

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

Utilización de hongos de podredumbre blanca en la producción de pasta de celulosa de alto rendimiento

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

José María Carbajo García

Directores

Juan Carlos Villar Gutiérrez
Aldo Enrique González Becerra

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**UTILIZACIÓN DE HONGOS DE PODREDUMBRE
BLANCA EN LA PRODUCCIÓN DE PASTA DE
CELULOSA DE ALTO RENDIMIENTO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

JOSÉ MARÍA CARBAJO GARCÍA

DIRECTORES:

Juan Carlos Villar Gutiérrez

Aldo Enrique González Becerra

MADRID 2015

Juan Carlos VILLAR GUTIÉRREZ, Científico Titular del Departamento de Productos Forestales del Centro de Investigación Forestal (CIFOR) del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

y

Aldo Enrique GONZÁLEZ BECERRA, Científico Titular del Departamento de Virología y Microbiología del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICAN:

Que Don Jose María CARBAJO GARCÍA, Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “UTILIZACIÓN DE HONGOS DE PODREDUMBRE BLANCA EN LA PRODUCCIÓN DE PASTA DE CELULOSA DE ALTO RENDIMIENTO” y constituye la memoria que presenta para optar al Grado de Doctor. Y para que así conste a los efectos oportunos firman el presente certificado.

En Madrid, a 9 de Abril de 2015

Juan Carlos Villar Gutiérrez

Aldo Enrique González Becerra

**Un experto es aquel que
ya ha cometido todos los
errores posibles en una
materia muy concreta.**

Niels Bohr

**“...el papel, artificio maravilloso, que
apenas cede a otro alguno ni en ingenio
ni en utilidad”.**

Benito Jerónimo Feijoo

**A mis padres, por estar ahí siempre,
a Elena, por estar siempre ahí.**

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis no ha sido convencional. Ha tenido una duración superior a la esperada, con dos oposiciones de por medio y muchos cambios en mi vida. Por tanto, mucha gente ha tomado parte en ella, siendo en cierta medida responsable de que este trabajo esté hoy finalizado. Además de al desarrollo de esta tesis han contribuido al mío como persona. A todos ellos quisiera darles las gracias.

Me gustaría de modo especial agradecer:

- A mis directores de tesis, Juan Carlos Villar y Aldo González. A Juan Carlos, porque desde el primer día que llegue al laboratorio nunca me trató como a un becario y me ha permitido desarrollarme aprendiendo de sus aciertos y de sus errores. A Aldo, por iniciarme en el mundo de la ciencia, por su generosidad y por hacerme pensar.

- A mi tutora, Carmen Acebal, porque a pesar de estar muy ocupada en algunos momentos, nunca puso ningún inconveniente para recibirme y ayudarme con mis papeles.

- A Sergio Huerta, por acogerme en su grupo en la UAM-I (México) con mis experimentos con astillitas. Quisiera hacer extensivo este agradecimiento al resto de profesores que allí me ayudaron a ser uno más: Jorge Gracida, Octavio Loera, Mariano Gutierrez, Ernesto Favela y Gustavo Viniegra. De modo muy especial a José Sepúlveda (extensibles a Sergio), por su ayuda con el microscopio electrónico, por sus conversaciones y por dejarme conocer esa peculiar forma de vida que muchas veces me hizo envidiarle. Fuera del laboratorio no puedo dejar de tener un recuerdo muy especial para Inés Mendoza, que me ofreció su casa, su compañía y me ayudó a entender la idiosincrasia mexicana.

- A Orlando Rojas, por permitir que realizara una estancia en la NCSU (USA) aprendiendo una manera distinta de encararme con la lignina y con la vida. Gracias por dejarme conocer el científico al que algún día me querría parecer. No puedo dejar de agradecerle a él, a su mujer Selma, y a sus hijos el que me hicieran sentir uno más de la familia. En la NCSU hubo muchas personas que me ayudaron en el laboratorio y fuera de él. Thank you Chang Woo for your help with thin films, new for me, and Barbara for helping me with everything I need to buy. Thank you to Ana Filipa, Misha, Evellyn (and some people more every day) for not allowing me having lunch alone. I don't like to forget a special remember for Anderson Guerra.

- En el desarrollo de esta larga tesis ha pasado mucha gente por el laboratorio de Celulosa y Papel del INIA que han contribuido con su granito de arena a que esto llegue a buen puerto. Con todos ellos estoy en deuda pero es imposible citarlos a todos. De entre los que estaban cuando yo llegué y ya no continúan

recuerdo con especial cariño a Carlitos, que no acaba de irse, a Serfaty, que nunca me dijo que no a pesar de que muchas de las cosas que le proponía le parecían absurdas (y algunas lo eran) y como no, a Remedios, que me enseñó cosas del mundo del papel, del de la costura, del de la cocina y de tantas cosas más, además de, sobre todo, ser casi una madre en el laboratorio. Han sido infinidad los que llegaron y se fueron tras estancias más o menos largas. No puedo dejar de recordar a Ricardo por sus enseñanzas dentro y fuera del mundo papelerero, a Gerardo, por su excelente disposición y buena cabeza, a Luisa y a Ester por aguantar mis batallitas siempre con una sonrisa, y a tantos y tantos que hicieron sus proyectos, estancias, etc. conviviendo con mis manías y rarezas (María José, Marta, Millic, Bárbara, Miriam, Ruth, Úrsula, Pedro, Jesús, Jorge, y un montón de puntos suspensivos). Otros fueron llegando y continúan por el laboratorio, algunos no sabemos por cuanto tiempo como Raquel, que no se bien porqué, pero no me ha puesto nunca mala cara aunque alguna vez yo creo que me lo he merecido. Otros llegaron para quedarse, como Puri que me escucha con ganas e interés, David, con el que comparto puntos de vista y especialmente María (muchas gracias por tantos buenos momentos con y sin ciencia!!). Y como no, Sara (que aunque no está desde los comienzos, hace ya tanto que es como si llevará desde siempre), importante en que esto esté acabado (sabes que no has contribuido con un granito de arena, sino con dos o tres playas) y a la que un gracias por todo es la única forma de que estos agradecimientos no sean más largos que la propia tesis. Y desde el principio está Nuria, quien gracias a nuestros distintos puntos de vista me ha permitido aprender a ver las cosas de otra manera y me ha enseñado a tener “algo” de visión ingenieril. Por último, pero en una muy primera posición, también desde mi llegada está Esteban, mucho más que un compañero. Infinidad de artilugios, programitas, etc., vitales en esta tesis te deben su paternidad. Muchas gracias por enseñarme que si no tenemos algo, lo hacemos, pero sobre todo por enseñarme una filosofía de vida que espero llegar a aprender bien con los años

- Fuera del laboratorio pero dentro del INIA ha habido personas que sin tener ninguna obligación se han preocupado porque mi tesis llegara a buen puerto. No puedo dejar de agradecer su interés a Isabel Vázquez, Gregorio Montero y Ricardo Alía. También quiero tener un sincero agradecimiento con Dori y Toñi por todo su apoyo con la burocracia y sus entretenidas conversaciones. Y a Jesús, por ser uno más del laboratorio. Me gustaría también recordar a todos con los que he compartido cafés haciendo que el INIA sea mucho más que un lugar de trabajo (Ana Carmen, Maite, Rafa, Diego, Juan, David, Antonio,...).

- A mis compañeros del CIB con los que me inicié en el mundo de la investigación y donde surgió el interés por hacer una tesis. Gracias Tania, Susana, Howard, Ernesto, por ayudarme en mis primeros pasos en un laboratorio. Gracias a Ainhoa y Alejandro por su ayuda tanto en España como en México. Y como no a Carmen, que a pesar de no tener ni un minuto libre siempre ha encontrado un rato para animarme y ayudarme con esta tesis que es un poco suya.

- A mis amigos, que no se han cansado de preguntarme: ¿y cómo va esa tesis?. Al magnífico grupo con el que compartí clases de licenciatura: Cristina, Clara, Nuria, Almu, Marcos, Ramón, Miguelito, Javi (en el que hay que incluir parejas e hijos que después de tantos años se saben hasta nuestras batallitas), gracias porque nuestras conversaciones han ido cambiando desde a donde salir el sábado, a bodas, hipotecas, hijos..., pero siempre habéis encontrado un hueco para interesaros por mi vida y mis proyectos, entre ellos esta tesis. Roberto necesita de un gracias muy especial pues tengo que agradecerle que tenga el record de preguntar por la tesis; desde un lado u otro del charco, a pesar de todas sus ocupaciones, nunca ha sido capaz de acabar una conversación sin dejar de animarme a no dejar la puñetera tesis a medias. A Jose y a Fernando, porque a pesar de no vernos mucho, saben hacerse sentir cercanos

- A toda mi familia: de modo muy especial a mi abuela Julia, y mi tía Adeli, que siempre me preguntan con interés; a mis tíos Paco y Juani, mis primos Iñaki y Maria (por supuesto junto con Pilar, Paco y la prole) porque aunque no entienden mucho de ésto están dispuestos a escuchar mis explicaciones sobre lignina y hongos. A la familia de Elena (Beni, Alberto), porque de alguna manera a lo largo de esta tesis se han convertido en mi familia.

- Y como no, a mis padres, Agustín y Mary, y mis hermanos, Javi (&Paula) y Guti. A veces han dudado que llegara el día en que me vieran presentando este trabajo, pero su apoyo y sus animos han sido fundamentales para que este trabajo haya llegado a buen puerto.

- Y a Elena, claro está, que cuando empecé esta tesis era una amiga, y fue siendo algo más hasta llegar a convertirse en lo más. Ella es la responsable de que en momentos de desánimo las ganas de abandonar no hayan podido conmigo. Ha hecho mucho mas de lo que se le puede pedir a nadie, llegando a enfadarse si no le quitaba tiempo para dedicárselo a la tesis, preocupándose porque la cosa avanzara, diciendome esas cosas que no quieres oír pero que te tienen que decir y siendo comprensiva conmigo cuando el trabajo me superaba. Es imposible pedir más.

ÍNDICE.....	I
RESUMEN.....	IV
SUMMARY.....	VII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Estructura y composición de la madera.....	3
1.1. Ultraestructura de la pared celular.....	4
1.2. Composición química.....	5
1.2.1. Celulosa.....	6
1.2.2. Hemicelulosa.....	6
1.2.3. Lignina.....	7
1.2.4. Extractos.....	9
1.2.5. Compuestos inorgánicos.....	10
2. Procesos de obtención de pasta de celulosa.....	10
2.1. Procedimientos químicos.....	11
2.2. Procedimientos mecánicos.....	12
2.2.1. Procesos mecánicos de muela.....	13
2.2.2. Procesos mecánicos de refinador.....	13
2.3. Procedimientos semiquímicos.....	15
3. Biodegradación de la lignocelulosa.....	15
3.1. Los hongos.....	15
3.1.1. El reino de los hongos.....	15
3.1.2. Hongos que degradan la lignocelulosa.....	17
3.2. Bioquímica de la degradación de la lignocelulosa.....	19
3.3. Degradación de la lignina. Enzimas ligninolíticas.....	21
3.3.1. Lignina peroxidasa.....	24
3.3.2. Manganeso peroxidasa.....	24
3.3.3. Peroxidasa versátil.....	25
3.3.4. Lacasa.....	25
4. La biotecnología en la industria de celulosa y papel.....	29
4.1. Biopasteado.....	29
4.1.1. Biopasteado químico.....	31
4.1.2. Biopasteado mecánico.....	33
4.2. Bioblanqueo.....	36
4.3. Otras aplicaciones biotecnológicas.....	37
II. OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	40
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
1. Hongos y madera empleados.....	43
1.1. Hongos.....	43
1.2. Madera.....	44
1.2.1. Extracción de las astillas.....	44
2. Cultivo de los hongos.....	45
2.1. Cultivos sólidos.....	45

2.2. Decoloración de azul de ramazol y oxidación de ABTS.....	45
2.3. Preparación del hongo para su fermentación sobre astillas.....	45
3. Fermentación en estado sólido.....	46
3.1. Experimentos para biopasteado.....	46
3.1.1. Diseño del reactor.....	46
3.1.2. Condiciones y desarrollo de la fermentación.....	47
3.2. Experimentos para el estudio de las condiciones de fermentación.....	47
3.3. Tratamientos de las astillas una vez fermentadas.....	48
4. Análisis de los sobrenadantes.....	48
4.1. Determinación de actividades enzimáticas.....	48
4.1.1. Actividad lignina peroxidasa.....	49
4.1.2. Actividad manganeso peroxidasa.....	49
4.1.3. Actividad lacasa.....	49
4.1.4. Definición de unidad enzimática.....	49
4.2. Técnicas electroforéticas.....	49
4.2.1. Electroforesis nativas. Zimogramas.....	49
4.2.2. Isoelectroenfoque.....	50
5. Análisis químicos de la madera.....	51
5.1. Preparación de la muestra.....	51
5.2. Extractos en acetona y agua caliente.....	51
5.3. Lignina.....	51
5.4. Holocelulosa.....	52
5.5. Pentosanos.....	52
5.6. Análisis por FTIR.....	52
6. Producción de pasta mecánica y análisis.....	52
6.1. Producción de pasta. Medida del consumo de energía.....	52
6.2. Análisis de la calidad de la pasta.....	53
6.2.1. Grado de refinado Schopper-Riegler.....	53
6.2.2. Clasificación Bauer-McNett.....	53
6.2.3. Determinación de rechazos “Sommerville”.....	54
6.3. Formación de hojas y análisis de propiedades.....	54
7. Análisis microscópicos.....	54
7.1. Microscopía óptica.....	54
7.1.1. Análisis de muestras de madera.....	54
7.1.2. Análisis de muestras de pasta.....	55
7.2. Microscopía electrónica de barrido.....	55
8. Estudio de la degradación de films de lignina.....	55
8.1. Preparación de la lignina.....	55
8.2. Formación de los films de lignina.....	56
8.3. Caracterización de los films.....	57
8.4. Estudios de modificación de los films por acción de la lacasa.....	57
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
1. Selección de hongos de podredumbre blanca adecuados para el biopasteado.....	59
1.1. Preselección sobre placa.....	59
1.2. Selección mediante biopasteado.....	62

1.2.1. Variación del consumo de energía.....	62
1.2.2. Modificaciones producidas por los hongos sobre las astillas.....	67
1.2.3. Análisis de las enzimas producidas por los hongos.....	74
1.2.4. Análisis de la calidad de las pastas.....	74
1.3. Selección de microorganismos.....	81
2. Estudio de los extraíbles de la madera en el biopasteado.....	82
2.1. Estudio del crecimiento del microorganismo a diferentes tiempos.....	82
2.1.1. Análisis del consumo de O ₂	83
2.1.2. Estudio de enzimas ligninolíticas.....	84
2.1.3. Estudio microscópico.....	85
2.2. Estudio de la producción de pasta.....	90
2.2.1. Variación del consumo de energía.....	90
2.2.2. Modificaciones producidas por los hongos sobre las astillas.....	94
2.2.3. Análisis de las enzimas producidas por los hongos.....	99
2.2.4. Análisis de la calidad de las pastas.....	102
2.3. Conclusión.....	107
3. Estudio de capas de lignina y su degradación por el sistema lacasa mediador.....	107
3.1. Formación de films de lignina.....	107
3.2. Estudio del sistema lacasa mediador sobre los films de lignina.....	109
3.3. Conclusión.....	112
V. CONCLUSIONES.....	113
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	116

RESUMEN

La producción de pasta de celulosa a partir de madera se realiza tanto por procedimientos químicos como mecánicos. Cada tipo de pasteado produce pastas con diferentes propiedades, adecuadas para la fabricación de distintos tipos de papel.

El pasteado mecánico se denomina también de alto rendimiento ya que cuenta, entre sus principales ventajas, un alto aprovechamiento de la materia prima. Otras de sus ventajas son el empleo de bajas cantidades de reactivos químicos y la obtención de pastas de color claro, similar al de la madera, con buenas propiedades para la fabricación de papeles de impresión. Entre sus inconvenientes, cabe destacar que son pastas débiles, no adecuadas para la fabricación de papeles donde la resistencia sea un requisito fundamental.

