

## **CAPÍTULO 5**

### **TRATAMIENTOS OXIDATIVOS ENZIMÁTICOS**



*En la Parte A de este capítulo se realiza un rastreo en donde se evalúa el efecto de distintas cargas de enzima y mediador sobre las propiedades papeleras de pulpas kraft no blanqueadas recicladas de conífera de distintas drenabilidades. En la Parte B, se evalúa la acción de este sistema sobre la fracción fibrosa exclusivamente. Sobre esta última fracción se estudia también el efecto de un tratamiento alcalino posterior al tratamiento enzimático y el efecto de un tratamiento con un surfactante no iónico.*

## 5.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En la actualidad, la industria de pulpa y papel busca procesos alternativos que protejan el medio ambiente y que a la vez sean competitivos. La biotecnología ofrece para ello muchas alternativas.

De los hongos capaces de degradar la lignina de la madera o pulpa, los hongos de pudrición blanca que son selectivos, es decir, que son capaces de degradar más selectivamente a la lignina que a los carbohidratos, son útiles para la industria papelera.

La capacidad de estos hongos de degradar la lignina se debe a que poseen enzimas ligninolíticas capaces de mineralizar la lignina a dióxido de carbono y agua. Entre estas enzimas están las lacasas.

Existe un creciente desarrollo en el conocimiento de la bioquímica y aplicación de enzimas ligninolíticas, tales como lignina peroxidasas (LiP); manganeso peroxidasas (MnP) y especialmente las denominadas lacasas.

Si bien las lacasas fueron descubiertas por Yoshida, H. en 1883 en los exudados del árbol *Rhus vernicifera* japonés (Thurston 1994), están presentes en los hongos basidiomicetes causantes de pudrición blanca como el *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta* (**Figura 5.1**) (Heinzkill y Messner 1997); *Grammothele subargentea* (Saparrat 2000) y también en insectos. Recientemente Claus (2004) encontró evidencias de su presencia en procariotas.



**Figura 5.1.** *Basidiomicetes Trametes hirsuta.*

Las lacasas son polifenoloxidasas (*para*-difenol oxidasas, EC1.10.3.2) cuyo rol biológico está relacionado con la degradación de lignina, de taninos, así como de xenobióticos orgánicos. Catalizan la oxidación de sustratos fenólicos con la concomitante reducción del oxígeno a agua.

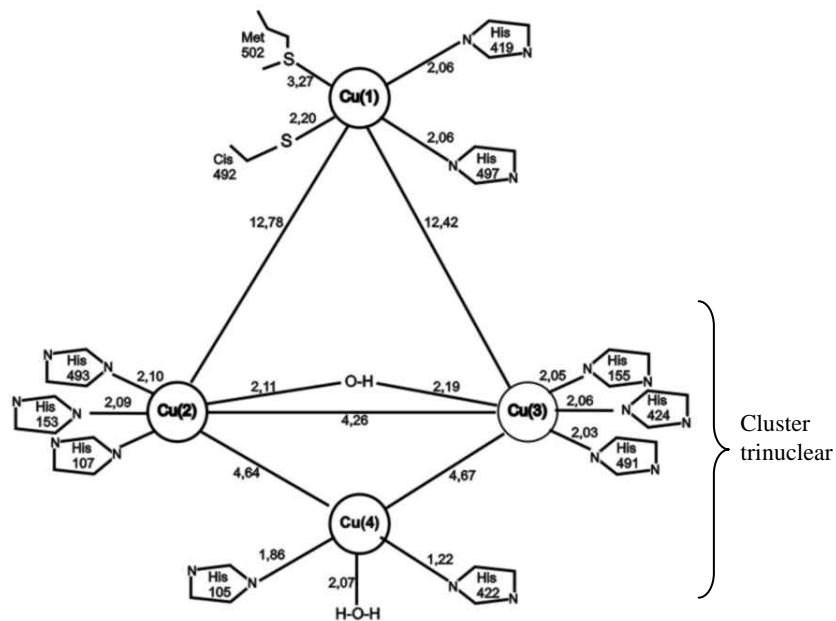
Son metaloglicoproteínas que contienen como cofactor iones cobre (multi-cobre oxidasas) y requieren para su actividad catalítica de un mínimo de cuatro átomos de cobre por cada proteína activa (**Figuras 5.2 y 5.3**).

