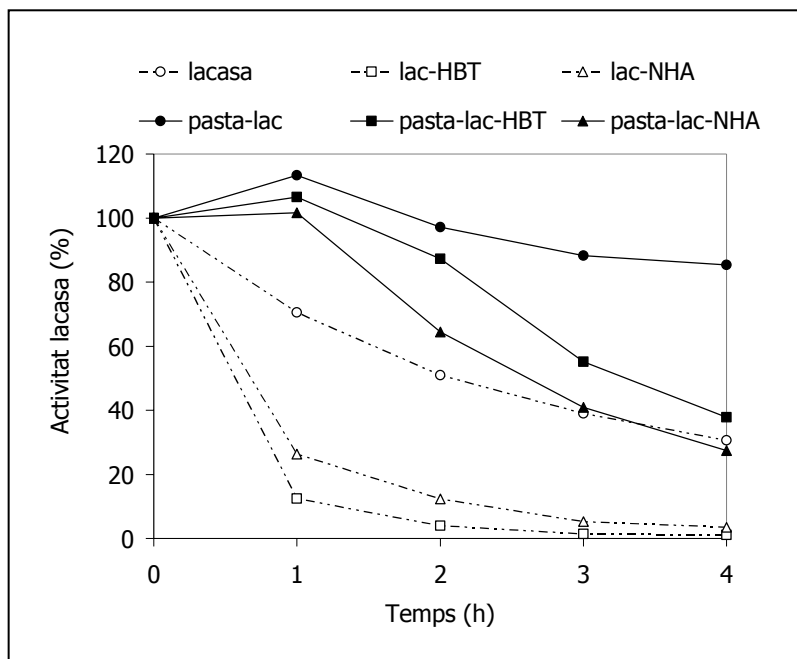
L'objectiu d'aquest apartat és avaluar l'evolució de l'activitat de la lacasa durant els tractaments  $L_{NHA}$  i comparar-la amb els tractaments  $L_{HBT}$ . Com ja s'ha dit, els mediadors NHA i HBT contenen un grup funcional N-OH i al ser oxidats per la lacasa es forma un radical  $NO\cdot$  que és el responsable de l'alta oxidació de la lignina (Rocheffort *et al.*, 2004). Tanmateix, la seva naturalesa de radical causa alguns problemes d'estabilitat ja que pot atacar la lacasa provocant una disminució en la seva activitat que depèn del mediador utilitzat (Li *et al.*, 1999) i que limita l'ús d'aquests mediadors en la deslignificació.

Varis treballs parlen de la inactivació de la lacasa per part de l'HBT (Li *et al.*, 1999, Sigoillot *et al.*, 2005; Ibarra *et al.*, 2006). A més, és conegut que l'HBT es degrada a una forma inactiva, el benzotriazol, que ja no és un mediador redox (Sealey i Ragauskas, 1997). Hi ha treballs que estudien la inactivació de la lacasa en les condicions de tractament L utilitzant HBT com a mediador i pasta de lli (Sigoillot *et al.*, 2005) o bé en pasta d'eucaliptus (Ibarra *et al.*, 2006) en els quals s'observa un efecte protector de la pasta respecte a la pèrdua d'activitat de la lacasa. D'altra banda, amb l'NHA no hi ha treballs on s'estudii l'evolució de l'activitat de la lacasa amb aquest en les condicions de tractament L i tampoc hi ha estudis on s'avalui aquest efecte protector de la pasta en l'activitat de la lacasa. Al ser un mediador N-OH suggereix que els radicals nitroxil també desactiven la lacasa de la mateixa manera que ho fa l'HBT.

En aquest estudi s'avalua l'evolució de l'activitat de la lacasa en presència dels mediadors HBT o NHA al mateix temps que es monitoritza espectrofotomètricament la formació del corresponent radical nitroxil. També s'avalua el possible efecte protector de la pasta d'eucaliptus en l'activitat de la lacasa i en la formació dels radicals, per aquest motiu es realitzen assajos amb pasta i sense pasta. Per tal de comprovar que la pèrdua d'activitat de la lacasa és deguda als mediadors i no a les condicions del tractament, també se segueix l'evolució de l'activitat de la lacasa sense mediadors.

Els resultats de l'evolució de l'activitat de la lacasa al llarg de les 4 hores de tractament es mostren a la Figura 11-3. Les línies discontinües corresponen als tractaments sense pasta. En el cas de la lacasa incubada sola (sense mediador) s'observa que va perdent activitat cada hora i al cap de les 4 hores queda un 30% d'activitat de lacasa residual. Tanmateix, en presència d'11 mM d'HBT i de 3,3 mM d'NHA la lacasa és fortament inactivada, i al cap de 4 hores només queda un 1 % d'activitat lacasa en el tractament amb HBT i un 3 % d'activitat lacasa en el tractament amb NHA. Aquesta inactivació