Uno de los principales limitantes del pasteado mecánico, que impide incrementar su producción, es el elevado consumo energético que se requiere para este tipo de desfibrado. Este hándicap cada día cobra mayor importancia debido al aumento del precio de la energía eléctrica, por lo que la búsqueda de soluciones que permitan obtener pastas mecánicas de calidad, reduciendo el consumo de energía, es un objetivo que resulta cada vez más interesante.

La presente Tesis Doctoral estudia el uso de hongos de podredumbre blanca en la producción de pasta mecánica. Los hongos de podredumbre blanca son los principales responsables de la biodegradación de la lignina en la naturaleza. La lignina es la responsable de la unión de las fibras de celulosa en la madera y otros materiales lignocelulósicos. Dicha degradación la realizan mediante un complejo y variado grupo de enzimas oxidativas entre las que destacan lacasas (fenoloxidasas) y peroxidasas.

En la primera parte de este trabajo se seleccionaron los hongos que demostraron ser más adecuados para facilitar un posterior pasteado mecánico. Si bien son muy habituales los trabajos donde se seleccionan hongos de podredumbre blanca por su capacidad ligninolítica y se proponen como candidatos a realizar un biopasteado eficaz, no es fácil encontrar estudios donde esta selección se haga directamente. Es decir, fabricando pasta de celulosa con las astillas fermentadas y evaluando el consumo de energía del proceso y la calidad de las pastas producidas.

Para ello, se partió de 30 hongos preseleccionados por bibliografía, así como por su disponibilidad. Se realizó una primera selección de 10 hongos mediante métodos clásicos en placa Petri, evaluando su crecimiento y capacidad ligninolítica. A continuación, se llevó a cabo una fermentación en estado sólido de astillas de pino con los 10 microorganismos preseleccionados y se evaluó el consumo de energía en un posterior proceso de pasteado. Además, se analizaron los cambios químicos producidos por los hongos en las maderas fermentadas así como las enzimas producidas por dichos microorganismos. Sobre las pastas obtenidas, también se evaluó su calidad papelera y se fabricaron hojas de ensayo para caracterizarlas. Los resultados muestran que *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes* sp. I-62 produjeron los mayores ahorros de energía (de cerca de un 15 %) produciendo pastas de calidad similar a los controles. Sin embargo, se observó que la eliminación de lignina no era significativa, aunque este polímero sí se encontraba más oxidado. No se pudieron determinar las enzimas que participan el proceso porque las sustancias extraíbles de la madera interfieren con los métodos habituales utilizados en su cuantificación.

En un segundo apartado, se ha estudiado el efecto de los compuestos extraíbles de la madera sobre la fermentación en estado sólido y el posterior pasteado, ya que la información encontrada es confusa y no hay una conclusión clara acerca de si la eliminación de estos compuestos de la madera puede favorecer o dificultar la fermentación. El trabajo se ha llevado a cabo con *P. sanguineus* y *Trametes* sp. I-62, seleccionados en el apartado anterior. Este estudio consta a su vez de dos partes: (a) realización de fermentaciones a diferentes tiempos con pequeñas cantidades de astillas para poder hacer un seguimiento temporal de la fermentación; (b) fermentación de cantidad suficiente de astillas para obtener pasta mecánica y poder hacer así realizar una nueva evaluación directa de la influencia de los compuestos extraíbles sobre el ahorro de energía y la calidad de las pastas producidas.

Del estudio a distintos tiempos se concluye que el crecimiento de *P. sanguineus* es mayor que el de *Trametes* sp. I-62 y que dicho crecimiento se ve favorecido por la eliminación de los compuestos solubles en acetona. También durante este estudio se ha puesto de manifiesto que la lacasa desempeña un papel importante en el crecimiento del hongo sobre las astillas y la degradación de la lignina.

Al realizar pasteados, tras fermentar una mayor cantidad de astillas, sorprende el elevado ahorro energético logrado por los controles abióticos extraídos; es decir, astillas

a las que se les ha retirado los extraíbles pero no han sido sometidas a fermentación, que llega a alcanzar un 13 % si se eliminan los compuestos solubles en acetona. Tras la fermentación fúngica, este porcentaje aumenta hasta alcanzar valores cercanos al 25 %. Cabe destacar que, con este pretratamiento, la calidad de las pastas obtenidas no sufre grandes cambios. Aunque se logran pequeñas mejorías en algunos parámetros, como la resistencia a la tracción, también hay pequeñas pérdidas de blancura, posiblemente debidas a las oxidaciones que causan los hongos sobre la lignina.

De todo este proceso se puede concluir que la eliminación de los compuestos extraíbles, y posterior fermentación, causa unos ahorros de energía importantes aunque la inclusión de las etapas de extracción y fermentación, tiene un coste cuya cuantificación excede los límites de este trabajo. No obstante, este procedimiento resulta especialmente interesante en el marco actual de producción de pastas de celulosa, donde las fábricas tienden a integrarse bajo un esquema de biorrefinerías. En este contexto, la aparición de corrientes de extraíbles, de donde podrían extraerse productos de alto valor añadido, debe tenerse muy en cuenta.

En una última parte del trabajo se ha estudiado la degradación de films de lignina por la enzima lacasa con ayuda de un compuesto mediador. Empleando técnicas como la microbalanza de cristal de cuarzo se consigue evaluar como este sistema lacasa-mediador no es capaz de degradar el film aunque sí que lo oxida notablemente, lo que provoca importantes cambios en su rigidez e hidrofobicidad. Los resultados obtenidos con este modelo son coherentes con los encontrados cuando se realizaban fermentaciones de astillas con los hongos de podredumbre blanca.

En general, se puede concluir que se ha demostrado la capacidad de microorganismos como *P. sanguineus* y *Trametes* sp. I-62, para producir ahorros energéticos importantes en la producción de pasta mecánica sin apenas modificar sus propiedades. Se ha puesto también de manifiesto que para mejorar este ahorro se pueden eliminar los compuestos extraíbles en acetona. También se ha establecido que dichos ahorros se logran sin una deslignificación extensiva, aunque con una importante oxidación de la lignina. En este proceso de oxidación la lacasa tiene un importante papel, como evidencian los ensayos con films modelo de lignina.

SUMMARY

The production of cellulose pulp from wood is performed by both mechanical and chemical procedures. Each type of pulping produces pulp with different properties suitable for the manufacture of various types of paper.

The mechanical pulping is also called high performance pulping since one of its main advantages is the high efficient use of the raw material. Other advantages are the use of low amounts of chemicals and the possibility to obtain light-colored pulp, wood-like, with good properties for the manufacture of printing papers. Among its disadvantages, these pulps are weak and not suitable for the manufacture of paper, where strength is a fundamental requirement.

One of the main limitations of mechanical pulping, which prevents significant increment of its productivity, is the high energy consumption required for this type of pulping. Nowadays, this handicap becomes more relevant regarding the continuous rise of energy prices thus, finding solutions to obtain mechanical cellulose pulp, by reducing energy consumption, is a goal that is becoming increasingly interesting.

This thesis describes the use of white rot fungi in the production of mechanical pulp. The white rot fungi are primarily responsible for lignin biodegradation in nature. Lignin is responsible for the binding of the cellulose fibers in wood and other lignocellulosic materials. Lignin degradation is carried out by a complex and diverse group of oxidative enzymes among which include laccases (phenoloxidases) and peroxidases.

The first major section of this thesis describes the selection of suitable fungi that facilitates further mechanical pulping. Commonly, white rot fungi are selected for their ligninolytic capacity and are also proposed to conduct an effective biopulping; however, its selection is barely performed by direct methods assays that enable the manufacture of pulp fermented chips and the evaluation of both process energy consumption and quality of pulp produced.

For this, we selected about 30 shortlisted fungi from literature, taking also into account its availability. Performance of each of these fungi was carried out by classical methods in Petri dish and we finally select the best 10 fungi regarding growth yield and ligninolytic capacity. Then, each of the 10 selected microorganisms were grown on pine chips under solid state fermentation and energy consumption was evaluated in a subsequent pulping process. Moreover, chemical changes on the fermented woods, as

well as the enzymes produced by these fungi along the process, were also evaluated. The quality of the pulps obtained was also evaluated and paper handsheets were made to characterize them. The results show that *Pycnoporus sanguineus* and *Trametes* sp. I-62 produced the highest energy savings (of around 15%) producing pulp quality similar to controls. It was also observed that a significant removal of lignin was not produced, although this polymer was more oxidized. However, enzymes involved could not be determined because wood extractives interfere with the usual methods of quantification. The second major section of this thesis describes work carried out to study the effect of wood extractable compounds on solid state fermentation and subsequent pulping because, up to now, the information reported in previous works did not evidence whether the removal of these compounds from the wood could facilitates the fermentation process. The study was performed with *P. sanguineus* and *Trametes* sp. I-62, selected in the previous section. This study comprised in two main parts, (a) fermentations performed at different times, with small quantities of chips, for monitoring the fermentation time and (b) assessment of the influence of extractable compounds on energy saving and quality of pulp produced by fermentation of an adequate amount of chips for mechanical pulping.

From the different times part, it can be concluded that the growth of *P. sanguineus* is greater than the *Trametes* sp. I-62, and favored by the removal of compounds soluble in acetone. Moreover, these results also demonstrated that laccase plays an important role in the growth of the fungus on the chips and in lignin degradation.

Surprisingly, in the mechanical pulping part, the extracted abiotic controls (i.e. chips which have been extracted but have not been subjected to fermentation) achieved high energy savings, up to 13%, if acetone-soluble compounds are removed. After fungal fermentation this percentage increases to 25%. Interestingly, the use of this pretreatment method did not affect the quality of the pulp but some improvements were reached in some parameters, such as tensile strength. However, there are small losses of brightness, possibly due to lignin oxidation caused by fungi.

In conclusion, the removal of extractable compounds and subsequent fermentation causes significant energy savings. While the inclusion of extraction stages and fermentation has a cost which quantification exceeds the limits of this work, the process is particularly interesting in the current situation where pulp mills tend to integrate

under a scheme of biorefineries. In this context, the emergence of currents removable from which could be obtained products with high added value has to be considered.

In a last major part of this thesis work, we have studied the degradation of lignin films by laccase using a mediator compound. By the use of quartz crystal microbalance, we observed that laccase-mediator system is not capable of degrading the film although it is significantly oxidized, resulting in major changes in its rigidity and hydrophobicity. The results achieved with this model are consistent with those obtained when chip fermentations were conducted with white rot fungi.

In conclusion, the work described here demonstrated the ability of microorganisms such as *P. sanguineus* and *Trametes* sp. I-62 to produce significant energy savings in the production of mechanical pulp without significantly modify its properties. It has also shown that these savings can be improved removing extractable compounds in acetone. It has also been established that these savings are achieved without extensive delignification, but with a significant oxidation of lignin. In this oxidation process the laccase has an important role, as evidenced by the assays carried out on lignin model films.

I. INTRODUCCIÓN

La biotecnología está presente en nuestras vidas desde los albores de la civilización, cuando se desarrollaron fermentaciones como la del pan, el vino, el yogurt, o la cerveza, aunque poco se sabía sobre lo que ocurría en el proceso. Posteriormente, los avances en el conocimiento de la microbiología, la bioquímica y la química industrial permitieron que la biotecnología desempeñara un papel primordial en el desarrollo de procesos tan importantes como la producción de antibióticos. Hoy, en pleno auge del “desarrollo sostenible”, la biotecnología se ha convertido en un área cada vez más pluridisciplinar, donde el introducir aplicaciones biotecnológicas en procesos industriales convencionalmente no biotecnológicos, suele contribuir hacia procesos más limpios, eficientes y de un menor coste.

El presente trabajo aborda el empleo de microorganismos en la producción de pasta de celulosa mediante procedimientos mecánicos. Este procedimiento presenta ventajas frente a los procesos de pasteado químico, mucho más extendidos en nuestro país, como un mayor rendimiento o una baja tasa de emisiones contaminantes. No obstante presenta otros inconvenientes, como un alto consumo energético y una baja resistencia de los papeles obtenidos a partir de dichas pastas, lo que dificulta su implantación. El empleo de una etapa de fermentación en estado sólido con hongos ligninolíticos, tal y como aquí se propone, puede contribuir a disminuir los inconvenientes del proceso.

La aplicación de estos microorganismos con el fin de contribuir a los procesos de pasteado, se viene realizando en distintos países desde hace más de 20 años. Las principales novedades del presente trabajo son el empleo de la materia prima que emplea la industria nacional, el tratar de relacionar los cambios en las propiedades papeleras de las pastas con las modificaciones estructurales y químicas que sufre la madera y contribuir a esclarecer el papel de los componentes minoritarios de la madera en el “biopasteado”, aspecto sobre el que la información existente es escasa y poco concordante.

1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA MADERA

Se define como madera al conjunto de tronco, raíces y ramas de los árboles y arbustos una vez eliminada la corteza. Cabe distinguir la estructura de la madera de frondosas o latifoliadas (dicotiledóneas) de la de coníferas (monocotiledóneas). La estructura de las primeras se encuentra formada principalmente por dos tipos celulares, las traqueidas, también denominadas fibras, con una función principal de sostén y los vasos, con función conductora de la savia. Estos tipos presentan elementos anatómicos singulares en cada especie lo que permite su empleo en tareas de identificación. Junto a éstos existe un tercer tipo celular, las células de parénquima, que tienen como funciones principales la reserva de nutrientes y la formación de radios leñosos.

La estructura de las coníferas está formada principalmente por fibras, por lo general de mayor tamaño que en las frondosas y que aúnan las funciones estructurales y de transporte. Estas fibras presentan diversos tipos de perforaciones denominadas también punteaduras que son el principal elemento anatómico identificativo en estas especies. Junto a éstas aparecen las células del parénquima, con su función de reserva y formando estructuras de comunicación como los radios leñosos (Kollzmann, 1959).

Las fibras de especies de coníferas y frondosas presentan diferencias de tamaño que se recogen en la tabla I, pero su estructura es similar, como lo es también a la de las fibras presentes en otros materiales lignocelulósicos. Estos elementos, una vez que se convierten en células muertas que pierden el protoplasma, quedan como tubos huecos y son los principales constituyentes de la gran mayoría de los papeles y cartones. Parte de las propiedades de éstos, radican en la estructura de la pared de las fibras, por lo que ésta se describe con más detalle a continuación.

	Coníferas	Frondosas
Longitud de fibra (mm)	2,5-3,5	1,1-1,5
Ancho de fibra (µm)	5-40	19-28
Espesor de pared (µm)	3,8-5,2	3,2-4,9

Tabla I.-Tamaños habituales de fibras de frondosas y coníferas (tomado de Aitken *et al.*, 1988).

1.1. Ultraestructura de la pared celular

La pared celular se compone de diversas capas que se muestran en la figura 1. Ordenadas desde el exterior al interior de la fibra, denominada lumen, se distinguen las siguientes capas (Peraza *et al.*, 1993; Paniagua *et al.*, 1993).

-Lámina media o pared intercelular: Se denomina así a la materia presente entre fibras aledañas. Se compone principalmente de lignina y en menor medida de hemicelulosas, y presenta un carácter isotrópico. Se puede considerar el elemento que mantiene unidas las fibras entre sí. Tiene un espesor entre 0,5 μm y 2 μm .

-Pared primaria: Está compuesta de lignina y celulosa en proporciones similares. Tiene un espesor muy delgado (0,1-0,5 μm). Debido a esta característica se conoce poco de su estructura aunque se sabe que las fibrillas de celulosa que forman parte de este elemento no se encuentran orientadas. Parece ser un elemento de transición entre la laminilla media y la pared secundaria, y muchas veces es difícil diferenciarla de la lámina media.