Las lacasas son enzimas extracelulares y tienen baja especificidad de sustrato, es decir, oxidan un amplio rango de sustratos (difenoles simples; fenoles sustituidos por un grupo metoxi, diaminas, etc.) (**Tabla 5.1**).

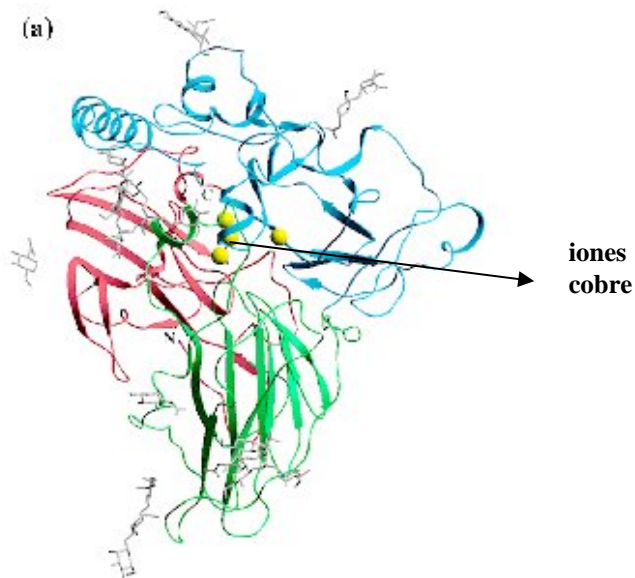
**Tabla 5.1.** Sustratos posibles de las lacasas (Saparrat 2000)

Sustratos fenólicos	Ác. Protocatéquico	<i>p</i> -hidroquinona
	Ac. Siríngico	<i>o</i> -metoxifenol
	Ac. Vainíllico	<i>p</i> -metoxifenol
	Catecol	rojo fenol
	2,6-dimetoxi- <i>p</i> -hidroquinona	siringaldehído
	2,6-dimetoxifenol	vainillina
	Guayacol	
Sustratos no fenólicos	ABTS	
	<i>p</i> -anisidina	
No sustrato	AHV	<i>m</i> -metoxifenol
	4-clorofenol	<i>p</i> -nitrofenol
	fenol	pentaclorofenol
		tirosina

Las lacasas presentes en el hongo *Trametes hirsuta* tienen una masa molecular de 60-100 kDa, un pI entre 3,5-7,4; un pH óptimo entre 2,5 y 5,0, y una composición de carbohidratos de 11-15% por molécula de proteína (Shleev y col. 2005). Estos carbohidratos son manosa y *N*-acetilglucosamina.



**Figura 5.2.** Centros de cobre (Cu) de la lacasa de *B. Subtilis*. (extraído de Claus, 2004). His: histidina; Met: metionina; Cis: cisteína. Distancias señaladas en Å.



**Figura 5.3.** Estructura terciaria de la enzima lacasa (extraído de Viikari 2006)

De los cuatro átomos de cobre presentes en cada proteína se pueden distinguir tres tipos de átomos de cobre según sus propiedades espectroscópicas y paramagnéticas (Claus 2004):

- Tipo 1 (T1) (Cu<sub>1</sub>): cobre “azul” paramagnético
- Tipo 2 (T2) (Cu<sub>4</sub>): cobre “no azul” paramagnético
- dos de Tipo 3 (T3) (Cu<sub>2</sub>) y (T3) (Cu<sub>3</sub>): diamagnético

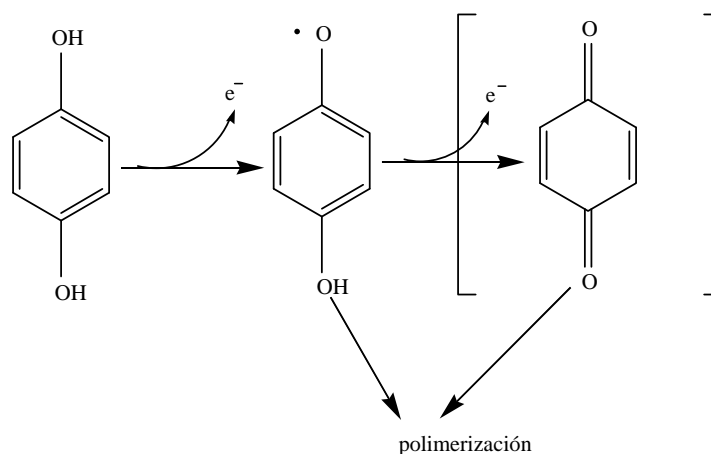
El (T2) ( $\text{Cu}_4$ ) junto con los dos de Tipo 3 (T3) ( $\text{Cu}_2$ ) y (T3) ( $\text{Cu}_3$ ) forman un cluster trinuclear (**Figura 5.2**) donde el oxígeno se reduce a agua. El (T1) ( $\text{Cu}_1$ ) no es necesario para reducir el oxígeno pero cumple la función de oxidar los sustratos reducidos y transferir los electrones al cluster trinuclear (Claus 2004, Xu y col. 2000).