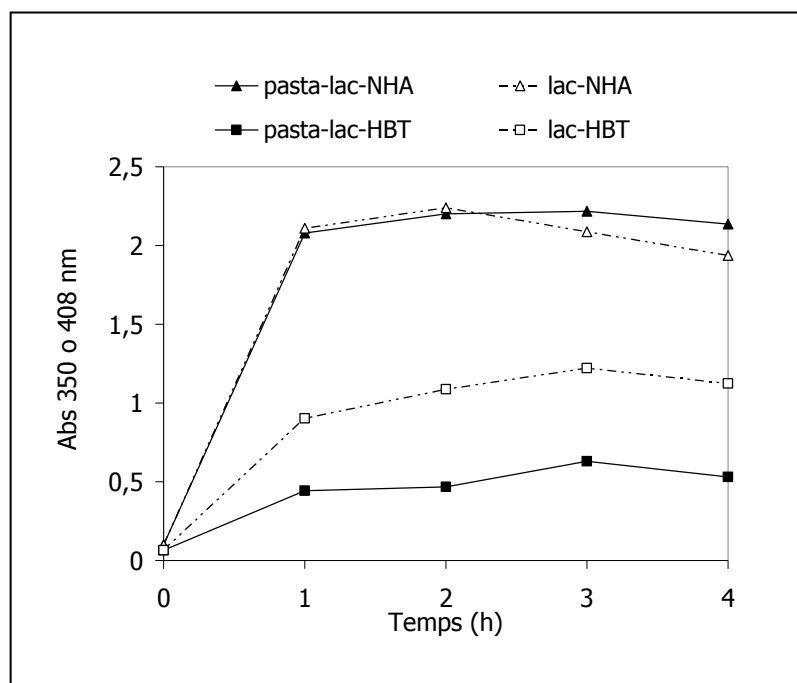
de la lacasa per part dels mediadors s'observa des de la primera hora, on en el cas de l'HBT es produeix un 87% d'inactivació i amb l'NHA un 74% d'inactivació.



**Figura 11-3. Evolució de l'activitat lacasa (%) al llarg de les 4 hores d'incubació a les diferents condicions**

Per tal de determinar quina inactivació de la lacasa serà produïda durant el tractament de la pasta amb el sistema  $L_{HBT}$  o  $L_{NHA}$ , s'ha mesurat també l'activitat residual de la lacasa en presència de pasta i de mediadors (Figura 11-3, línies contínues). En tots els casos s'observa l'efecte protector de la pasta d'eucaliputs ja que en presència de pasta es redueix la inactivació de la lacasa. Al cap de 4 hores d'incubar la lacasa sola amb pasta queda un 85% d'activitat lacasa residual, el que significa que la inactivació ha estat reduïda un 55% en presència de pasta. Amb 3% sps d'HBT al cap de 4 hores queda una activitat lacasa residual del 38% el què vol dir una reducció de la inactivació de la lacasa d'un 37% degut a la pasta. Amb l'1% sps d'NHA al cap de 4 hores encara queda un 27% d'activitat lacasa, el què vol dir una reducció de la inactivació de la lacasa per part de la pasta d'un 24%. Cal destacar que durant la primera hora és manté l'activitat de la lacasa en tots els casos, al contrari del què passava sense pasta on era a partir de la primera hora que hi havia la major inactivació. En presència de pasta és a partir de les 2 hores que la lacasa es comença a inactivar.

En els tractaments on s'hi ha afegit mediador, s'ha seguit també l'oxidació d'aquests al llarg de les 4 hores (Figura 11-4) mesurant l'absorbància a 408nm per a l'HBT i a 350nm per a l'NHA. L'absorbància dels mediadors augmenta des de la primera hora i es manté estable durant les 3 hores següents. Aquests resultats són indicatius de la concentració del radical del mediador i es pot dir que es forma el radical durant la primera hora i aquest es manté estable al llarg de les 4 hores de tractament. En el cas de l'HBT la presència de pasta fa que hi hagi menys radical potser perquè a l'actuar sobre la lignina aquesta actua com a substrat reductor pels radicals nitroxil (Ibarra *et al.*, 2006). En canvi, en els tractaments amb NHA la concentració del radical és la mateixa amb o sense pasta.



**Figura 11-4. Evolució de l'oxidació dels mediadors al llarg de les quatre hores d'incubació en les diferents condicions**

A partir dels resultats obtinguts fins ara es pot dir que l'NHA és un bon candidat per a deslignificar i blanquejar la pasta kraft d'eucaliptus, ja que segons les constants cinètiques és un bon substrat per a la lacasa (millor que l'HBT), la lacasa presenta la mateixa resistència a inactivar-se pels radicals NHA que pels radicals HBT i la concentració del radical, que és el que oxida la lignina, es manté estable al llarg del tractament.

### 11.3.3 Tractament enzimàtic de la pasta d'eucaliptus

En aquest apartat l'objectiu és avaluar la capacitat del sistema L<sub>NHA</sub> en deslignificar i blanquejar la pasta d'eucaliptus, al mateix temps que es vol escollir la combinació més eficient entre tipus de pretractament (F o X), tipus de mediador (HBT o NHA) i tipus de pasta (C o O); per aquest motiu s'ha realitzat un pla d'experiències.

Els resultats de les 8 experiències del pla factorial fraccionat 2<sup>4-1</sup> mesurats després de l'etapa E (Ik i Blancor, tant per cent de disminució d'Ik i tant per cent d'increment de blancor), i les seves respectives condicions es mostren a la Taula 11-6.