-Pared secundaria: Es el elemento mayoritario en la composición de las fibras. Presenta un espesor de 1 a 10 μm en función de la especie forestal y de la época del año en la que se forma la fibra (las fibras formadas en primavera tienen menor espesor que las formadas en otoño). Está formada principalmente por celulosa con pequeñas cantidades de lignina. Se diferencian tres subcapas, denominadas S_1 , S_2 y S_3 (desde el exterior al interior). Las fibrillas de celulosa están orientadas, paralelas entre sí, pero en planos diferentes en cada capa.

La capa S_1 es delgada (0,1 a 0,3 μm); aunque la lignina es minoritaria es el elemento de la pared secundaria con mayor contenido de este polímero. Las fibrillas se encuentran orientadas casi perpendiculares al eje vertical, distribuidas formando una hélice. La capa S_2 es la más gruesa, suponiendo en torno al 80 % del espesor de la pared de las fibras, y en ella las fibrillas están casi paralelas al eje longitudinal; es la principal responsable de la rigidez de la fibra. La capa S_3 es la más delgada (0,1 μm), con las fibras orientadas de modo análogo a la capa S_1 . En ocasiones (en muchos elementos de las coníferas y en algunas frondosas) aparece una fina capa verrugosa que contiene componentes no fibrosos procedentes de la degradación del protoplasma celular.

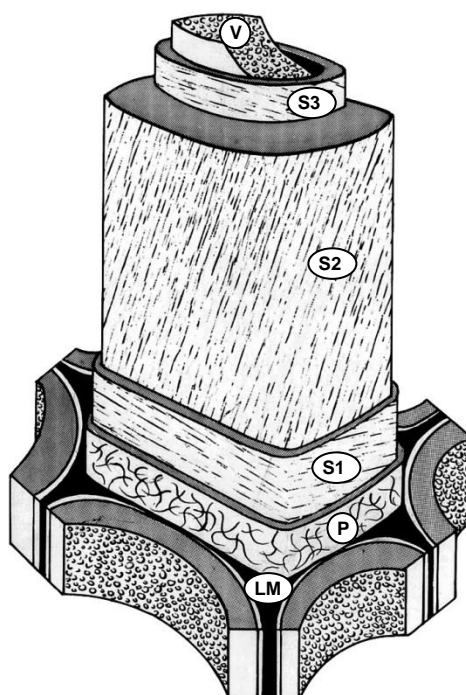


Figura 1.-Estructura de la pared celular. LM: Lámina media; P: pared primaria; S1, S2 y S3: subcapas de la pared secundaria; V: capa verrugosa.

1.2. Composición química

Al estudiar la composición química de la madera se suelen dividir sus constituyentes en elementos mayoritarios (celulosa, hemicelulosa y lignina) y elementos minoritarios (extractos y minerales). Las proporciones de los diferentes elementos, así como las variedades dentro de ellos, dependen de la especie estudiada y de las condiciones de crecimiento. Los diferentes autores que han estudiado este aspecto dan diferentes rangos para los porcentajes de composición. En la tabla II se muestran unos datos estimativos.

	Coníferas	Fronosas
Celulosa	40-46	42-48
Hemicelulosa	20-25	25-35
Lignina	25-30	18-27

Tabla II.-Porcentaje de los componentes mayoritarios en las maderas de coníferas y frondosas.

1.2.1. Celulosa

Está formada por la polimerización de unidades de D-glucosa mediante enlaces glicosídicos del tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (figura 2). Las moléculas de celulosa presentan un grado de polimerización de 7000 a 14000. Unas cadenas de celulosa se unen a otras formando las microfibrillas, en las que se alternan zonas amorfas y zonas cristalinas. Estas últimas son más inaccesibles a los reactivos químicos y sus uniones son más fuertes que las de las zonas amorfas. (Aitken *et al.*, 1988; Higuchi, 1990; Peraza *et al.*, 1993).

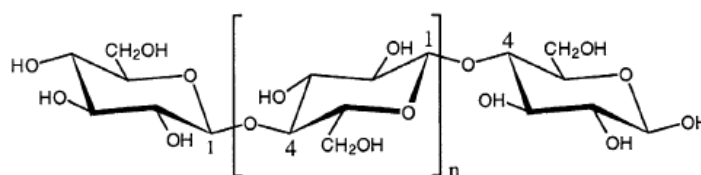


Figura 2.-Molécula de celulosa.

1.2.2. Hemicelulosa

Las hemicelulosas, a diferencia de la celulosa, están formadas por una variedad de monosacáridos, unidos a través de diversos enlaces. Los monómeros son tanto pentosas (xilosa, arabinosa) como hexosas (glucosa, manosa, galactosa) y se unen principalmente a través de enlaces 1-3, 1-6 y 1-4. Además de los monosacáridos, también forman parte de las hemicelulosas, derivados de estos, como las pectinas, formadas por ácidos glucurónicos y galacturónicos (Sarkanen y Ludwig, 1971; Cowling y Kirk, 1976; Higuchi, 1990). Los monómeros más abundantes se observan en la figura 3. Su composición varía según el tipo de madera que se considere.

En las frondosas, son mayoritarios los xilanos, formados predominantemente por unidades de β -D-xilopiranosas, unidas mediante enlaces entre los carbonos 1 y 4 de dos unidades consecutivas. Añadidos a esta cadena lineal y anclados en los carbonos C₂ o C₃ se encuentran grupos acetilo, unidades de arabinosa y ácido α -metilglucurónico, difiriendo de unas especies a otras (Wong y col., 1996).

En las coníferas son más abundantes los glucomananos. En su estructura, la manosa y la glucosa están unidas por enlaces β -1,4 y en una proporción de 3:1 (Stoll *et al.*, 1999). Las unidades de galactosa se unen a la posición 6 de las unidades de manosa, mientras que en las posiciones 2 y 3, tanto de manosa como de glucosa, se pueden

encontrar grupos acetilo. Cuando el contenido en unidades galactosa es reducido, se habla entonces de glucomananos, en caso contrario de galactoglucomananos.

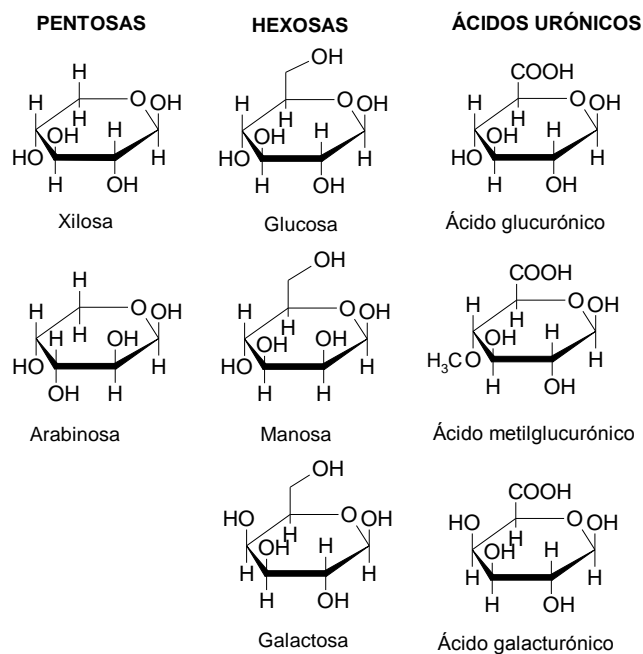


Figura 3.-Principales monómeros que componen las hemicelulosas.

1.2.3. Lignina

La lignina es un polímero aromático tridimensional, amorfo, formado por la polimerización oxidativa de tres monómeros derivados del fenilpropano: alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (figura 4). Estos monómeros se denominan monolignoles y son sintetizados por las plantas a partir de la fenilalanina a través de la vía del ácido siquímico (Higuchi, 1990).

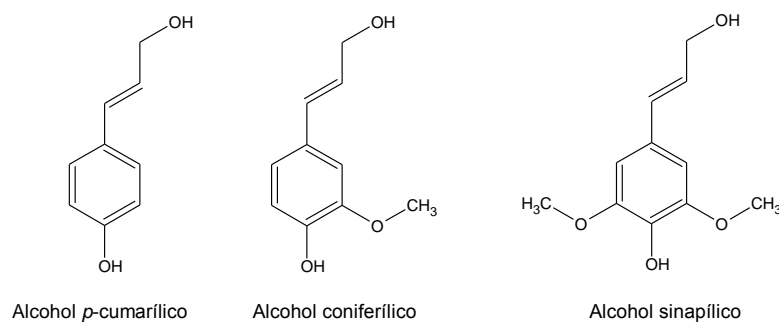


Figura 4.-Monómeros constituyentes de la lignina.

Los monolignoles se encuentran en muy diferentes proporciones según la especie vegetal, condición de crecimiento o tipo de tejido a estudiar. En coníferas el alcohol coniferílico es el monómero mayoritario, mientras que en frondosas la lignina se forma a partir de cantidades semejantes de alcoholes sinapílico y coniferílico. El alcohol *p*-cumarílico, que en especies arbustivas aparece de forma minoritaria, supone una importante proporción en la lignina de plantas herbáceas (Higuchi, 1985).

Estas estructuras son oxidadas por las peroxidasas de los vegetales, formando radicales que polimerizan de forma aleatoria (Sarkanen y Ludwig, 1971). Predomina el enlace β -O-4 (supone en torno al 50% de los enlaces) aunque existen diversos enlaces C-C y C-O (figura 5). Desde un punto de vista estérico, la lignina, al polimerizar, va ocupando los espacios que dejan libres los elementos fibrilares polisacarídicos que han polimerizado con anterioridad. La lignina también se une a la hemicelulosa a través de uniones éter, éster y fenil-glucósido principalmente, formando el denominado complejo lignina-hidrato de carbono.

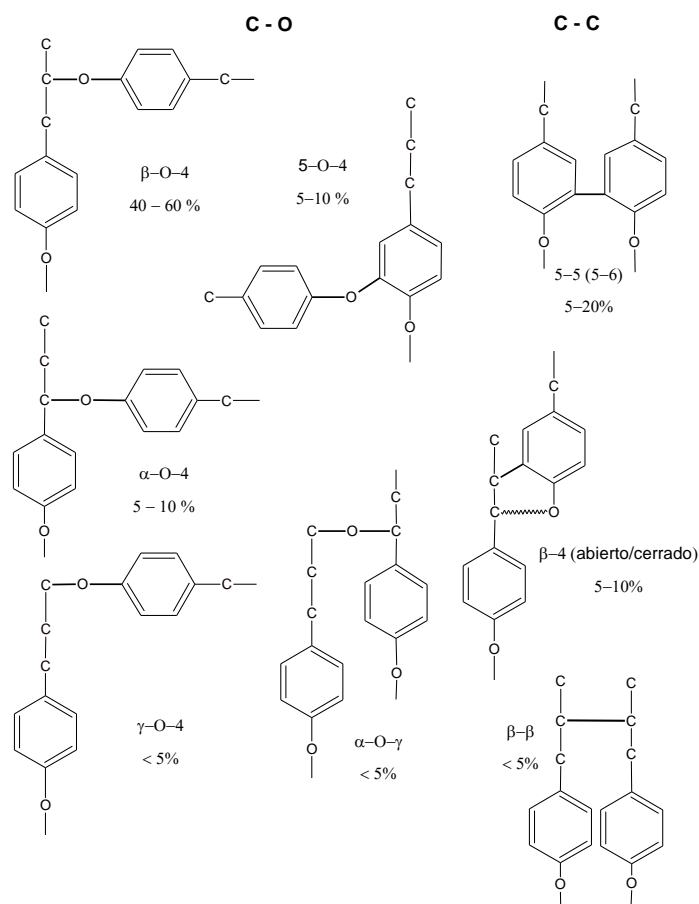


Figura 5.-Frecuencia de los enlaces C-C y C-O más habituales en la lignina.

La diversidad de monómeros, de tipos de enlace y la no existencia de unas reglas sencillas en la polimerización, hace que la lignina sea uno de los biopolímeros con más complejidad en su estructura (Higuchi, 1985). En esta heterogeneidad radica parte de la dificultad para su biodegradación (Broda *et al.*, 1996). La lignina es un polímero de difícil caracterización estructural, al aunarse su complejidad (diversos monómeros y enlaces) con la dificultad para aislarla sin modificar su estructura. Esto hace que esta estructura no se encuentre aún bien definida, aunque hay diversos modelos que son ampliamente aceptados, como el propuesto por Adler (1977) (figura 6).

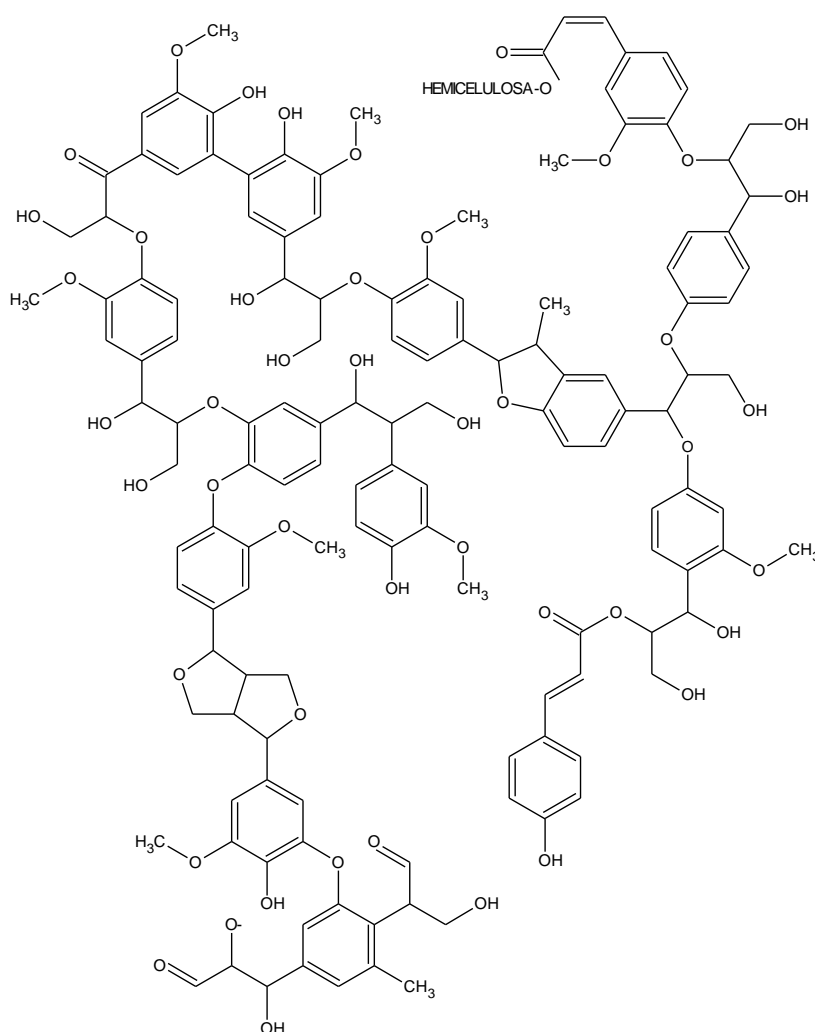


Figura 6.-Modelo de la estructura de la lignina propuesto por Adler (1977).

1.2.4. Extractos

Se conoce como extractos a los componentes minoritarios de la madera que son solubles en agua o en disolventes orgánicos. Bajo este término se agrupan una

diversidad de moléculas de diferente estructura y función. Dentro de la variedad de estructuras se puede destacar la elevada presencia de anillos aromáticos y de estructuras de carácter polifenólico. Entre sus funciones fisiológicas, participan en varios aspectos como favorecer la polinización o prevenir la evaporación de agua; muchos de ellos son ampliamente reconocidos como agentes protectores frente al ataque de bacterias y hongos.

El grupo más abundante corresponde a los taninos, clasificados en hidrolizables y condensados. También los ácidos resínicos, presentes sobre todo en coníferas, los terpenos, polímeros del isopreno y otra variedad de compuestos como látex y gomas (Hillis, 1962).