El potencial redox del sitio (T1) ( $\text{Cu}_1$ ) se ha determinado para las lacasas de *Trametes hirsuta* usando diferentes sustratos. Se encontró que es +780 mV *versus* el electrodo normal de hidrógeno (Shleev y col. 2005).

En general se buscan lacasas con alto potencial redox para aplicaciones biotecnológicas.

La eficiencia de estas enzimas depende del potencial redox del (T1)( $\text{Cu}_1$ ). Por ejemplo, se ha mostrado que en el caso de sustratos N-OH esta dependencia es lineal (Xu y col. 2000).

Las lacasas oxidan el sustrato a través de una reacción monoelectrónica generando radicales libres (Thurston 1994). Estos radicales son inestables y pueden ser oxidados nuevamente por las lacasas o pueden polimerizarse (Thurston 1994)(**Figura 5.4**).



**Figura 5.4.** Reacción monoelectrónica típica de las lacasas sobre compuestos del tipo fenólicos (*extraído* de Thurston 1994). Se forma un radical libre que puede ser convertido a una quinona en un segundo paso catalizado por la enzima o por desprotonación espontánea. Además, las quinonas y los radicales libres generados pueden polimerizarse.

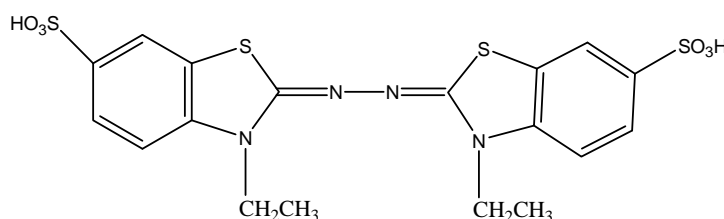
Las lacasas por sí solas no delignifican significativamente las fibras celulósicas (McDonough 2001, Nelson y col. 1998) debido a dos causas:

- a) su potencial redox sólo permite catalizar la oxidación de estructuras fenilpropano con el grupo hidroxilo libre, es decir, tipo fenólico.

b) el tamaño molecular de la enzima: 60 - 100 kDa que corresponde a 70 Å x 50 Å x 45 Å (Grönqvist y col. 2003) imposibilita su ingreso a la pared secundaria. En esta pared es donde se encuentra la mayoría de los grupos fenólicos libres (Goring 1985) y por lo tanto la modificación de las fibras es sólo superficial.

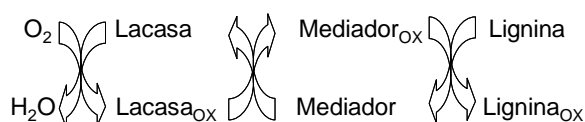
Bourbonnais y Paice (1992) descubrieron el primer compuesto capaz de ampliar la acción oxidativa de lacasas aisladas del hongo *Trametes versicolor* a compuestos no fenólicos. El compuesto es el 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid): ABTS, (**Figura 5.5**) al cual se lo llamó mediador.

Éste es capaz de ser oxidado por la enzima y a su vez, oxidar las estructuras de la lignina. Además, debido a su tamaño reducido, puede ingresar a la pared celular permitiendo su acción sobre los grupos fenólicos y no fenólicos presentes en el interior de la pared celular.



**Figura 5.5.** Estructura del ABTS

El mecanismo de acción propuesto simplificado se muestra en la **Figura 5.6**: El oxígeno presente en la solución oxida a la enzima, la cual oxida al mediador tomando un electrón y generando un radical libre. El mediador oxidado difunde dentro de las fibras y oxida a la lignina. El ciclo siguiente comienza cuando el oxígeno es reducido a agua.