**Taula 11-6. Índex kappa, disminució de l'índex kappa (%), blancor i augment de blancor (%) de les experiències realitzades en el pla factorial**

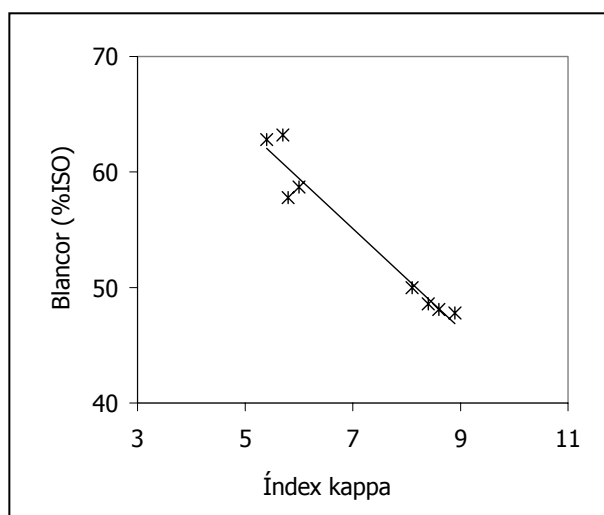
x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>	Ref.	Ik	Dism. Ik (%)	Blancor (%ISO)	Augm. BI (%)
-1	-1	-1	1	<b>LE (O,HBT)</b>	5,7	26,0	63,2	18,8
1	-1	-1	-1	<b>FLE (C,HBT)</b>	8,9	24,6	47,8	13,6
-1	1	-1	1	<b>XLE (O,HBT)</b>	5,4	29,9	62,8	18,3
1	1	-1	-1	<b>F+XLE (C,HBT)</b>	8,6	27,1	48,1	14,1
-1	-1	1	-1	<b>LE (C,NHA)</b>	8,4	28,8	48,6	15,0
1	-1	1	1	<b>FLE (O,NHA)</b>	6,0	22,1	58,7	12,6
-1	1	1	-1	<b>XLE (C,NHA)</b>	8,1	31,4	50,0	17,4
1	1	1	1	<b>F+XLE (O,NHA)</b>	5,8	24,7	57,8	11,2

Si es representen gràficament les propietats de blancor vs. índex kappa s'observa que els punts experimentals s'ajusten a una recta i segueixen una determinada tendència (Figura 11-5) on una disminució en l'índex kappa comporta un augment en la blancor. L'índex kappa de les experiències va de 8,9 a 5,4 i la blancor de 47,8 a 63,2 %ISO. La disminució de l'Ik de les experiències va del 22% al 31% i l'increment de blancor de l'11% al 19%. Després d'aquest anàlisi es pot deduir que els punts experimentals obtinguts són correctes i segueixen unes tendències lògiques pels processos de blanqueig, en els quals el fet de disminuir la quantitat de lignina augmenta la blancor de les pastes (García *et al.*, 2003).

Per tal d'analitzar els efectes de les variables en les respostes i comparar-les entre elles no és possible basar-se en els resultats d'Ik i blancor ja que en la variable pasta s'utilitzen dues pastes amb unes propietats inicials d'Ik i blancor diferents (C: Ik 12 i blancor 41,3 %ISO; O: Ik 8 i blancor 51,3 %ISO), el què comporta que els tractaments realitzats amb la pasta O sempre tindran un Ik inferior i una blancor superior. És necessari basar-se amb els resultats de tant per cent de disminució d'Ik o



deslignificació i d'increment de blancor per tal de poder comparar totes les experiències entre elles.



**Figura 11-5. Relació entre les propietats d'Ík i blancor de les experiències del pla factorial**

### 11.3.3.1 Efecte en la deslignificació

A l'Eq. 11-6 es mostra el model de deslignificació obtingut a partir dels resultats i s'observa que presenta un bon ajust  $R^2$ . El model prediu una deslignificació que va del 22% al 32% i és influenciat per tres de les quatre variables que són  $x_1$  pretractament amb ferulat esterasa,  $x_2$  pretractament amb xilanasa i  $x_4$  tipus de pasta.

$$Y_{\text{Desl}(\%)} = 26,81 - 2,20X_1 + 1,45X_2 - 1,16X_4$$

$$R^2 = 0,99$$

Eq. 11-6

El pretractament enzimàtic amb ferulat esterasa ( $x_1$ ) és la variable més influent i té influència negativa en la deslignificació, és a dir, que si es realitza aquest pretractament a la pasta la deslignificació del sistema disminueix. La ferulat esterasa trenca els enllaços entre l'àcid ferúlic i l'arabinosa present en les hemicel·luloses. El trencament d'aquests enllaços éster permet la separació de les parets d'hemicel·lulosa i l'alliberació de fragments de lignina localitzats entre la paret. La primera vegada que es va aplicar un tractament amb la ferulat esterasa va ser realitzat per Record, *et al.*, el 2003 i en un treball realitzat per Sigoillot, *et al.*, (2005) van observar un augment en la deslignificació després de l'etapa P en pasta de lli. El fet que no hagi tingut efecte aquest pretractament en pasta d'eucaliptus pot ser degut a que la pasta d'eucaliptus

gairebé no conté arabinosa, i també pot ser que l'enzim hagi quedat enganxat a la pasta i interfereixi en la mesura de l'Ik.

El pretractament enzimàtic amb xilanasa és la següent variable més influent ( $x_2$ ) però aquesta influeix positivament en la deslignificació, és a dir, que si es realitza un pretractament enzimàtic a les pastes amb xilanasa fa augmentar la deslignificació produïda pel sistema lacasa-mediador, i això és degut a que la xilanasa ha hidrolitzat els xilans de la superfície de la fibra els quals taponaven l'accés del sistema al seu interior (Roncero *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2000). Aquests resultats corroboren de nou els estudis realitzats en capítols anteriors sobre l'efecte d'X en L.

El tipus de pasta ( $x_4$ ) també té influència en el sistema i aquesta presenta un coeficient negatiu. A l'hora de realitzar el disseny d'experiències (Taula 11-2) s'ha dit que el nivell -1 correspon a realitzar les experiències amb pasta crua (C) i el nivell +1 a realitzar les experiències amb la pasta deslignificada amb oxigen (O). El coeficient obtingut indica que quan hi ha pasta crua (-1) la deslignificació augmenta, per tant es pot dir que el sistema deslignifica millor amb la pasta crua que amb la pasta deslignificada amb oxigen (O).