1.2.5. Compuestos inorgánicos

No suelen suponer más del 1 % de la madera, pero son indispensables para el correcto desarrollo del árbol. Las sustancias más abundantes son sales de calcio, potasio y magnesio. Un segundo grupo, presente en menor proporción, comprende manganeso, sodio, fósforo y cloro. Los elementos presentes en menos de 50 ppm se denominan trazas y entre ellos destacan aluminio, hierro, zinc y cobre entre otros.

2. PROCESOS DE OBTENCIÓN DE PASTA DE CELULOSA

Actualmente, el papel se fabrica a partir de pasta de celulosa, salvo calidades muy especiales que pueden prepararse a partir de fibras sintéticas (nylon, poliéster), animales (lana) o minerales (asbesto). La pasta de celulosa se produce a partir de fibras vegetales, principalmente de madera. Esto es así desde el siglo XIX, cuando se empezaron a emplear las tecnologías para el desfibrado mecánico de la madera desarrolladas en el siglo XVIII. Poco después surgieron los procedimientos para el desfibrado químico (primero el proceso al sulfito y a continuación los procesos a la sosa y al sulfato). Esta nueva materia prima desbancó a la pasta de trapos que era lo más empleado hasta entonces y solucionó el déficit de materias primas celulósicas (Keim, 1966).

La dificultad de emplear madera radica en cómo separar las fibras de celulosa, fuertemente unidas por la lignina tal y como se ha descrito en 1.1. Actualmente se emplean procedimientos químicos, procedimientos mecánicos y procedimientos semiquímicos, que son una combinación de los dos anteriores. En la tabla III se presentan datos de producción de pastas madereras para papel en el año 2013 (FAO,

2013). Todos los procesos comparten una serie de operaciones previas como el descortezado de la madera y el astillado (salvo los procesos mecánicos de muela). A continuación se describen los fundamentos de los diferentes tipos de pasteado (Smook, 1990).

		Químicas	Mecánicas	Semiquímicas
España	Producción (T/año)	1.868.500	89.000	0
	%	95,5	4,5	0
Europa	Producción (T/año)	32.568.668	12.111.170	1.717.046
	%	70,2	26,1	3,7
Mundial	Producción (T/año)	131.041.286	27.770.167	8.814.188
	%	78,2	16,6	5,2

Tabla III.-Datos de producción de pastas madereras para papel en 2013.

2.1. Procedimientos químicos

Se basan en disolver la lignina que mantiene unidas las fibras de celulosa. Para alcanzar elevados grados de deslignificación se solubilizan también gran parte de las hemicelulosas y celulosa amorfa, con lo que tienen un rendimiento en torno al 50%. La separación de las fibras es eficaz, por lo que darán lugar a papeles resistentes. No se puede eliminar toda la lignina sin dañar la celulosa en exceso, y la lignina residual puede estar fuertemente coloreada por las modificaciones químicas a las que se somete durante la cocción. En cualquier caso, e independientemente de si se produce o no oscurecimiento en la lignina residual, las pastas deben ser aún blanqueadas si se pretenden usar en papeles donde la blancura sea el principal requisito.

Entre los procesos químicos de deslignificación se distinguen los procesos de pasteado ácidos y los procesos alcalinos. Dentro de los primeros está el proceso al sulfito, que emplea sulfito de calcio, de magnesio, de sodio o de amonio como agente deslignificante. Actualmente es minoritario frente al proceso al sulfato o Kraft, pero fue el predominante desde su invención hasta aproximadamente la mitad del pasado siglo. Presenta como ventajas la mayor facilidad para blanquear las pastas y el valor añadido de sus subproductos (lignosulfonatos). Hoy, su principal uso es la producción de la

denominada celulosa para disolver, que es empleada por las industrias productoras de derivados de la celulosa (acetato de celulosa, nitrocelulosa, etc.).

El proceso alcalino mayoritario es el proceso Kraft, que emplea hidróxido de sodio y sulfuro de sodio como agentes deslignificantes. También se conoce como proceso al sulfato porque éste es el reactivo que se añade para compensar las pérdidas de álcali. Produce pastas muy resistentes y con mayor rendimiento que el proceso al sulfito. Cuando se desarrolló el proceso (siglo XIX) eran pastas difíciles de blanquear, pero con los avances de las tecnologías de blanqueo, estas dificultades han ido disminuyendo, extendiéndose el uso de estas pastas en la misma medida. Sus principales ventajas radican en la recuperación de energía y reactivos a partir del denominado licor negro, que contiene los reactivos gastados y los componentes disueltos de la madera y en la posibilidad de aplicarse a cualquier materia prima lignocelulósica, que es una importante restricción en el proceso al sulfito.

2.2. Procedimientos mecánicos

Pretenden separar las fibras mecánicamente. Lo logran con ayudas de muelas o de refinadores de discos, dando lugar a los dos grandes grupos de procesos mecánicos, según el elemento que se emplee. Presentan la ventaja de tener un alto rendimiento, ya que solo se pierde la fracción de la madera soluble en agua (normalmente menos de un 10%). Como desventajas, destaca la pérdida de calidad de las fibras, que al ser separadas mecánicamente y contener toda la lignina no se separan con la perfección, ni quedan tan íntegras como en los procesos químicos. Además, la presencia de gran parte de la lignina supone que la calidad de los enlaces fibra-fibra es mucho menor, pues se dificulta la formación de enlaces de hidrógeno entre moléculas de celulosa de fibras adyacentes. La otra gran desventaja es el elevado consumo de energía de estos procesos, ya que para conseguir la separación de las fibras los elementos desfibradores han de ser impulsados por motores de elevada potencia.

Dada la degradación que sufren las fibras durante el pasteado mecánico estos procesos están restringidos al uso de ciertas especies forestales, principalmente coníferas, que poseen fibras de mayor longitud. Otra característica que se busca en la materia prima es que sean maderas de color claro, ya que estas pastas muchas veces se emplean sin blanquear, puesto que el proceso mecánico no provoca cambios importantes en el color y las pastas tienen un color semejante al de la madera de partida.

Si estas pastas se someten a procesos de blanqueo, en ellos no se elimina la lignina, como en el caso de las pastas químicas, sino que se realizan blanqueos que eliminen sus grupos cromóforos. No obstante, no se consiguen blancuras muy elevadas y presentan problemas de amarilleo ya que las reacciones se pueden revertir y los grupos cromóforos reaparecen.

Las pastas mecánicas se destinan principalmente a la elaboración de papel prensa y papel revista, en muchos casos con aportes de pasta química para aumentar su resistencia. A continuación se describen más detalladamente los principales procesos mecánicos de pastado.

2.2.1. Procesos mecánicos de muela

Son los primeros procesos que se desarrollan para la obtención de pastas papeleras a partir de madera. Se basan en presionar troncos de madera descortezados sobre una muela abrasiva para que desfibre la superficie del tronco. Mediante chorros de agua se consigue retirar las fibras liberadas de la muela y refrigerar el proceso. Las distintas variantes del proceso se conocen con sus siglas en inglés. El proceso original se denomina SWG (Stone Ground Wood), el cual se desarrolla a presión ambiente, a una temperatura de 70-75 °C. Variantes del proceso, efectúan el desfibrado a presión (PGW: Pressurized Ground Wood), o con agua a mayor temperatura (TGW: Temperature Ground Wood). Todos estos procesos tienen rendimientos en torno al 98%.

2.2.2. Procesos mecánicos de refinador

En estos procesos, la madera alimentada en forma de astillas es desfibrada al hacerse pasar entre discos paralelos con superficie estriada (figura 7). Se desarrollan en los años 60, y por las ventajas que suponen, en pocos años reemplazan parcialmente a los procesos de muela, así en 1975, las pastas de refinador suponen un 10 % de las pastas mecánicas, mientras que en 1980 ya suponen en torno a un 50%. Los rendimientos son similares a los obtenidos mediante muelas (en torno al 98%). Las pastas producidas son más resistentes (la separación de las fibras es más eficaz), pero no han sustituido totalmente a las pastas de muela porque éstas tienen un menor consumo energético. Al proceso básico se le denomina RMP (Refiner Mechanical Pulp). Se han desarrollado variables, entre las cuales las más extendidas son los procesos termomecánicos y químico-termomecánicos.

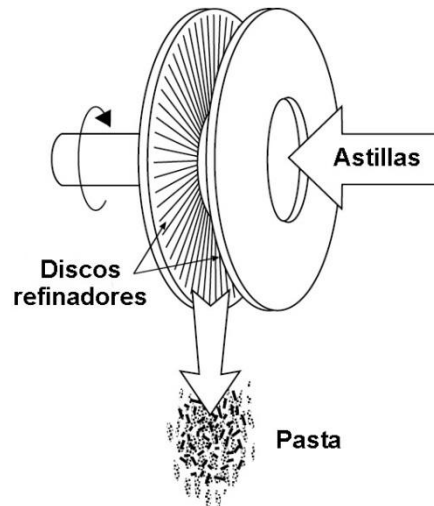


Figura 7.-Esquema de un desfibrador de discos

En los procesos termomecánicos (TMP, Thermo Mechanical Pulp), las astillas se desfibran en un desfibrador presurizado (3-5 bares) y a temperaturas en torno a los 150 °C. Se consigue una separación más eficaz de las fibras y un ahorro de energía. El tratamiento a presión y la temperatura consiguen facilitar la rotura de los enlaces de la lignina necesarios para que se produzca el desfibrado. Actualmente son los procesos mayoritarios entre las pastas puramente mecánicas.

Otra estrategia para conseguir disminuir el consumo de energía y aumentar la calidad en el desfibrado, es el empleo de pretratamientos químicos que modifiquen la naturaleza de la lignina. Se obtienen así las pastas denominadas CTMP (Chemi Thermo Mechanical Pulp). En contraposición con los procesos químicos, aquí no se pretende disolver la lignina, ya que esto disminuiría el rendimiento (una de las principales ventajas de los procesos mecánicos) sino únicamente hacerla más hidrófila, con lo que se rebaja su temperatura de transición vítrea y se hace menos resistente al desfibrado mecánico. No obstante, se produce cierta solubilización, lo que conlleva que estos procesos tengan rendimientos algo inferiores a los puramente mecánicos (en torno al 90%). El reactivo químico más empleado es el sulfito de sodio, junto con hidróxido de sodio para lograr el pH adecuado. Se han ensayado también otros procesos, como el denominado álcali-peróxido, que emplea hidróxido de sodio y peróxido de hidrógeno y que provoca simultáneamente el desfibrado y el blanqueo de la pasta. A pesar de sus ventajas, el coste del peróxido de hidrógeno limita su uso.

2.3. Procedimientos semiquímicos

Combinan un tratamiento químico suave con un tratamiento mecánico para completar la separación de las fibras. Producen pastas con rendimientos intermedios entre los procesos químicos y los mecánicos (60-80%). Suponen un porcentaje pequeño de la producción global de pastas. Las pastas son adecuadas para producir papeles para algunos usos específicos, como las capas internas del cartón ondulado. Variantes del proceso Kraft de alto rendimiento son a menudo consideradas procesos semiquímicos, ya que no puede delimitarse con precisión la separación entre ambos tipos de procesos.

3. BIODEGRADACIÓN DE LA LIGNOCELULOSA

La biodegradación de la lignocelulosa es un proceso complejo que aún no está totalmente esclarecido. Mientras que la degradación de los polisacáridos que forman la lignocelulosa (celulosa y hemicelulosas, denominadas habitualmente holocelulosa) a moléculas simples (mono y disacáridos) se conoce, la degradación de la lignina aún no se comprende totalmente ya que por la complejidad de su estructura intervienen en ella un gran número de enzimas (Leonowicz *et al.*, 2001).

La biodegradación de la celulosa y hemicelulosa puede ser llevada a cabo por un gran número de microorganismos, mientras que hay pocos capaces de degradar la lignina. Los hongos, principalmente los de podredumbre blanca (saprótrofos), son los organismos ligninolíticos por excelencia, al llevar a cabo la mayor parte de los procesos de biodegradación de la lignina en la naturaleza (Kirk y Farrell, 1987; Higuchi, 1990; Leonowicz *et al.*, 2001). Algunas bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Xhantomonas* (Buswell y Odier, 1987; Vicuña, 1988) también son capaces de oxidarla parcialmente y producir cierta degradación. No obstante, las bacterias más estudiadas en relación con la degradación de la lignina han sido los actinomicetos, y entre ellos el género *Streptomyces* (Broda *et al.*, 1989; Hernández *et al.*, 2001; Kirby, 2006). A continuación se describen las principales características de los hongos, en especial de los ligninolíticos y cómo son capaces de degradar la lignina.

3.1. Los hongos

3.1.1. El reino de los hongos

Los hongos son organismos eucariotas que presentan una gran diversidad morfológica y fisiológica. Se estima que es un reino formado por más de un millón y

medio de especies que presentan como principales características comunes (y diferenciadoras de animales o plantas) el carecer de clorofila y de tejidos conductores y llevar a cabo su nutrición mediante una digestión extracelular. La mayoría son saprófitos, desarrollándose sobre materia orgánica muerta. Un grupo relativamente amplio de ellos establece relaciones simbióticas con las plantas (líquenes y micorrizas). También hay ciertas especies que actúan como patógenos de plantas, y en menor extensión de animales y del hombre (Agrios, 1991).

Su clasificación es compleja y está en constante revisión. Se les suele dividir en dos grandes grupos: los Mixomicotas (hongos mucilaginosos) y los Eumicotas (hongos verdaderos), que pueden ser tanto filamentosos como levaduriformes, aunque actualmente se considera sólo a estos últimos como hongos (Von Arx, 1981). Los Eumicotas se caracterizan por un tejido vegetativo formado por una red de hifas filamentosas denominada micelio y por estructuras diferenciadas, los carpóforos, donde se encuentran las esporas monocariontes responsables de la reproducción sexual. Los Eumicotas se subdividen en hongos inferiores y hongos superiores. Dentro del primer grupo se encuentran los Mastigomicetos y los Zigomicetos, mientras que en el segundo grupo están los Deuteromicetos, Ascomicetos y Basidiomicetos (Talbot, 1971; Von Arx, 1981; Alexopoulos y Mims, 1985). Los Deuteromicetos son estados asexuales o imperfectos de los Ascomicetos y Basidiomicetos. Los Basidiomicetos son el grupo de hongos con mayor complejidad genética. Este grupo se caracteriza por sus estructuras reproductoras, denominadas basidios, localizadas en un tejido denominado carpóforo o cuerpo fructífero. Los basidios se asocian formando una estructura llamada himenio. En los basidios es donde tiene lugar la meiosis para formar esporas sexuales. Cada basidio suele contener cuatro de estas esporas sexuales llamadas basidiosporas (figura 8).

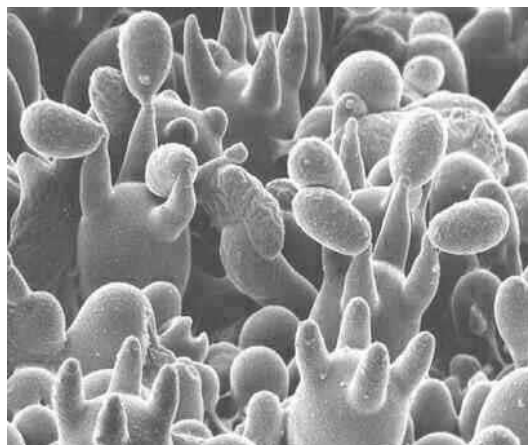


Figura 8.-Basidios con basidiosporas.

Los hongos son microorganismos caracterizados por realizar una degradación externa de los nutrientes, secretando enzimas al medio extracelular, las cuales transforman el sustrato en moléculas fácilmente asimilables. Suelen crecer a temperaturas óptimas cercanas a los 25 °C, aunque hay hongos termófilos que crecen a más de 50 °C, y muchos de ellos pueden desarrollar estructuras de resistencia frente a las bajas temperaturas. Su crecimiento óptimo tiene lugar, en general, a pH ácido (4-5), en contraposición a las bacterias que suelen tener un desarrollo óptimo a pH ligeramente alcalino (Moore-Landecker, 1996).