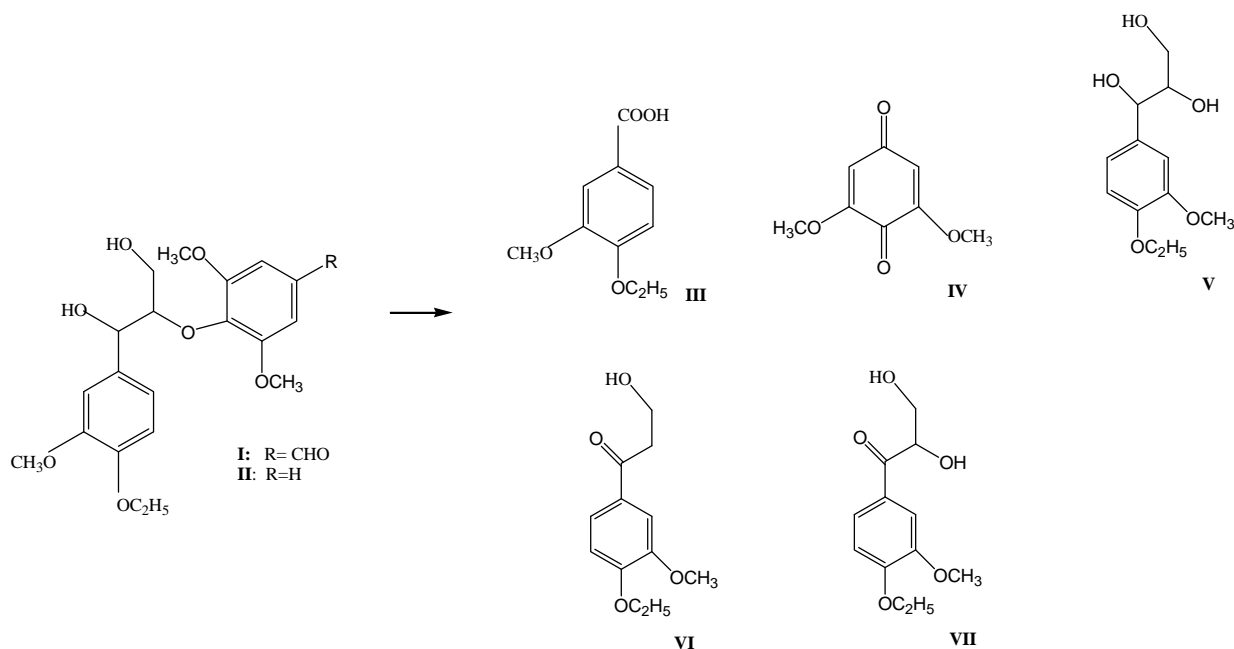


**Figura 5.6.** Mecanismo de reacción propuesto

Bourbonnais y col. (1995) encontraron otra ventaja del mediador. Se puede evitar la polimerización de ligninas *kraft* por acción de lacasas aisladas del hongo *Trametes versicolor* si está presente en el medio de reacción el mediador ABTS.



convertir el dímero **I** y **II** a varios compuestos diferentes, sugiriendo que la degradación puede proceder por varios caminos, como ruptura de enlaces  $\beta$ -éter; enlaces  $C\alpha$ - $C\beta$  y oxidación del  $C\alpha$ . También encontraron que la acción del sistema lacasa-HBT sobre el dímero **I** puede producir compuestos que involucran en sus etapas intermedias la apertura de anillos aromáticos.



**Figura 5.9.** Reacción de un compuesto modelo de lignina del tipo  $\beta$ -O-4 no fenólico con el sistema lacasa/HBT. Los productos formados pueden contener grupos ácidos carboxílicos y carbonilos.

En el área del pulpado celulósico en general, se ha explorado la aplicación del sistema lacasa-mediador (SLM) seguido de una extracción alcalina para optimizar el blanqueo de pulpas químicas (Paice y col. 1995, Bourbonnais y Paice 1996, Nelson y col. 1998, Sealey y col. 2000)

Por otro lado, se ha encontrado que el SLM es altamente eficiente para transformar hidrocarburos aromáticos policíclicos (Majcherczyk y Johannes 2000) y para decolorar colorantes sintéticos (Wong y Yu 1999).

Recientemente se ha empleado el sistema lacasa-HBT para remover extractivos lipofílicos que generan *pitch* en el papel obtenido a partir de pulpas *kraft* de eucalipto, pulpas termomecánicas de coníferas y pulpas a la soda-antraquinona de lino (Gutierrez y col. 2006).