El model de deslignificació obtingut mostra que la variable  $x_3$  (tipus de mediador) no influeix. Això indica que els dos mediadors (HBT i NHA) són igual d'eficients en deslignificar la pasta d'eucaliptus. Aquests resultats no van d'acord amb el que Chakar i Ragauskas, (2000) van obtenir ja que comenten que amb HBT es deslignifica millor que amb NHA.

### 11.3.3.2 Efecte en l'increment de blancor

A l'Eq. 11-7 es mostra el model d'increment de blancor obtingut a partir dels resultats el qual presenta un bon ajust  $R^2$ . El model prediu un increment de blancor que va de l'11% al 19% i és influenciat per dues de les quatre variables que són  $x_1$  pretractament amb ferulat esterasa i  $x_3$  tipus de mediador, i per la interacció triple  $x_1x_2x_3$  on  $x_2$  correspon al pretractament enzimàtic amb xilanasa.

$$Y_{\text{Incr.Bl}(\%)} = 15,1 - 2,25X_1 - 1,08X_3 - 0,6X_1X_2X_3$$
$$R^2 = 0,98$$

Eq. 11-7

El pretractament enzimàtic amb ferulat esterasa ( $x_1$ ) és la variable més influent i igual que en la deslignificació, aquesta influeix negativament en l'augment de blancor, és a dir que si es realitza aquest pretractament a la pasta s'incrementa menys la blancor

per part del sistema. Això pot ser degut a que l'enzim es queda retingut a la pasta i li doni color.

El tipus de mediador ( $x_3$ ) també presenta un coeficient negatiu en el model d'increment de blancor. Quan s'ha realitzat el disseny d'experiències (Taula 11-2) se li ha donat el nivell -1 al mediador HBT i el +1 a l'NHA. El coeficient negatiu d'aquesta variable indica que quan s'utilitza el mediador HBT augmenta més la blancor del sistema que amb el mediador NHA el que no va d'acord amb el que s'ha obtingut en el model de deslignificació on s'ha dit que els dos mediadors funcionaven igual. El fet que en la blancor el mediador HBT funcioni millor pot ser degut a que l'NHA oxidat doni coloració a la pasta (Poppius-Levlin *et al.*, 2001) o bé a que l'NHA forma més quantitat de quinones en el sistema (Chakar i Ragauskas, 2001).

La interacció triple entre pretractament amb ferulat estarasa, pretractament amb xilanasa i tipus de mediador presenta lleugera influència en el model amb coeficient negatiu.

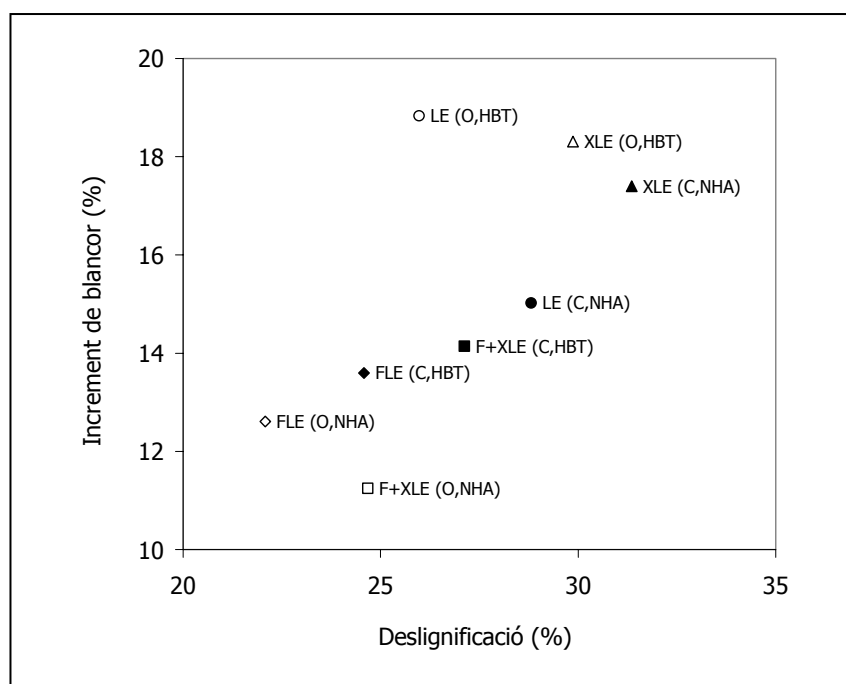
En el model de deslignificació s'ha dit que el pretractament enzimàtic amb xilanasa ( $x_2$ ) augmentava la deslignificació del sistema, però ara s'ha vist que no augmenta la blancor, el que es pot explicar pel fet que el pretractament enzimàtic amb xilanasa augmenta l'eliminació d'àcids hexenurònics i no de lignina com s'ha comentat al capítol 10, la qual cosa pot explicar que disminueixi l'índex kappa i no augmenti la blancor.

En el model de deslignificació també s'ha dit que amb la pasta crua es deslignifica millor però en augmentar la blancor els dos tipus de pasta funcionen igual ja que la variable tipus de pasta ( $x_4$ ) no té efecte en l'augment de blancor.