Los hongos, con excepción de los grupos que conforman las levaduras, son organismos pluricelulares y su unidad fundamental de crecimiento es la hifa. Ésta es una estructura tubular microscópica en la que se encuentran todos los componentes citoplasmáticos propios de los eucariotas, rodeados de una pared celular rígida. La hifa presenta un crecimiento individual en su parte apical, ramificándose regularmente y fusionándose con otras hifas, formando una estructura en forma de red denominada micelio, que puede organizarse para originar estructuras reproductivas compactas a lo largo de su ciclo de vida (Moore y McAlear, 1962).

Los hongos pueden reproducirse de modo sexual y asexual. La reproducción asexual es una forma rápida de propagación de la especie. Puede aparecer por fragmentación del micelio, gemación de células somáticas o formación de esporas asexuales, siendo esta última la forma más extendida. La reproducción sexual se produce por unión y segregación de núcleos compatibles, incrementando el polimorfismo de las especies (Alexopoulos y Mims, 1985).

3.1.2. Hongos que degradan la lignocelulosa

Los hongos que crecen sobre la madera y otros materiales lignocelulósicos, causando su degradación, se suelen agrupar en tres categorías según el ataque que hacen sobre el sustrato.

-Hongos de podredumbre blanda: El término podredumbre blanda fue introducido por Savory (1954). Este proceso describe el deterioro sufrido por la madera o plantas herbáceas por acción fúngica, en condiciones de alta humedad (Käärik, 1974). Se produce mayoritariamente en maderas de frondosas (Martínez *et al.*, 2005). Los principales causantes son hongos clasificados dentro de los ascomicetos y

deuteromicetos, con actividad quitinasa, como por ejemplo algunos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* (Betts y King, 1991) y *Fusarium* (Carnicero *et al.*, 1992).

Se reconocen dos tipos de podredumbre blanda. El tipo 1 consiste en la formación de cavidades cilíndricas o bicónicas generadas en las paredes secundarias de las fibras por la acción del hongo, mientras que el tipo 2 se refiere a una forma de erosión debida a la degradación completa de la pared secundaria de las células vegetales (Corbett, 1965).

-Hongos de podredumbre parda: Estos hongos se caracterizan por alterar la relación entre la lignina y los polisacáridos de manera que, sin degradar la lignina, producen la hidrólisis de los polisacáridos (Kirk y Farrell, 1987). Esta alteración la causan principalmente basidiomicetos de los géneros *Lentinus* y *Phellinus* entre otros. Descomponen fundamentalmente la celulosa y la hemicelulosa de las maderas (en mayor extensión de coníferas), observándose solamente una limitada disminución en el contenido de lignina, o transformaciones a nivel de las demetoxilaciones de los anillos fenólicos. La acumulación de lignina da lugar a un producto de color pardo, al que debe su nombre.

-Hongos de podredumbre blanca: Estos hongos incluyen varios cientos de especies de basidiomicetos (aproximadamente un 30% de este grupo) y unos pocos ascomicetos (Buswell y Odier, 1987; Kirk, 1987; Hatakka, 1994). La denominación de estos hongos como de podredumbre blanca se debe a que, al degradar preferentemente la lignina de las plantas leñosas (tanto coníferas como frondosas), provocan la formación de un residuo de color blanco debido a la acumulación de celulosa y hemicelulosas (González *et al.*, 1986) (figura 9). En los hongos de podredumbre blanca, la degradación de la lignina ocurre a través de oxidaciones que conducen a su progresiva despolimerización, liberando compuestos de bajo peso molecular, que en algunos casos son metabolizados hasta producir CO₂ y agua (Reid y Seifert, 1982; Chen y Chang, 1985; Higuchi, 1985; Kirk y Farrell, 1987).

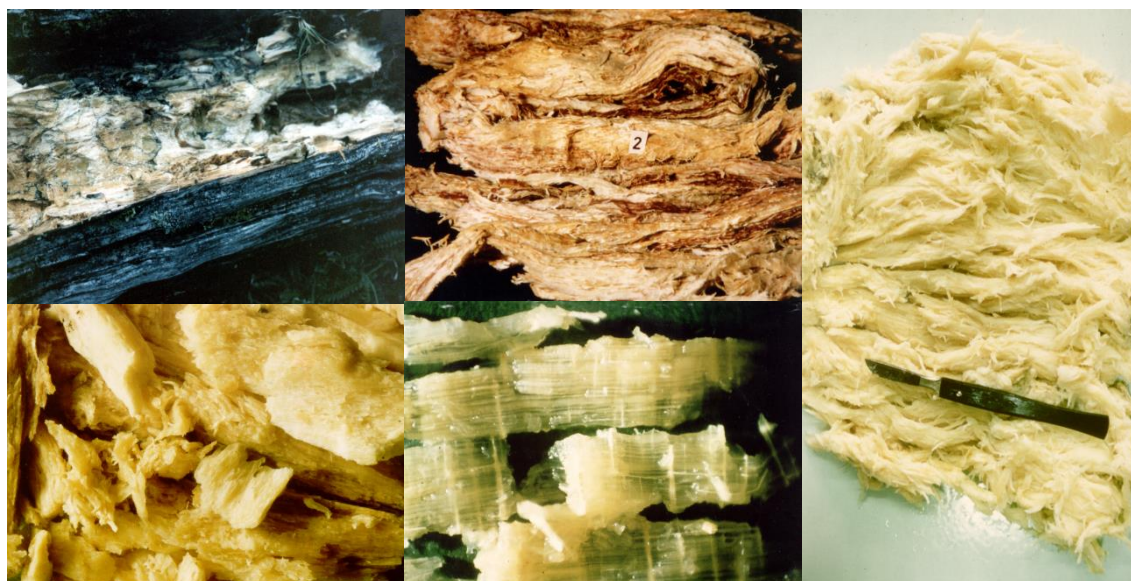


Figura 9.-Madera en diferentes estadios de pudrición blanca originada por diferentes hongos basidiomicetos.

Entre los hongos que producen este tipo de podredumbre hay que distinguir a su vez dos grupos, los que degradan simultáneamente la lignina y la celulosa, y los que preferentemente degradan la lignina (Kirk, 1971). Entre los primeros se encuentra *Phanerochaete chrysosporium* y, entre los segundos, algunos hongos de los géneros *Pleurotus* y *Ganoderma* (Zadrazil *et al.*, 1982; González *et al.*, 1986; Zadrazil, 1987; Ríos y Eyzaguirre, 1992). Es este segundo grupo el que presenta unas características más interesantes respecto a sus posibles aplicaciones biotecnológicas, ya que algunas de éstas requieren una deslignificación que no afecte de modo significativo a la celulosa, como por ejemplo en la obtención de fibras para la fabricación de papel y tejidos y la mejora de forraje para animales.

3.2. Bioquímica de la degradación de la lignocelulosa

La degradación de la lignocelulosa presenta dos partes muy diferenciadas, la degradación de los polisacáridos y la de la lignina, aunque están relacionadas y la presencia de uno de los polímeros interfiere en la degradación del otro. Las vías de degradación de los polisacáridos son bastante bien conocidas desde hace tiempo y se llevan a cabo por enzimas hidrolasas. La degradación de la lignina no está aún del todo esclarecida, tanto por la heterogeneidad de su estructura como por la dificultad de

aislarla en estado nativo, lo que hace que la capacidad para ser atacada por diversas enzimas sea de difícil estudio. Se conoce que se lleva a cabo por enzimas oxidasas de baja especificidad de sustrato y que también participan sustancias de bajo peso molecular (Leonowicz *et al.*, 1999). La generación de radicales que podrían participar en su degradación se discute por Leonowicz *et al.* (2001).

La celulosa es degradada por enzimas conocidas como celulasas, a las que tradicionalmente se divide en endoglucanasas (endo- β -1,4-glucanasas), que degradan enlaces internos, y exoglucanasas (exo- β -1,4-glucanasas) que degradan enlaces terminales liberando moléculas de celobiosa (dímeros de glucosa). A su vez estas enzimas se dividen en dos grupos según ataquen a la celulosa por su extremo reductor o no reductor. La degradación se completa con β -glucosidasas que degradan la celobiosa a glucosa. Las endoglucanasas tienen dificultades para degradar celulosa cristalina, siendo ésta sólo degradada eficazmente en presencia de celobiohidrolasas (Leonowicz *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2002).

La producción de celulasas por los microorganismos alcanza su mayor nivel en presencia de celulosa. En algunos microorganismos, sustratos como celobiosa, lactosa y soforosa también elevan la producción de todo o de parte del sistema de enzimas celulolíticas (Bhat y Bhat, 1997). Los microorganismos termófilos, por su capacidad de producir celulasas termoestables, han sido objeto de interés en los últimos años. Esta capacidad supone que las celulasas mantienen alta actividad a temperaturas cercanas a 90°C y, a menudo, también a pH alcalino (ambas condiciones se dan en la fabricación de pasta). *Clostridium thermocellum*, *Thermomonospora fusca*, *Thermoascus aurantiacus*, *Sporotrichum thermophile*, *Humicola insolens* o *Chaetomium thermophile* son ejemplos de hongos termófilos con actividad celulolítica. Una ventaja añadida es que al trabajar a altas temperaturas, se reducen las posibilidades de competencia con otros microorganismos no aptos para esas condiciones. Ante un posible uso industrial, esta característica supone importantes ventajas en el coste de esterilización de los sustratos.

En la degradación de las hemicelulosas intervienen un mayor número de enzimas, debido a la mayor diversidad, tanto de enlaces como de monómeros, pero el proceso es análogo. Las estructuras de tipo xilano son degradadas por xilanasas, diferenciándose entre endoxilanasas (endo-1,4- β -xilanasas) que atacan enlaces internos y xilosidasas (1,4- β -xilosidasas) que atacan oligómeros liberando xilosa. En la degradación de los

mananos se han descrito diversas mananasas, diferenciándose también entre exo y endo mananasas. Además, se necesitan esterasas que liberen los ácidos urónicos que forman parte de la estructura (Pérez *et al.*, 2002).

La degradación de la lignina se lleva a cabo por un grupo de enzimas oxidativas de tipo oxidasa (lacasa) y peroxidasa (lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa principalmente) aunque se han descrito otras peroxidases que no encajan en estos grupos. Con posterioridad se ha descrito una nueva peroxidasa denominada peroxidasa versátil o híbrida que aúna características de lignina peroxidasa y de manganeso peroxidasa (Mester y Field, 1998). Todas estas enzimas se caracterizan por su baja especificidad de sustrato y por tener generalmente una actuación extracelular. Junto a las enzimas que atacan directamente la lignina hay que considerar también otros grupos de enzimas cooperantes. Esta degradación no específica se ha denominado “combustión enzimática” (Kirk y Farrell, 1987) y se describe más detalladamente a continuación.

3.3. Degradación de la lignina. Enzimas ligninolíticas

En la biodegradación de la lignina no se produce una ruptura ordenada de las subunidades periféricas, sino que esta ruptura coexiste con la oxidación de anillos aromáticos y de cadenas laterales en el interior del polímero, disminuyendo la hidrofobicidad, al mismo tiempo que se liberan fragmentos de distinto tamaño molecular. La naturaleza desordenada de esta degradación concuerda con el concepto de combustión enzimática (Reid, 1995).

El sistema enzimático para degradar la lignina parece estar formado por un conjunto variable de enzimas según el microorganismo ligninolítico que se considere. Tradicionalmente se han agrupado en tres categorías: productores de lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), productores de MnP y lacasa, y productores de LiP y lacasa (Hatakka, 1994). Esta clasificación está siendo discutida, en parte por la existencia de microorganismos que parecen no encajar en ninguno de los grupos, como *Pycnoporus cinnabarinus*, al que se considera un eficiente degradador de lignina produciendo lacasa sin producir LiP ni MnP (Eggert *et al.*, 1996a).

El proceso de biodegradación de la lignina se ha estudiado durante más de 90 años, con sólo pequeños progresos durante gran parte de este tiempo. Un paso importante en relación a la biodegradación de este polímero por hongos de podredumbre blanca se dio a comienzos de 1980, cuando Hall *et al.* (1980) propusieron que el

proceso ocurría debido a la producción extracelular de sustancias reactivas de oxígeno y no necesariamente por un ataque enzimático directo a la lignina. Posteriormente, los trabajos de Forney y colaboradores (1982), y Kutsuki y Gold (1982) mostraron que la actividad ligninolítica estaba relacionada con la producción de peróxido de hidrógeno por el hongo. En el año 1983, se descubre en *Phanerochaete chrysosporium* una enzima ligninasa dependiente de H₂O₂ (Glenn *et al.*, 1983; Tien y Kirk, 1983), denominada lignina peroxidasa (LiP). En 1984 se demostró que parte de la actividad peroxidasa extracelular detectada en los cultivos de *Phanerochaete chrysosporium* era dependiente de Mn²⁺. Este hallazgo condujo al descubrimiento de las enzimas manganeso peroxidadas (MnP) (Kuwahara *et al.*, 1984).

El tercer grupo dentro de las llamadas enzimas ligninolíticas corresponde a las lacasas. Estas enzimas fueron descritas por primera vez en el látex del árbol japonés *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1893). Posteriormente, las lacasas fueron descritas en varios hongos (Bertrand, 1896; Laborde, 1896), dentro de los cuales se encuentran ampliamente extendidas. Desde 1965, cuando aún no habían sido descubiertas las LiP y las MnP, se sugirió la participación de las lacasas en los procesos ligninolíticos (Rösch, 1965), pues este tipo de enzimas estaba presente en la mayor parte de los hongos de podredumbre blanca estudiados, mientras que en los de podredumbre parda no eran detectadas. Si bien la descripción de las lacasas es muy anterior a la de las peroxidadas, su estudio en relación a la biodegradación de la lignina fue durante décadas relegado a un segundo plano, principalmente porque el organismo tomado como modelo de la degradación de la lignina, *Phanerochaete chrysosporium*, puede degradar eficientemente este polímero en condiciones en las que no se detectan lacasas, y porque se pensaba que los sustratos sobre los cuales actuaban las lacasas se restringían a compuestos de tipo fenólico. En los últimos años, la importancia de la lacasa en la degradación de la lignina ha despertado más interés, ya que se han identificado varios hongos de podredumbre blanca, entre ellos *Trametes versicolor*, que pueden degradar la lignina sin la participación de LiP (Rüttimann-Johnson *et al.*, 1993; Srebotnik *et al.*, 1994; Eggert *et al.*, 1996a). También se han estudiado mutantes lacasa negativos de *Pycnoporus cinnabarinus*, en los que se ha verificado una notable disminución de la capacidad de degradación de la lignina (Eggert *et al.*, 1997a). En relación a los posibles sustratos de la lacasa, se ha demostrado que las lacasas, en presencia de mediadores

rédox apropiados, pueden oxidar compuestos no fenólicos (Collins *et al.*, 1996; Bourbonnais y Paice, 1996; Johannes y Majchercyk, 2000).

Junto a las enzimas ligninolíticas (LiP, MnP y lacasa) se establecen dos grupos de enzimas cooperantes en la degradación de la lignocelulosa. Por un lado, las que sin atacar directamente la lignina producen peróxido de hidrógeno, esencial para la acción de las peroxidasas, y por otro, las enzimas denominadas de retroalimentación o “feed-back”, encargadas de estabilizar los productos de oxidación formados por el ataque directo de las enzimas sobre los compuestos de alto peso molecular. Entre las primeras se encuentran la aril alcohol oxidasa (también denominada veratril alcohol oxidasa) y la glioxal oxidasa. Entre las segundas, la glucosa oxidasa y la celobiosa deshidrogenasa.