Lund y Felby (2001) encontraron que el SLM mejora la resistencia en húmedo de pulpas *kraft* no blanqueadas. Adjudicaron este comportamiento a los radicales relativamente estables que

se forman por el tratamiento SLM y que luego posiblemente reaccionan durante la formación del papel produciendo enlaces interfibrilares estables.

Grönqvist y col. (2003) utilizando Resonancia Paramagnética Electrónica mostraron que el SLM es activo sobre pulpas termomecánicas no blanqueadas y blanqueadas basándose en el incremento de los radicales libres.

En 1999, Wong y col. analizaron, previo al refinado, los efectos del mediador HBT solo y del sistema lacasa-HBT en presencia de oxígeno sobre las propiedades de una pulpa *kraft* virgen de coníferas de *kappa* 70 y 90. Encontraron que a la misma densidad, la pulpa de *kappa* 70 tratada con el SLM aumentó el índice de tracción 6-7 puntos cuando se comparó con el tratamiento control. También estudiaron las propiedades físicas luego de la extracción con álcali-peróxido y encontraron que estos efectos fueron enmascarados por la acción del álcali-peróxido. Sin embargo, el control adoptado fue la pulpa tratada con mediador el cual modifica la densidad. Entendemos que para evaluar el efecto del tratamiento SLM, son necesarios controles sin el agregado de enzima ni mediador.

Por otro lado, desde el punto de vista tecnológico, resulta importante conocer la posibilidad de recuperar la enzima residual activa y recircularla en el proceso como se ha sugerido para otras enzimas.

Jackson y col. (1996) utilizando un surfactante no iónico en una solución de NaOH recuperaron la actividad de enzimas xilanasas y celulasas para recircularlas en el proceso.

Así, para recuperar las lacasas residuales sin que se desactiven, se podría utilizar un surfactante no iónico como el Tween 20. Sin embargo, su aplicación requiere conocer su efecto sobre propiedades papeleras.

Kondo y col. (1996) agregaron el surfactante Tween 80 durante el tratamiento de enzimas manganeso peroxidadas sobre una pulpa *kraft* de latifoliadas de N° *kappa* 17,0 con el objetivo de mantener su actividad enzimática y aumentar la blancura de la pulpa. Sin embargo no evaluaron su efecto sobre las propiedades de resistencia del papel.

Con el objetivo de delignificar y aumentar la blancura de pulpas de bajo contenido de lignina, varios autores han aplicado un tratamiento alcalino posterior al tratamiento enzimático.

Bourbonnais y col (1996) afirmaron que las estructuras generadas por el tratamiento enzimático pueden ser más susceptibles de fragmentarse por un tratamiento alcalino posterior.

Sealey y Ragauskas (1998) mostraron que el Sistema Lacasa-Mediador (SLM) seguido de una extracción alcalina simple es eficiente para demetilar, delignificar y generar ácidos carboxílicos en la lignina de pulpas *kraft* de bajo número *kappa*.

Chakar y Ragauskas (2000) utilizaron el sistema lacasa-HBT seguido de una extracción con álcali-oxígeno, álcali-peróxido y álcali-peróxido-oxígeno sobre pulpas de alto número *kappa* y encontraron una mayor delignificación y un aumento de la blancura respecto al tratamiento enzimático seguido de una extracción alcalina simple.

Paice y col. (1995) encontraron que el SLM seguido de una extracción alcalina reforzada con peróxido además de delignificar, aumenta el brightness de este tipo de pulpas.

Así, el tratamiento alcalino aplicado luego de SLM podría ser más efectivo para mejorar la capacidad de enlace de las fibras recicladas cuando se compara con un tratamiento alcalino simple.

Los tratamientos alcalinos se han utilizado para mejorar las propiedades de pulpas recicladas (Scott y Abubakr 1994; Gurnagul 1995). Sin embargo, este tratamiento no ha sido adoptado industrialmente debido a la elevada carga orgánica en los efluentes.

Teniendo en cuenta lo expuesto, en este capítulo se estudia el efecto del SLM sobre las propiedades físicas y químicas de una pulpa *kraft* no blanqueada reciclada. Por un lado, se evalúa su acción sin un tratamiento alcalino posterior de manera de estudiar el efecto de las estructuras oxidadas en la capacidad de enlace de las fibras. Por otro lado, se evalúa el efecto de un tratamiento alcalino posterior al enzimático. También se analiza el efecto del lavado con un surfactante no iónico como el Tween 20.