### **11.3.3.3 Comparació de la deslignificació de les pastes amb l'increment de blancor**

Segons el que s'ha comentat, no corresponen els efectes observats en la disminució de l'Ik amb els efectes observats en increment de blancor, per aquest motiu a la Figura 11-6 es comparen gràficament ambdues propietats per tal de veure si estan correlacionades. S'observa una correlació entre la deslignificació i l'increment de blancor en els tractaments amb pasta crua (punts negres) però no s'observa aquesta correlació en les experiències on es parteix de pasta O (punts buits). En aquest gràfic també s'observa que en les experiències amb pasta crua, el fet d'aplicar pretractament enzimàtic amb xilanasa augmenta tant la deslignificació com l'increment de blancor. En canvi, en les experiències amb pasta O, el fet d'aplicar el pretractament X augmenta la deslignificació però redueix l'increment de blancor. Cal destacar també que en les

experiències amb pasta O s'obtenen els màxims increments de blancor quan el mediador HBT és utilitzat i s'obtenen també els mínims d'increment de blancor quan és l'NHA el mediador utilitzat.



**Figura 11-6. Deslignificació vs. increment de blancor de cada experiència**

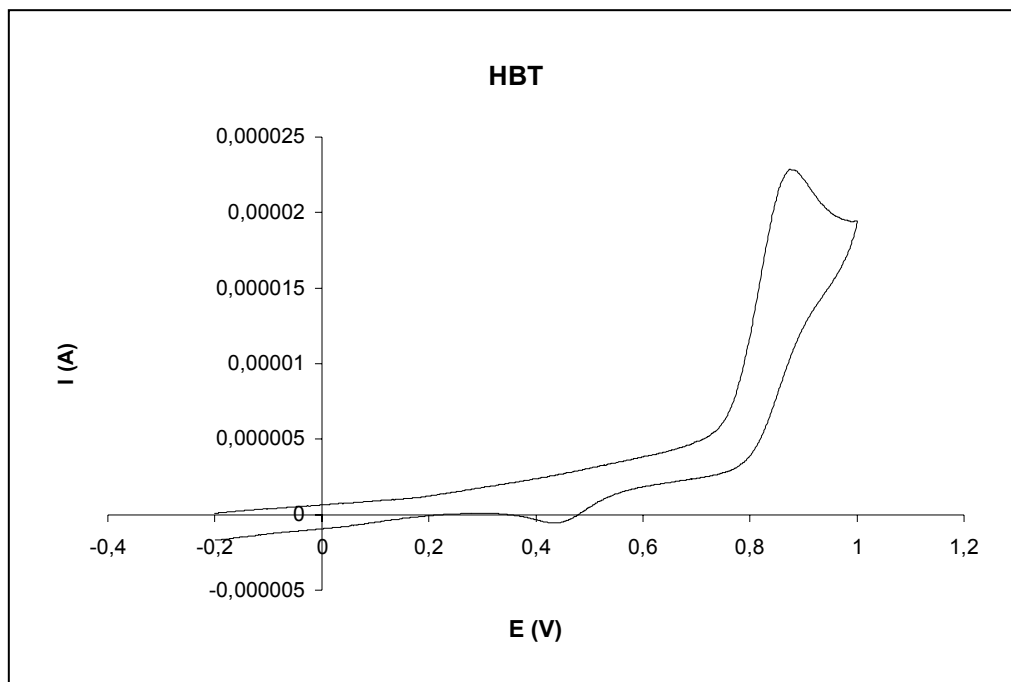
### 11.3.4 Estudi de la reversibilitat i potencial redox dels mediadors

Per tal de completar la discussió sobre l'interès de l'NHA, es realitza la voltametria cíclica sobre els dos mediadors (HBT i NHA) per determinar els seus potencials redox i verificar la reversibilitat de la reacció d'oxidació de l'NHA. La voltametria cíclica s'ha utilitzat per varis autors per a avaluar diferents mediadors de la lacasa (Xu *et al.*, 2000 i 2001; Fabbrini *et al.*, 2002; Fernández-Sánchez *et al.*, 2002) i Rochefort *et al.*, 2004 comenten que el potencial redox del mediador té molta influència en la seva eficiència.

El potencial redox d'un mediador és important ja que la taxa d'oxidació d'un mediador depèn de la diferència de potencial redox entre el substrat N-OH i la lacasa, per tant, un substrat N-OH amb un baix potencial redox tindrà una taxa d'oxidació més alta (Xu *et al.*, 2000).

A la Figura 11-7 es mostra el voltamograma cíclic de l'HBT on s'observa que la reacció d'oxidació és irreversible tal com també s'ha observat per Xu *et al.*, 2000. S'obté que

l'HBT s'oxida al potencial de 870 mV *vs.* ECS (1110 mV *vs.* NHE) i es redueix en un producte al voltant de 400 mV *vs.* ECS (640 mV *vs.* NHE). Segons Xu *et al.*, 2000 l'oxidació de l'HBT no depèn del pH i genera un intermediari altament inestable, un radical NO<sup>•</sup> que ràpidament passa a productes secundaris catalíticament inactius com el benzotriazol.



**Figura 11-7. Voltamograma cíclic de l'HBT a pH 4**

A la Figura 11-8 es mostra el voltamograma cíclic de l'NHA a pH4, s'observa que l'NHA presenta dues oxidacions, la primera és reversible mentre que la segona és irreversible i aquest resultat correspon amb el que s'ha obtingut per Xu *et al.*, 2001. Quan el potencial arriba al voltant de 630 mV *vs.* ECS (870 mV *vs.* NHE) l'NHA s'oxida segons la reacció que es mostra a l'Eq. 11-8 però si se segueix augmentant el potencial fins al voltant de 900 mV es produeix una segona oxidació (Eq. 11-9). La primera oxidació és reversible en un potencial al voltant de 0,5, segons la reacció que es mostra a l'Eq. 11-10, mentre que la segona oxidació és irreversible i el mediador serà reduït al voltant de 0 V (Eq. 11-11).