Ademas, estas enzimas se presentan habitualmente como familias de enzimas, codificadas por genes con una regulación de su expresión compleja que es objeto de estudio (Santoyo *et al.*, 2008)

Junto con las enzimas, también juegan un papel importante sustancias de bajo peso molecular denominadas mediadores. Se ha postulado que debido a su tamaño las enzimas ligninolíticas no tienen un buen acceso a muchas de las zonas de la madera (Evans *et al.*, 1994). Las enzimas oxidarían sustancias de bajo peso molecular, con capacidad de difundirse a zonas de difícil acceso para las enzimas y que se reducirían oxidando a su vez la lignina. Se han descrito varias de estas sustancias que serían productos del metabolismo fúngico como el alcohol veratrílico para la lignina peroxidasa (Lundquist y Kirk, 1978), los iones Mn^{2+} para las manganeso peroxidasa (Schick Zapanta y Tien, 1997), o el ácido 3-hidroxiantranílico para las lacasas (Eggert *et al.*, 1996b). También se han encontrado moléculas no producidas por el hongo como el ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin sulfónico) y el HBT (1-hidroxibenzotriazol) entre otros, que son eficaces mediadores para la lacasa, y que han llevado a denominar el sistema lacasa mediador (LMS) como una eficaz herramienta biotecnológica en diversas aplicaciones como el bioblanqueo, la degradación de colorantes textiles o de efluentes con elevado contenido en moléculas con carácter fenólico (Call y Mücke, 1997).

A continuación se describen, con mayor detalle, las características de las enzimas ligninolíticas.

3.3.1. *Lignina peroxidasa*

La actividad lignina peroxidasa (E.C. 1.11.1.14) se describió por primera vez en el basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* (Glenn *et al.*, 1983; Tien y Kirk, 1983).

La LiP es una glicoproteína monomérica que contiene un grupo hemo (hierro-protoporfirina IX) como grupo prostético, tiene un peso molecular entre 38 y 46 KDa y un pI que varía entre 3,2 y 4,7 (Kirk *et al.*, 1986; Wong, 2009). Se ha detectado actividad LiP en numerosos hongos de podredumbre blanca, entre otros en *P. chrysosporium* (Alic y Gold, 1991; Reddy, 1993; Cullen, 1997), *Bjerkandera adusta* (Kimura *et al.*, 1991) y *Trametes versicolor* (Jönsson y Nyman, 1992).

Su actividad depende de la presencia de H₂O₂, y cataliza la oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y otros compuestos que son resistentes al ataque microbiano, habiéndose demostrado su capacidad para oxidar una amplia variedad de compuestos modelo de lignina (Glenn *et al.*, 1983).

En *P. chrysosporium* se han caracterizado 12 isoenzimas, codificadas por genes diferentes, por lo que se ha propuesto que cada isoenzima puede tener una función diferente (Alic y Gold, 1991; Reddy, 1993; Cullen, 1997) y que su regulación es distinta, dependiendo de las condiciones de cultivo (Stewart *et al.*, 1992, Broda *et al.*, 1996).

3.3.2. *Manganeso peroxidasa*

Al igual que la LiP la Manganeso peroxidasa (E.C. 1.11.1.13) también fue descrita por primera vez en *P. chrysosporium* (Kuwahara *et al.*, 1984). Se trata de una glicoproteína que contiene un grupo hemo (hierro-protoporfirina IX) como grupo prostético, con un peso molecular entre 43 y 62 KDa y un pI entre 3 y 4 (Janusz *et al.*, 2013). En principio se consideró que la MnP representaba un papel secundario en la degradación de la lignina dada su incapacidad para degradar dímeros no fenólicos. Sin embargo, actualmente se acepta que desempeña un papel importante en dicha degradación, ya que cataliza la oxidación de Mn²⁺ a Mn³⁺, y el Mn³⁺ generado es un agente capaz de oxidar compuestos fenólicos y no fenólicos modelo (Hammel *et al.*, 1989; Popp y Kirk, 1991). Además, por su pequeño tamaño, este ion podría actuar en zonas internas de la lignina, inaccesibles a un ataque enzimático directo.

En *P. chrysosporium* se han detectado varias MnP, codificadas por distintos genes que presentan, al igual que los que codifican LiP, una regulación diferencial, dependiendo de las condiciones y del medio de cultivo (Périé y Gold, 1991; Pease y Tien, 1992; Gettemy *et al.*, 1998). Esta actividad se ha descrito, además, en otros hongos de podredumbre blanca, como *Trametes versicolor* (Johansson y Nyman, 1987) y *Lentinula edodes* (Bonnarme y Jeffries, 1990).

3.3.3. Peroxidasa versátil

También denominada peroxidasa independiente de Mn, ha sido descrita por primera vez por Mester y Field (1998) en una especie sin identificar del género *Bjerkandera*, aunque algunas MnP atípicas descritas con anterioridad se han enmarcado también en este grupo. Actualmente se ha descrito en varias especies de *Pleurotus* como *P. ostreatus* y *P. eryngii* (Martinez *et al.*, 2005). Entre sus propiedades destacan la posibilidad de oxidar Mn^{2+} a Mn^{3+} , al igual que la MnP, así como la de oxidar sustratos típicos de la LiP como el alcohol veratrílico.

3.3.4. Lacasa

Las lacasas (*p*-difenol oxígeno reductasa, E.C. 1.10.3.2) son enzimas de tipo fenoloxidasa, que contienen generalmente 4 átomos de cobre en su estructura, aunque recientemente se han descrito lacasas con 2 átomos de zinc, 1 de cobre y 1 de hierro, por ejemplo en *Pleurotus ostreatus* (Palmieri *et al.*, 1997). Las lacasas son glicoproteínas con un peso molecular entre 50 y 110 KDa y un contenido en hidratos de carbono que oscila entre el 15 y el 45%. (Wong, 2009) Se han caracterizado tanto formas constitutivas como inducibles (Leonowicz y Trojanowski, 1975; Bollag y Leonowicz, 1984).

La lacasa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza entre animales, plantas y microorganismos (Mason, 1955). En general, se considera que son proteínas monoméricas, constituidas por una cadena polipeptídica de unos 500 aminoácidos (Reinhammar, 1984; Thurston, 1994) aunque para algunos hongos como *Trametes villosa* o *Phellinus ribis* se han descrito homodímeros (Giardina *et al.*, 2010). Las lacasas se incluyen dentro del grupo de las “oxidadas azules”, denominadas así por el color azul intenso que les confiere la presencia de cobre. Este grupo de oxidadas incluye, además de la lacasa, la ascorbato oxidasa presente en plantas, y la proteína

plasmática de mamíferos ceruloplasmina (Reinhammar y Malmström, 1981). Dentro de este grupo se las localiza en el subgrupo de proteínas caracterizado por tener tres dominios estructurales (Nakamura y Go, 2005).

Los 4 átomos de cobre de la lacasa poseen diferentes propiedades espectrofotométricas y paramétricas (Reinhammar y Malmström, 1981). Estos heteroátomos desempeñan un papel importante dentro del mecanismo catalítico de las lacasa (Malström, 1982). La estructura terciaria de la lacasa no se determinó hasta 1998, cuando se cristalizó una de las isoformas de *Coprinus cinereus* (Ducros *et al.*, 1998). Esta estructura carecía de alguno de los átomos de cobre, por lo que no se pudieron confirmar las hipótesis sobre el mecanismo catalítico. Más adelante se han cristalizado lacasas totalmente funcionales y se han hecho estudios sobre su mecanismo catalítico como por ejemplo con las lacasas producidas por los hongos *Trametes versicolor* (Piontek *et al.*, 2002), *Rigidoporus lignosus* (Garavaglia *et al.*, 2004), *Cerrena maxima* (Lyashenko *et al.*, 2006) o *Lentinus tigrinus* (Ferraroni *et al.*, 2007). También se ha cristalizado una lacasa bacteriana de *Bacillus subtilis* (Enguita *et al.*, 2003). Las lacasas convencionales presentan tres dominios en los que la estructura secundaria predominante es el barril- β , con pequeños fragmentos de α -hélice, aunque también se han descrito lacasas, por ejemplo en *Botrytis cinerea* que presentan sólo dos dominios (Giardina *et al.*, 2010).

Gracias a los estudios cristalográficos se han realizado avances sobre los intermedios de reacción (Mot y Silaghi-Dumitrescu, 2012), aunque el esquema propuesto por Malström (1982) sobre el ciclo catalítico de las lacasas se sigue considerando válido (figura 10). Una de las características más destacadas del mecanismo catalítico de las lacasas (en general de las oxidasas azules) es que, de las más de doscientas enzimas (oxigenasas y oxidasas) que usan oxígeno molecular como sustrato, sólo seis son capaces de reducir el O_2 a dos moléculas de H_2O . La lacasa es una de estas enzimas, junto con la citocromo-c oxidasa, la ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina, entre otras (Call y Mücke, 1997). Para llevar a cabo la reducción del O_2 necesita 4 electrones, tomados secuencialmente de la oxidación de cuatro moléculas de sustrato, siendo los aceptores los distintos átomos de cobre de la enzima. Su localización confiere a estos átomos diferentes características, por lo que se produce un complejo intercambio de electrones entre los distintos tipos de cobre (llamados 1, 2 y 3).

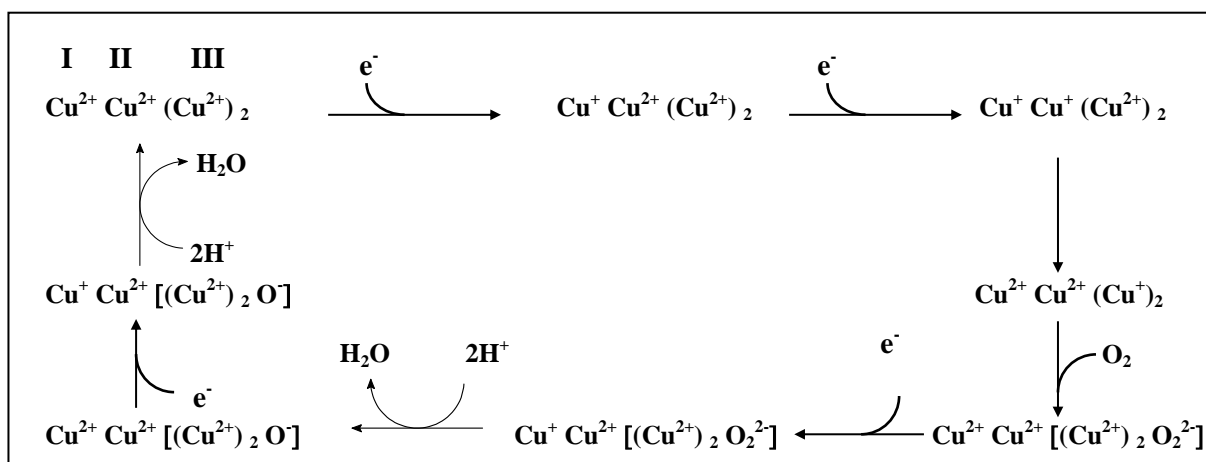


Figura 10.-Mecanismo catalítico de la lacasa propuesto por Malström (1982). Los tres tipos de cobre se indican sobre la parte inicial del esquema con números romanos.

La lacasa posee capacidad para oxidar un gran número de compuestos por su baja especificidad de sustrato. Baldrian (2006) recoge más de 80 sustratos para las diferentes lacasas fúngicas estudiadas. Entre ellos destacan monofenoles, difenoles, polifenoles, aminofenoles, poliaminas y dímeros de lignina fenólicos (Reinhammar, 1984; Kawai *et al.*, 1987; Kawai *et al.*, 1988; Hatakka *et al.*, 1991; Eggert *et al.*, 1996b). Se ha determinado que, *in vitro*, las lacasas son capaces de catalizar reacciones de polimerización-despolimerización (metilaciones y/o desmetilaciones) (Leonowicz *et al.*, 1979).

La oxidación de sustratos fenólicos por las lacasas corresponde a reacciones de un electrón, que generan radicales libres (Reinhammar y Malmström, 1981). El producto inicial de esta reacción es, generalmente, muy inestable, pudiendo ser objeto de una segunda reacción de oxidación por otra enzima, convirtiendo el fenol inicial en quinona. También pueden producirse reacciones no enzimáticas espontáneas, como hidratación o reacciones de polimerización, generando productos amorfos insolubles. Esta baja especificidad de sustrato hace que la lacasa sea una enzima con un elevado potencial biotecnológico por la gran cantidad de procesos a los que se podría aplicar: industrias de pasta y papel, alimentaria, textil, obtención de derivados de la industria azucarera, desarrollo de biosensores, biorremediación de suelos, etc (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006).

Respecto a su papel en la naturaleza, las lacasas cumplen diferentes funciones biológicas. Así, parece ser que las lacasas de plantas intervienen en la polimerización de polifenoles cuando se producen lesiones en las plantas, cumpliendo funciones protectoras y de reparación de tejidos, de modo análogo al sistema de coagulación de animales superiores (Reinhammar, 1984). También se piensa que podrían estar involucradas en la síntesis de lignina en las plantas. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que la lacasa purificada oxida monolignoles que polimerizan en condiciones *in vitro* (Sterjiades *et al.*, 1992), aunque el papel que juega no está del todo esclarecido (Mayer y Staples, 2002). Para las lacasas fúngicas también se ha descrito un amplio espectro de funciones, como su intervención en la virulencia de hongos fitopatógenos (Geiger *et al.*, 1986). La lacasa también parece estar implicada en la formación de cuerpos fructíferos y de rizomas (Thurston, 1994).

Existen numerosos trabajos en los que se describe cómo la lacasa toma parte en muchas de las reacciones requeridas para la ligninolisis (Ander y Eriksson, 1976; Lundquist y Kristersson, 1985; Kersten *et al.*, 1990; Bourbonnais y Paice, 1990, 1992). Algunos autores han diferenciado las “lacasas ligninolíticas”, con el objeto de separar dentro de la familia de las lacasas, provenientes de un mismo microorganismo, las que realmente están implicadas en los procesos de degradación de la lignina, de las que cumplen otras funciones, como algunas de las anteriormente mencionadas. Así, en *Coriolus versicolor* se pueden detectar tres formas cromatográficas distintas: lacasas I, II y III. La lacasa III, denominada lacasa ligninolítica, con propiedades bioquímicas y antigénicas diferentes a las otras dos, es capaz de degradar una preparación de lignina soluble en agua, mientras que las otras dos lacasas la polimerizan (Morohoshi *et al.*, 1987). Esta polimerización puede desempeñar un papel protector, ya que fragmentos procedentes de la degradación de la lignina (por la lacasa o por otras enzimas como las peroxidasas) pueden resultar tóxicos para el hongo, y al polimerizarlos mediante la lacasa se impide que entren al interior de las hifas (Thurston, 1994).

La regulación de esta enzima es compleja. Se ha descrito que se ve afectada por los niveles de cobre del medio de cultivo en hongos como *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* (Collins y Dobson, 1997; Palmieri *et al.*, 2000), así como por los de nitrógeno (Collins y Dobson, 1997). También se han descrito metabolitos fúngicos, como el alcohol veratrílico, como inductores de la lacasa (Barbosa *et al.*, 1996). Por otra parte, es frecuente observar que la producción de lacasa aumenta en diversos hongos

cuando éstos se cultivan en presencia de distintos efluentes industriales ricos en moléculas derivadas de la lignina o con estructura similar. *Coriolopsis gallica* aumenta su actividad lacasa en presencia de efluentes procedentes de la industria papelera (Calvo *et al.*, 1998) o de industria cervecera (Yagüe *et al.*, 2000); *Trametes* sp. I-62 incrementa los niveles de lacasa en presencia de efluentes de la industria de destilación de alcohol a partir de mieles de caña (González *et al.*, 2000). El efluente papelerero ha sido extensamente caracterizado y contiene básicamente derivados de la lignina (Terrón, *et al.*, 1993) por otra parte, el efluente cervecero es rico en taninos (Yagüe *et al.*, 2000) y el efluente procedente de la industria licorera contiene principalmente melanoidinas (González *et al.*, 2000), pero aún permanece incierto cuáles de estas sustancias son las responsables de los aumentos de actividad lacasa y a qué nivel ejercen esta acción. Hay algunos indicios que parecen relacionar los niveles de actividad lacasa con la presencia de sustancias en el medio como el ácido ferúlico (Leonowicz y Trojanowski, 1975), flavonoides (Pickard y Westlake, 1970), ácido tánico (Carbajo *et al.*, 2002) o derivados de la lignina (Arora y Sandhu, 1984), aunque el efecto parece no ser el mismo en todos los hongos, y se encuentran grandes diferencias entre moléculas estructuralmente cercanas, por la inducción diferencial de distintos genes responsables de la actividad lacasa (González *et al.*, 2003; Terrón *et al.*, 2004a).

Algunas de estas sustancias (ácido tánico, flavonoides) se encuentran entre los extractos de la madera y se les ha asignado un papel protector en las plantas frente al ataque de microorganismos (Scalbert, 1991), por lo que el que activen la producción de lacasa podría entenderse como un mecanismo de respuesta por parte de dichos microorganismos.

4. LA BIOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA DE CELULOSA Y PAPEL

4.1. Biopasteado

Se ha denominado biopasteado o biopulpeo a aquellos procesos de obtención de pasta de celulosa que incluyen al menos una etapa en la que las astillas son tratadas con algún microorganismo ligninolítico o con sus enzimas, para que sean estos agentes biológicos los que produzcan parte de la deslignificación (Villar *et al.*, 2005). Estos microorganismos son los que producen la degradación de la lignocelulosa en la naturaleza, donde ésta se lleva a cabo con diferente grado de selectividad. Uno de los casos de mayor selectividad, conocido desde finales del siglo XIX, se da en ciertas

zonas de la pluvisilva templada andina del sur de Chile (pluvisilva valdiviana), donde se produce un fenómeno de deslignificación de la madera muy extendido (Phillipi, 1893). La madera degradada por este proceso ya era conocida por los aborígenes mapuches, que la denominaban “huempe” y los colonos alemanes lo utilizaron para la alimentación animal desde mediados del siglo XIX. No se conoce bien el porqué de la selectividad de este caso. Se atribuye tanto a factores climatológicos, como a la presencia de ciertas especies endémicas de hongos de podredumbre blanca (como *Ganoderma applanatum*), o a la de especies forestales endémicas con relaciones carbono/nitrógeno altas (Zadrazil *et al.*, 1982; González *et al.*, 2005). No obstante, en el “huempe” o palo podrido, según la denominación que dieron al residuo los colonizadores españoles y alemanes de Chile (Philippi, 1893), la celulosa se encuentra parcialmente degradada y el residuo no es útil para su empleo como materia prima papelerera ya que en la naturaleza, tras el ataque ligninolítico, intervienen rápidamente especies celulolíticas y hemicelulolíticas. La principal conclusión a extraer de este proceso natural es la posibilidad de que los hongos de pudrición blanca degraden la lignina, pero se habrá de procurar que el ataque se produzca de forma selectiva para no dañar la estructura de la celulosa y permitir su uso papelerero.

Se pretende, mediante la incorporación de esta etapa, producir una debilitación de la unión entre fibras y disminuir así los aspectos negativos de los procesos convencionales. En el caso de los procesos mecánicos, disminuir el consumo de energía empleada en la separación de las fibras y aumentar la calidad de dicha separación. En el caso de los procesos químicos, si bien en el proceso Kraft (proceso más extendido), los reactivos se recuperan y puede parecer que carece de interés un pretratamiento que reduzca su uso, el biopasteado puede contribuir a favorecer la difusión de los reactivos químicos en el interior de las astillas. Se mejoraría así la eficacia de la cocción, reduciendo su duración, lo que conllevaría un aumento en producción que justificaría el pretratamiento (Villar, 2008).

Los primeros trabajos estuvieron más orientados a la producción de pasta mecánica y se desarrollaron en los laboratorios del FPL (Forest Products Laboratory, Madison) y del STFI (Swedish Forest Products Research Laboratory, Estocolmo). El primer trabajo científico de difusión internacional en el que analizan ensayos de biopulpeo pertenece a éste último grupo (Eriksson y Vallander, 1980), publican sus experiencias empleando mutantes carentes de celulasa de *Sporotricum pulverulentum*

(estado imperfecto de *P. chrysosporium*) para tratar de limitar el ataque a la lignina, aunque no se obtuvieron los resultados esperados (Eriksson, 1985). Respecto a las pastas químicas, los primeros esfuerzos en emplear los hongos de podredumbre blanca se dedicaron al bioblanqueo (Kirk y Chang, 1981). A continuación se describen los principales logros descritos en biopasteado químico y mecánico.

4.1.1. Biopasteado químico

Según se acaba de describir, en el biopasteado químico no se pretende realizar una deslignificación extensiva por medios biológicos, ya que ésta provoca grandes daños a la celulosa, tal y como se ha puesto de manifiesto por el grupo de Blanchette (Blanchette *et al.*, 1992), que ha tratado maderas de frondosas (*Betula papyrifera*, *Populus tremuloides*) y de coníferas (*Pinus taeda*) con *Ceriporiopsis subvermispora* y *Phanerochaete chrysosporium*. Sólo en casos muy específicos (maderas de frondosas y cepas de *C. subvermispora*) fue posible degradar la mayor parte de la lignina (50-80%) sin causar excesiva degradación en la celulosa. No obstante, incluso en los casos más favorables, el tiempo de incubación fue largo (12 semanas). Además de la ya mencionada mejora en la transferencia de materia, el pretratamiento biológico también pretende degradar los componentes minoritarios de la madera. Esto repercute de dos formas: se eliminan problemas de “pitch”, (manchas que aparecen en la pasta kraft debido a la formación de impurezas derivadas de ellos), y se mejora la deslignificación, pues dichos componentes minoritarios también reaccionan con los reactivos químicos deslignificantes. Ambos efectos, la mejor difusión de los reactivos y su uso más eficaz sobre la lignina, parecen ser los responsables de la mejora en la cocción que se produce en las astillas biotratadas, ya que en muchos casos, la pérdida de rendimiento y/o de lignina no parece lo suficientemente importante como para explicar la mayor rapidez en la cocción. Cuando se emplea *Ophiostoma piliferum*, un hongo con capacidad para eliminar “pitch” pero que carece de actividad ligninolítica, se observan resultados similares a los que producen los hongos ligninolíticos: reducción del número kappa (indicativo de la lignina residual) de la pasta obtenida posteriormente con el proceso kraft (29%) y, para igual número kappa, mejora de la viscosidad con respecto a la pasta de astillas sin tratamiento (Wall *et al.*, 1995). Esto prueba que la mejora en la cocción que provocan los hongos puede lograrse no sólo eliminando lignina, sino favoreciendo el ataque posterior de los reactivos químicos de la cocción.

Por otra parte, Mendoga *et al.* (2001) trataron astillas de *Pinus taeda* con *Ceriporiopsis subvermispora*. Tras quince días de pretratamiento, el tiempo de cocción se redujo en un 29%, manteniéndose las propiedades de las pastas. Atribuyeron aproximadamente la mitad de esta reducción a la eliminación de los extractos por la acción del hongo, ya que astillas previamente extraídas necesitaron un 12% menos de tiempo de cocción. Cuando el tratamiento se hace mas extensivo, se consiguen importantes reducciones en el número kappa pero a costa de importantes pérdidas de rendimiento (Wolfaardt *et al.*, 2004).

Por otra parte, en la aplicación a especies frondosas, Bajpai *et al.* (2001) estudiaron el efecto de varios hongos ligninolíticos (*C. subvermispora*, *P. chrysosporium*, *Phlebia tremellosa*, *Phlebia subserialis* e *Hyphodontia setulosa*) sobre la cocción kraft de madera de eucalipto. Tras dos semanas de tratamiento, el contenido en lignina de las astillas se redujo considerablemente (27-28%), puesto de manifiesto en un menor tiempo de cocción (33% menos). Obtuvieron pastas más blancas y resistentes y más fáciles de blanquear y de refinar.

El pretratamiento con hongos ligninolíticos también se ha propuesto para la mejora del proceso al sulfito, obteniéndose reducciones drásticas del índice kappa que alcanzaron el 27% y el 48% en las pastas obtenidas mediante los procesos al sulfito sódico y al sulfito cálcico, respectivamente, cuando se trata madera de *Pinus taeda* con *C. subvermispora* durante dos semanas. Además, el descenso del índice kappa apenas tiene reflejo en el rendimiento, que se mantiene ligeramente por debajo del correspondiente a la pasta control (Scott *et al.*, 1995). Con madera de frondosas (*Eucalyptus grandis*) también se han obtenido importantes reducciones del índice kappa (29%) con pequeñas pérdidas de rendimiento (5%) al biotratar la madera con este mismo hongo durante diez días y realizar una cocción al bisulfito cálcico (Mosai *et al.*, 1999).

También se han realizado estudios en los que se han tratado plantas anuales con hongos ligninolíticos con objeto de facilitar su uso como materia prima para la industria celulósico-papelera. El biotratamiento de kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) con *C. subvermispora* y *P. subserialis* no produjo mejoras aparentes en la calidad de la pasta. Sin embargo, tras un blanqueo, la blancura de la pasta “biokraft” fue mayor que la que no había incorporado pretratamiento fúngico (Ahmed *et al.*, 1998). Mohiuddin *et al.*, (2001) han tratado yute (*Corchorus capsularis*) con cepas de *C. subvermispora*,

P. chrysosporium y *Fomes lignosum* durante catorce días y posteriormente produjeron pasta por el procedimiento a la sosa. El resultado fue una reducción considerable, hasta del 30%, del índice kappa, acompañada de mejoras en la resistencia mecánica de las hojas de papel.

En general, se observa que el mayor inconveniente que presentan las pastas biotratadas es el menor rendimiento del proceso. No obstante, hay que hacer una matización al respecto, y es que en los biotratamientos se obtiene un índice kappa inferior. Si tratáramos de disminuir este parámetro por procedimientos convencionales, también se producirían pérdidas de rendimiento. Por el contrario, si fijamos un valor de número kappa (que es lo habitual en la industria), necesitaremos cocciones mas suaves, y previsiblemente, obtendremos rendimientos similares.

4.1.2. Biopasteado mecánico

Uno de los primeros retos que se tuvieron que afrontar en el desarrollo del biopasteado, fue el encontrar los microorganismos más adecuados, capaces de realizar la mayor degradación de la lignina en el menor tiempo, causando pocas modificaciones a los polisacáridos de la lignocelulosa. Esto llevaría asociados ahorros de energía en el desfibrado que, como ya se ha comentado, es uno de los principales objetivos del biopasteado mecánico, pues es uno de los limitantes de las pastas de alto rendimiento.

Los primeros experimentos, tal y como se ha expuesto, se realizaron con *Sporotrichum pulverulentum*, que no se mostró tan eficaz como se esperaba (Eriksson, 1985). Un mismo microorganismo puede realizar deslignificaciones más o menos efectivas según la madera sobre la que se incuba y la cepa del mismo que se emplee. Con uno de los más empleados, *Ceriporiopsis subvermispora*, se han conseguido ahorros de energía al realizar el biopasteado de cerca del 40 % con madera de *Pinus taeda* (Akhtar *et al.*, 1992). Tal vez lo más importante de este trabajo sea la variación de ahorros de energía en función de la cepa empleada del mismo microorganismo, encontrando oscilaciones en el ahorro energético entre el 20 y el 40%, lo que pone de manifiesto la importancia de la elección no sólo de la especie adecuada, sino incluso de la cepa correcta. Con *C. subvermispora* se han realizado biopasteados con otras maderas de coníferas como píceas (*Picea abies*) (Scott *et al.*, 1998), con ahorros en torno al 24 %, y con maderas de frondosas como el álamo (*Populus tremula*), consiguiendo en este caso ahorros de energía superiores incluso al 40 % según las condiciones de incubación

(Akhtar, 1994). También se han hecho experimentos con vegetales no madereros como el kenaf (Sabharwal *et al.*, 1994) con ahorros del 27 %, y con yute llegando a ahorrar un 30 % de energía (Sabharwal *et al.*, 1995). Otro microorganismo ensayado con éxito ha sido *Phlebia subserialis* que produce ahorros semejantes y presenta la ventaja de crecer en un intervalo mayor de temperaturas (Akhtar *et al.*, 1998).

Actualmente la búsqueda de microorganismos que degraden la madera de un modo que sea adecuado para el biopasteado sigue siendo de interés. Hakala *et al.* (2004) realizaron una búsqueda entre más de 80 cepas diferentes, analizando su capacidad para degradar madera de píceas, y encontraron que *Physisporinus rivulosus* presentaba unas características muy prometedoras para el biopasteado al presentar ratios de degradación lignina/celulosa mayores que los hongos empleados hasta entonces para estos fines. Otro estudio sobre madera de *Pinus taeda* ha mostrado la capacidad de *Pycnoporus sanguineus* para degradar selectivamente esta madera (Levin *et al.*, 2007). Algunos estudios trataban la pasta mecánica entre las etapas de desfibrado y refino consiguiendo importantes ahorros de energía en la etapa de refino, pero en ocasiones se producían pérdidas en las propiedades mecánicas y se necesitaban tiempos de incubación de al menos 3 días, lo que hacía muy compleja una posible implementación de la técnica (Kirk y Chang, 1981).

Junto al ahorro de energía se consigue en muchos casos la mejora en las propiedades mecánicas de las hojas de papel elaboradas a partir de dichas pastas, como consecuencia de una mayor calidad en el desfibrado mecánico. Esta mejora se pone de manifiesto como un aumento de las fracciones intermedias en un ensayo de clasificación de fibras de tipo Bauer-McNett –correspondientes a las fibras en un buen estado de integridad-, así como una disminución de la última fracción –correspondiente a los “finos”- (Sachs *et al.*, 1990). Uno de los inconvenientes que puede llevar asociado el biopasteado es la disminución de la blancura de las pastas biotratadas. Esta disminución se ha atribuido tanto a las oxidaciones que el hongo puede causar en la lignina de la madera como a pigmentos secretados por el microorganismo. No obstante, se ha demostrado que tras una etapa de blanqueo con peróxido, la blancura de una pasta biotratada, inicialmente inferior al control, alcanza valores ligeramente superiores a la no tratada (Kashino, *et al.*, 1993).

Aunque habitualmente los trabajos sobre biopasteado emplean hongos ligninolíticos para degradar los materiales lignocelulósicos, se encuentran algunas

experiencias en las que se emplean bacterias para este fin. Por ejemplo, se ha empleado *Streptomyces cyaneus* para deslignificar madera de píceas. Tras dos semanas de incubación, se produjo una deslignificación selectiva, siendo mayor la degradación de lignina en la parte próxima al lumen de las fibras. En cuanto al consumo de energía en el desfibrado y refinado posterior, éste se redujo en un 24%, siendo más importante el ahorro en la etapa de desfibrado. La resistencia mecánica de las hojas de papel de las pastas también se vio mejorada por la acción del tratamiento con bacterias (Hernández *et al.*, 2005).

Muchas veces, dado que se buscan tiempos de incubación cortos, se producen pérdidas de peso pequeñas en la fermentación. Esto es además deseable para mantener el alto rendimiento de los procesos mecánicos. No se puede atribuir entonces la mayor eficacia en el desfibrado y los mejores consumos energéticos a la desaparición de la lignina sino a su modificación. Este aspecto ha sido estudiado por Guerra *et al.* (2002, 2004), que observan rotura de enlaces aril-éter de la lignina causados por el hongo y relacionaron este fenómeno con el comportamiento de la madera biotratada durante el pasteado.