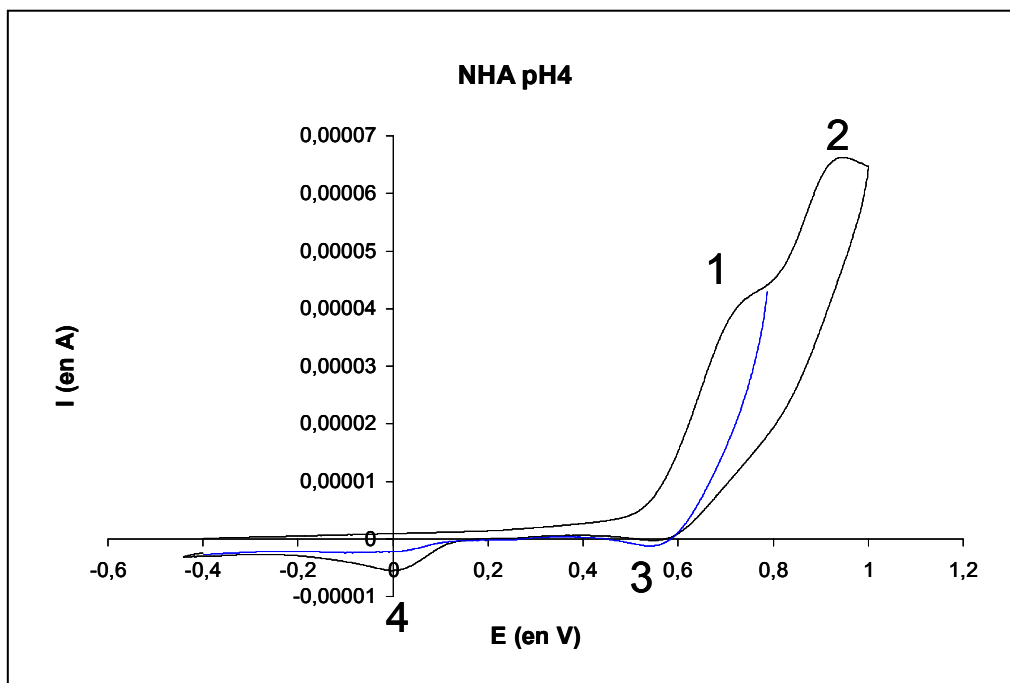
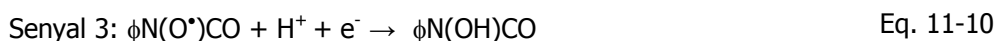
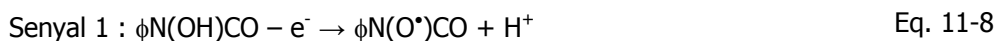


Figura 11-8. Voltamograma cíclic de l'NHA a pH 4



Segons Xu *et al.*, 2000 l'NHA presenta un voltamograma cíclic quasi-reversible i el seu potencial redox depèn del pH on el potencial redox de l'NHA disminueix quan el pH augmenta. Per aquest motiu s'ha realitzat un voltamograma cíclic de l'NHA a pH 5 tal com es mostra a la Figura 11-9. S'observa que la primera oxidació es produeix a un potencial més baix de 600 mV *vs.* ECS (840 mV *vs.* NHE).

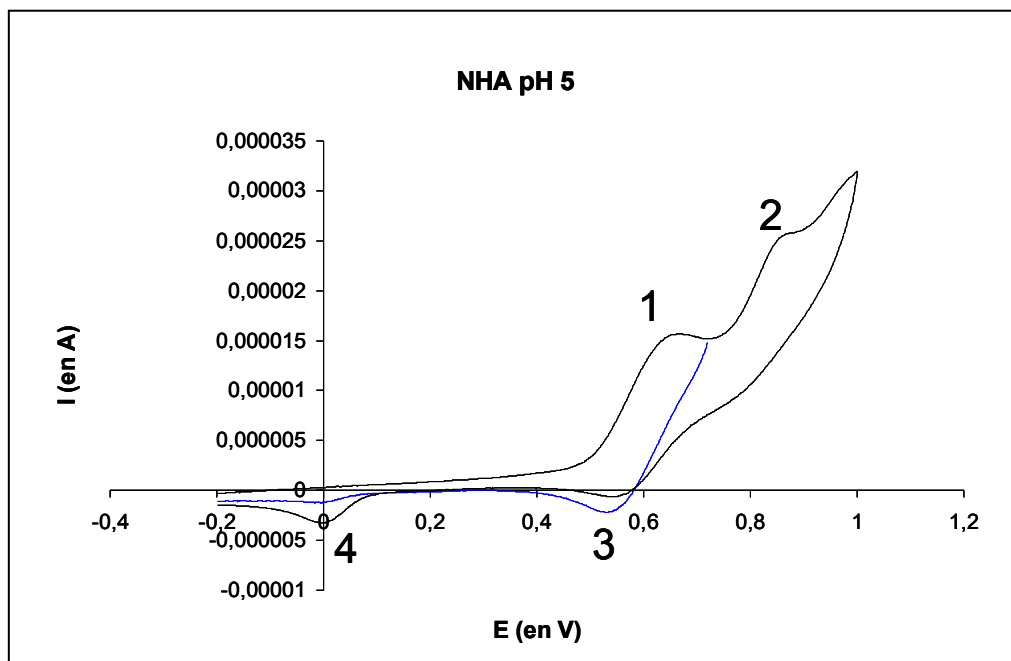


Figura 11-9. Voltamograma cíclic de l'NHA a pH 5

Segons aquests resultats i les equacions, es pot dir que el potencial del senyal 1 és directament funció del pH al contrari que el senyal 2. Augmentant el pH se separen els dos sistemes i el sistema redox que correspon als senyals 1 i 3 guanya reversibilitat ja que el senyal 3 és més intens a pH 5 que a pH 4.

Per a l'oxidació de la pasta de paper, cal que el mediador sigui sota una forma la més oxidant possible, és a dir, al més alt potencial possible sobre l'ona de tornada.

A pH 4, després de l'oxidació, el mediador es troba majoritàriament sota la forma  $\phi\text{NO}$  que serà reduït al voltant de 0 V vs ECS. A pH 5, després de la primera oxidació, la majoria dels mediadors són sota la forma  $\phi\text{N}(\text{O}^*)\text{CO}$  que es redueix al voltant de 0,53 V vs. ECS.

Així doncs, dels resultats obtinguts fins ara, es pot dir que el mediador NHA presenta més afinitat per la lacasa que l'HBT, inactiva la lacasa de la mateixa manera que ho fa l'HBT i dona resultats tant bons com l'HBT en deslignificar la pasta, tot i que en incrementar la blancor és més eficient l'HBT. A més, el potencial redox de l'NHA és lleugerament inferior al de l'HBT i l'NHA presenta una reacció d'oxidació reversible al contrari que l'HBT el que el fa interessant per a la seva reutilització. Per últim, l'NHA

presenta l'avantatge respecte l'HBT que és més barat i potencialment menys contaminant.

### 11.3.5 Tractament sota les millors condicions

Es realitza un tractament amb les millors condicions escollides segons els apartats anteriors que són pasta crua, pretractament amb xilanasa i NHA com a mediador. D'altra banda, a l'apartat anterior s'ha determinat que quan es fa el tractament a pH 4 amb la pasta, NHA i lacasa segurament es produeix la segona oxidació de l'NHA que no és reversible, mentre que a pH 5 podria ser que tinguéssim la primera la qual és reversible, per aquest motiu el tractament  $L_{NHA}$  es realitza a pH 5 i el resultat es compara amb el que s'ha obtingut a pH 4.

Així doncs, d'una banda es tracten 150 gps i es realitza la seqüència  $XL_{NHA}E$  a pH 5 i d'altra banda es realitza el mateix assaig amb menys quantitat de pasta amb una lacasa recombinant (lacasa-CBM), els resultats d'Ik i blancor es comparen amb la mateixa experiència obtinguda al pla experimental a l'apartat 11.3.3 a pH 4, aquests resultats es mostren a la Taula 11-7.

**Taula 11-7. Resultats del tractament a les millors condicions a pH 4 i a pH 5 i utilitzant la lacasa-CBM**

	<b>Ik</b>	<b>BI (%ISO)</b>
$XL_{NHA}E$ (pH 4)	8,1	50,0
$XL_{NHA}E$ (pH 5)	6,7	54,0
$XL^*_{NHA}E$ (pH 5) *Lacasa-CBM	6,3	53,7

Si es comparen els resultats obtinguts a la seqüència  $XL_{NHA}E$  (pH4) amb els  $XL_{NHA}E$  (pH5) s'observa que augmentar el pH del tractament a 5 fa que el sistema lacasa-mediador amb NHA sigui més eficient que a pH 4 ja que augmenta la disminució de l'Ik (1,4 U) i augmenta més la blancor (4 %ISO), això és degut a que a pH 5 es produeix la primera reacció de l'NHA la qual és reversible i permet al sistema actuar millor. D'altra banda, al realitzar el mateix tractament però amb la lacasa recombinant que conté un mòdul d'unió a la cel·lulosa ( $XL^*_{NHA}E$  a pH 5), s'aconsegueix disminuir encara més l'Ik respecte  $XL_{NHA}E$  (pH5) (0,4 U inferior) mentre que no queda afectada la blancor.



## 11.4 CONCLUSIONS

Primer de tot es comprova que la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* és capaç d'oxidar l'NHA donant lloc a la formació d'un producte oxidat del mediador el qual absorbeix a una longitud d'ona de 350nm. Seguidament, atenent a les constants cinètiques, s'observa que l'NHA és millor substrat per a la lacasa que l'HBT.

La lacasa és inactivada durant el tractament  $L_{NHA}$  de la mateixa manera que és inactivada durant el tractament  $L_{HBT}$  a causa dels radicals nitroxil dels mediadors que es formen al ser oxidats per la lacasa. No obstant, en presència de pasta s'observa un efecte protector en l'activitat de la lacasa front els radicals dels dos mediadors. Els radicals dels mediadors es formen durant la primera hora de tractament i es mantenen estables durant les 4 hores següents, tot i que en el cas de l'HBT la presència de pasta redueix la quantitat de radical.

Es demostra que el sistema  $L_{NHA}$  és capaç de deslignificar la pasta kraft d'eucaliptus de la mateixa manera que ho fa el sistema  $L_{HBT}$ . El sistema  $L_{HBT}$  augmenta més la blancor de la pasta que l' $L_{NHA}$  el que es relaciona amb la possible major formació de quinones amb l'NHA o amb la coloració que dona l'NHA oxidat. Es demostra que el sistema lacasa-mediador és més eficient si se li aplica a la pasta una etapa de pretractament enzimàtic amb xilanasa i si s'utilitza pasta crua.

L'anàlisi de voltametria cíclica dels mediadors demostra d'una banda que l'HBT presenta un potencial redox lleugerament superior a l'NHA i d'altra banda que l'HBT presenta una oxidació irreversible mentre que l'oxidació de l'NHA és reversible i depenent de pH, sent a pH 5 més reversible que a pH 4. Els assajos sobre la pasta ho demostren ja que a pH 5 millora la disminució de l'Ik i l'augment en la blancor. Per tant, queda demostrada la utilització de l'NHA com a millor mediador que l'HBT ja que a més és més barat i en principi, potencialment menys contaminant que l'HBT.

## 11.5 REFERÈNCIES

- Ander, P. i Messner, K. (1998) Oxidation of 1-hydroxybenzotriazole by laccase and lignin peroxidase. *Biotechnology Techniques* 12(3):191-195.
- Balakshin, M., Chen, C., Gratzl, J.S., Kirkman, A.G. i Jakob, H. (2001) Biobleaching of pulp with dioxygen in laccase-mediator system—effect of variables on the reaction kinetics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16(3-4):205-215.
- Bourbonnais, R. i Paice, M.G. (1992) Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-

- ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Applied Microbiology and Biotechnology* 36:823-827.
- Bourbonnais, R. i Paice, M. (1995) Enzymatic delignification of krat pulp using laccase and a mediator. *Tappi Journal* 79(5):199-204.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Leech, D. i Rochefort, D. (1998) Laccase/mediator bleaching of kraft pulps: Identification of mediator active species and their role in oxidation of residual lignin subunits. *Proceedings of the 7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* 1:103-106.
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., del Rio, J.C., Gutierrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martinez, M.J. i Martinez, A.T. (2004) Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology* 35(2-3):113-120.
- Chakar, F.S. i Ragauskas, A.J. (2000) Effects of oxidative alkaline extraction stages after laccase<sub>HBT</sub> and laccase<sub>NHAA</sub> treatments-an NMR study of residual lignins. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 20(2):169-184.
- Chakar, F.S. i Ragauskas, A.J. (2001) Formation of quinonoid structures in laccase-mediator reactions. *ACS Symposium Series* 785:444-455.
- Fabbrini, M., Galli, C. i Gentili, P. (2002) Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* 16(5):231-240.
- Fernández-Sánchez, C., Tzanov, T., Gübitz, G.M. i Cavaco-Paulo, A. (2002) Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions. *Bioelectrochemistry* 58:149-156.
- Freudenreich, J., Amann, M., Fritz-Langhals, E. i Stohrer, J. (1998) Understanding the Lignozym- Process. *International Pulp Bleaching Conference* 1:71-76.
- Garcia, O., Camarero, S., Colom, J.F., Martinez, A.T., Martinez, M.J., Monje, R. i Vidal, T. (2003) Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* 57(5):513-519.
- Ibarra, D., Romero, J., Martinez, M.J., Martinez, A.T. i Camarero, S. (2006) Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalypt pulp by laccase-mediator. *Enzyme and Microbial Technology* 39(6):1319-1327.
- Li, K., Xu, F. i Eriksson, K.E.L. (1999) Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6):2654-2660.
- Lomascolo, A., Cayol, J.L., Roche, M., Guo, L., Robert, J.L., Record, E., Lesage-Meessen, L., Ollivier, B., 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.
- Oxley, P.W., Adger, B.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* 67:187-191.
- Poppius-Levlin, K., Tamminen, T., Kalliola, A. i Ohra-Aho, T. (2001) Characterization of residual lignins in pulps delignified by laccase/N-hydroxyacetanilide. *ACS Symposium Series* 785:358-372.
- Record, 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.
- Rocheftort, D., Leech, D. i Bourbonnais, R. (2004) Electron transfer mediator systems for bleaching of paper pulp. *Green Chemistry* 6:14-24.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. i Vidal, T. (2000) Effects of a xylanase treatment on fibre morphology in totally chlorine free bleaching (TCF) of Eucalyptus pulp. *Process Biochemistry* 36:45-50.
- Sealey, J. i Ragauskas, A. (1997) Fundamental investigations into the chemical mechanisms involved in laccase mediator biobleaching. *Proceedings of the 9th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry (ISWPC)* 1:1.
- Sigoillot, C., Record, E., Belle, V., Robert, J.L., Levasseur, A., Punt, P.J., Van den Hondel, C.A.M.J.J., Fournel, A., Sigoillot, J.C. i Asther, M. (2004) Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64:346-352.
- Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Perez-Boada, M., Martinez, M.J., Sigoillot, J.C., Asther, M., Colom, J.F. i Martinez, A.T. (2005) Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal of Biotechnology* 115(4):333-343.
- Torres, A.L., Roncero, M.B., Colom, J.F., Pastor, F.I.J., Blanco, A. i Vidal, T. (2000) Effect of a novel enzyme on fibre morphology during ECF bleaching of oxygen delignified Eucalyptus kraft pulps. *Bioresource Technology* 74:135-140.
- Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H.J.W., Abbate, E., Galinyte, V. i Schneider, P. (2000) Redox chemistry in laccase-catalysed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (5):2052-2056.

Xu, F., Deussen, H.J.W., Lopez, B., Lam, L. i Li, K. (2001) Enzymatic and electrochemical oxidation of N-hydroxy compounds. *European Journal of Biochemistry* 268:4169-4176.