Uno de los mayores inconvenientes del biopasteado es que el inóculo ha de ser masivo para evitar contaminaciones y producir una fermentación eficaz. La necesidad del inóculo masivo supone inconvenientes tanto económicos como operacionales. Se ha conseguido rebajar el inóculo de modo considerable al añadir un residuo de la industria del maíz denominado “corn steep liquor”. La presencia de esta sustancia facilita el crecimiento del microorganismo en las etapas iniciales de la fermentación (Akhtar *et al.*, 1997), siendo especialmente importante este pretratamiento cuando se pretende escalar el proceso, ya que se llega a poder disminuir el inóculo de 3 Kg a 5 g por tonelada de astillas. Los primeros intentos de realizar biopasteado a gran escala se realizaron sobre 50 toneladas de astillas de píceas con el hongo *Ceriporiopsis subvermispora*. Los resultados mostraron que la madera tratada consume menos energía (-31%) y produce pastas con propiedades mecánicas ligeramente superiores y con un ligero descenso en la blancura que puede ser compensado aumentando la dosis de peróxido en el blanqueo (Akhtar *et al.*, 2000). Recientemente también se han llevado a cabo pruebas a escala piloto con madera de *Eucalyptus grandis*, tratando 45 toneladas de astillas con *C. subvermispora*, encontrando ahorros de energía del 18 % (Ferraz *et al.*, 2007). La blancura de las pastas biotratadas fue muy inferior (44 frente a 60), pero tras un

blanqueo con peróxido las diferencias prácticamente desaparecen (70 frente a 72) (Guerra *et al.*, 2006).

Se ha realizado una estimación de los costes de implantar el biopasteado en una planta de pasta mecánica. Los autores del estudio reconocen una amplia variación según el caso a considerar, pero estiman unos costes en torno a 6-8 millones de dólares para el caso de una fábrica de pasta termomecánica con una producción de 250 toneladas / día. Por otra parte, calculan que dicha implantación, en esta misma fábrica, supondría unos ahorros en torno a 5 millones de dólares al año (Akthar *et al.*, 2000).

4.2. Bioblanqueo

Se conoce como bioblanqueo al blanqueo de pasta de celulosa empleando enzimas como un biocatalizador en la secuencia de blanqueo. Los reactivos que se han utilizado tradicionalmente (cloro y derivados clorados) presentan alta eficacia y selectividad en el blanqueo, pero causan graves problemas medioambientales, por lo que se han implantado procesos menos contaminantes conocidos como ECF (Elemental Chlorine Free) y TCF (Totally Chlorine Free), aunque la incorporación de nuevos agentes de blanqueo, entre ellos las enzimas, sigue siendo un tema de interés (Odendhal, 1994; Peck y Daley, 1994).

Las primeras enzimas ensayadas fueron las xilanasas, que si bien no degradan directamente la lignina, facilitan la separación de ésta de los polisacáridos de la pasta. (Viikari *et al.*, 1986). Se han tratado de blanquear una gran cantidad de tipos de pastas, siendo las más estudiadas las pastas kraft de frondosas. Se consigue ahorrar reactivos de blanqueo manteniendo la calidad de las pastas (Bajpai *et al.*, 1994; Vicuña *et al.*, 1997). Varias fábricas han incluido una etapa con xilanasas, normalmente al comienzo de secuencia de blanqueo (Bajpai, 2004).

Actualmente, muchas investigaciones se centran en el uso de la lacasa como agente de bioblanqueo. Hasta 1990 no se pensaba que esta enzima pudiera ser muy útil en el blanqueo pues parecía que solo atacaba unidades fenólicas de la lignina. Entonces, Bourbonnais y Paice (1990) mostraron que en presencia de una sustancia de bajo peso molecular adecuada, denominada mediador, la lacasa era capaz de oxidar compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos. Estos mediadores actuarían como transportadores de electrones, inhibiendo además la repolimerización de los radicales oxidados. A este

proceso se conoce como sistema lacasa mediador (LMS: Laccase Mediator System). En la figura 11 se muestra un esquema de la reacción.

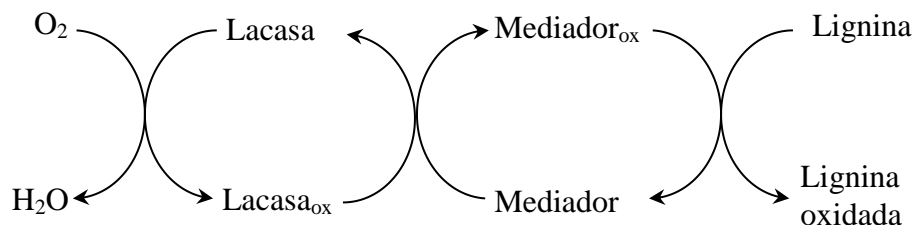


Figura 11.-Esquema de actuación del sistema lacasa mediador (LMS).

Se han descrito numerosas sustancias capaces de actuar como mediadores. La primera que se describió fue el ABTS (Bourbonnais y Paice, 1992). Una de las que se ha mostrado más eficaz es el HBT (Call y Mücke, 1997). Actualmente se están buscando mediadores naturales como por ejemplo el ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA), que se sabe que es un metabolito de algunos hongos como *Pycnoporus cinnabarinus* y que es capaz de hacer que la lacasa oxide compuestos modelo de lignina no fenólicos (Eggert *et al.*, 1996b). La lacasa de *P. sanguineus* combinada con acetosiringona como mediador natural ha mostrado su eficacia para blanquear pasta kraft de *E. globulus* (Eugenio *et al.*, 2010).

El sistema lacasa-mediador ha sido eficaz para el tratamiento de pastas kraft tanto de frondosas como de coníferas, alcanzado en ambos casos deslignificaciones superiores al 35 %. El sistema es técnicamente viable para su implantación industrial y se han realizado pruebas piloto que así lo demuestran. Los mayores inconvenientes para su implantación son los elevados precios de la enzima y del mediador (Call y Mücke, 1997), pero también los costes de enfriamiento y calentamiento que se originarían si se intercala una etapa enzimática de blanqueo, eficaz a unos 45 °C, entre etapas químicas que se desarrollan a 80-90 °C. Una situación análoga podría darse con el pH.

4.3. Otras aplicaciones

El biopasteado y el bioblanqueo son las dos áreas donde la biotecnología más se ha desarrollado dentro de las posibles aplicaciones a las industrias de celulosa y papel, pero además existen otras que no deben ser olvidadas. Entre ellas cabe destacar el

empleo de enzimas en el reciclado del papel, también en la reducción de *pitch* en la producción de pasta kraft, así como en el tratamiento de efluentes.

Dentro del reciclado de papel, en la etapa en la que el uso de enzimas ha despertado un mayor interés es en el destintado. Para facilitar el destintado se han empleado lipasas (Viesturs *et al.*, 1999), ya que muchas tintas son de base aceite. También se han empleado celulasas y hemicelulasas (Lee *et al.*, 2007) tratando de facilitar la separación tinta-fibra. También para este fin se han utilizado amilasas (Zollner y Schroeder, 1998), ya que muchos papeles de impresión y escritura llevan almidón en su superficie. Las amilasas también se han ensayado para facilitar la desintegración del papel viejo (López *et al.*, 2001) y para potenciar la eliminación de agentes de blanqueo fluorescentes (Lee *et al.*, 2008). Otra aplicación de enzimas en el reciclado es la reducción de los *stickies*, aglomerados de sustancias como colas y otros aditivos del papel viejo que aparecen como manchas en el papel reciclado y causando problemas en la máquina de papel. Para este fin se han ensayado celulasas, mostrando su capacidad para disminuir este problema (Park *et al.*, 2004).

Para el control del *pitch* se ha descrito la variante sin color de un hongo causante del azulado de la madera, *Ophiostoma piliferum*, comercializada como “Cartapip” (Farrell *et al.*, 1993), que incubado sobre las astillas disminuye la aparición de *pitch*. También se han propuesto soluciones empleando enzimas para tratar aguas de proceso y suspensiones de pasta, impidiendo la aparición de los aglomerados de *pitch*. Una de las enzimas más empleadas es una lipasa, comercializada como “resinasa” (Fujita *et al.*, 1992). En los últimos años se continúan proponiendo nuevas enzimas ya que los tratamientos descritos presentan diferente eficacia según la madera y el proceso de pasteado a considerar (Gutiérrez *et al.*, 2001).

El tratamiento de efluentes y aguas de proceso es una de las aplicaciones de los hongos de podredumbre blanca más estudiada y de la que se han obtenido varias patentes. Los procesos de tratamiento de efluentes han sido revisados por Garg y Modi (1999). Destacan procesos en los que se emplean enzimas ligninolíticas y otros en los que se emplean hongos inmovilizados. Rubilar *et al.*, (2008) revisan la capacidad de varios hongos de podredumbre blanca para degradar efluentes clorados, procedentes de etapas de blanqueo, que son los que más problemas originan. Ponen de manifiesto la capacidad de estos microorganismos para oxidar clorofenoles a quinonas liberando los átomos de cloro de la molécula orgánica. El tratamiento de aguas de proceso se hace

cada día más importante por el aumento del cierre de circuitos para disminuir el consumo de agua y disminuir el volumen de vertidos (Widsten y Kandelbauer, 2008). Uno de los tratamientos que ya se ha comentado es el referente al *pitch*, que influye tanto a la calidad del producto final como a las aguas de proceso. Se han hecho estudios en los que incluir una etapa con lacasa en los tratamientos de este agua consigue disminuir con mayor eficacia los compuestos lipofílicos, así como los derivados de la lignina presentes (Widsten *et al.*, 2004).

En los últimos años el aumento del interés por las biorrefinerías con base lignocelulósica, está haciendo que se incrementen los estudios sobre el uso de estos hongos en los pretratamientos necesarios para hidrolizar la lignocelulosa. No hemos de olvidar que aquí, junto con los hongos de podredumbre blanca y sus enzimas, también pueden desempeñar un papel notable los hongos que degradan eficazmente la celulosa para hidrolizarla y facilitar la producción de bioetanol (Singh y Singh, 2014).

II. OBJETIVOS

Con los antecedentes descritos, se plantean como objetivos del presente trabajo:

- Estudio de la degradación de la madera de pino radiata por diversos hongos potencialmente ligninolíticos mediante el análisis de la madera así fermentada y de su capacidad para ser empleada como materia prima en la fabricación de pasta mecánica. Análisis de las enzimas producidas por los hongos para avanzar en el conocimiento sobre su papel en la degradación de la lignina.
- Establecer un proceso de selección de los microorganismos más adecuados para pretratar la madera y producir pasta mecánica en las condiciones de menor consumo de energía (Biopasteado).
- Análisis del efecto de los componentes minoritarios de la madera (extraíbles con agua y acetona) sobre la fermentación fúngica con los hongos seleccionados, estudiando su influencia a distintos tiempos.
- Análisis de la influencia de los componentes minoritarios sobre el pasteado mecánico de astillas biotratadas y en la calidad de la pasta.
- Estudio de la degradación enzimática de films de lignina mediante el sistema lacasa mediador.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. HONGOS Y MADERA EMPLEADOS

1.1. Hongos

La selección de los hongos empleados se encuentra listada en la tabla IV. Se trata de 30 hongos basidiomicetos, depositados en la colección IJFM (Instituto Jaime Ferrán de Microbiología) del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) y actualmente en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM-SO). Muchos de ellos son cepas recogidas sobre madera en descomposición.

<u>Nº IJFM</u>	<u>Nombre</u>	<u>Nº IJFM</u>	<u>Nombre</u>
B-6	<i>Phellinus pomaceus</i>	B-42	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
B-7	<i>Phellinus ribis</i>	B-44	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
B-9	<i>Phellinus hirsutus</i>	A-104	<i>Pheniophora gigantea</i>
B-10	<i>Phellinus igniarius</i>	A-112	<i>Schizophyllum commune</i>
B-21	<i>Flammulina velutipes</i>	A-155	<i>Marasmius alliaceus</i>
B-23	<i>Heterobasidion annosum</i>	A-166	<i>Fomes fomentarius</i>
B-24	<i>Trametes</i> sp. I-62	A-169	<i>Pleurotus eryngii</i>
B-26	<i>Coriolus villosus</i>	A-241	<i>Coriolopsis gallica</i>
B-27	<i>Trametes trogii</i>	A-410	<i>Gloesoma vitellinum</i>
B-28	<i>Trametes gallica</i>	A-414	<i>Ganoderma australe</i>
B-29	<i>Coriolus pubescens</i>	A-469	<i>Phlebia chrysocrea</i>
B-31	<i>Coriolus hirsutus</i>	A-564	<i>Lentinus degener</i>
B-34	<i>Trametes versicolor</i>	A-581	<i>Bjerkandera adusta</i>
B-35	<i>Trametes villosa</i>	A-601	<i>Disporotrichum dimorphosporum</i>
B-36	<i>Trametes pavonia</i>	A-631	<i>Dichomitus squalens</i>

Tabla IV.-Cepas de hongos empleados, con su identificación en la colección IJFM.

Todos ellos se mantuvieron a través de resiembras periódicas en tubos inclinados con medio agar-malta (extracto de malta 2%, agar bacteriológico 2%), incubándolos a 28 °C el tiempo necesario para completar su crecimiento (7-10 días). Posteriormente se conservaron a 4 °C.

1.2. Madera

Todo el estudio se realizó con madera de *Pinus radiata* procedente de Santander. La madera se recibió en forma de trozas que se descortezaron manualmente, tras lo cual fueron astilladas en una astilladora semi-industrial de volante con dos cuchillas. Las astillas se tamizaron a continuación eliminando las retenidas por un tamiz de 30 mm de diámetro de agujeros y las que atravesaban uno de 8 mm. Para facilitar la extracción de componentes minoritarios no se utilizaron astillas de tamaño industrial, sino astillas más pequeñas, del denominado tamaño cerilla. Para la reducción de tamaño se empleó un refinador de laboratorio “Sprout-Waldron” con una vestidura de discos de púas C2975, ajustados a la separación mínima. Tras esta operación las astillas fueron tamizadas de nuevo para eliminar el serrín y pequeñas partículas producidas durante el astillado. Las astillas se conservaron en bolsas de polipropileno tras dejarlas secar al aire.

1.2.1. Extracción de las astillas

Para la extracción de las astillas se empleó un extractor tipo Soxhlet, montado en el laboratorio a partir de un reactor de 3 litros de capacidad para poder extraer, aproximadamente, 500 gramos de madera por carga (Figura 12). Las astillas fueron extraídas con acetona o agua durante 24 h., tras lo cual se dejaron secar al aire a temperatura ambiente.

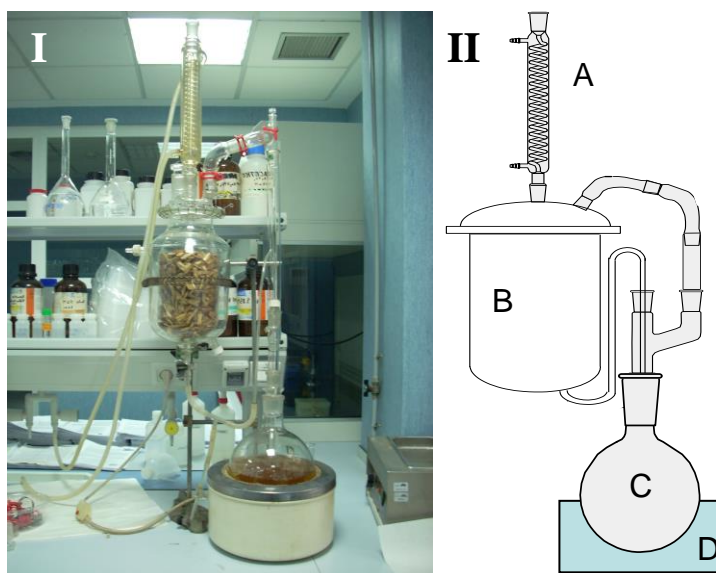


Figura 12.-Fotografía (I) y esquema (II) del extractor de astillas. A: refrigerante; B: cuerpo extractor; C: matraz colector; D: Manta calefactora.

2. CULTIVO DE LOS HONGOS

2.1. Cultivos sólidos

Los hongos se cultivaron en placa Petri con medio agar-malta (2%), incubándolos a 28 °C. Para el inóculo de la placa se tomó una porción de agar con el hongo crecido sobre él, procedente de un tubo inclinado o de una placa crecida previamente. En los ensayos de selección el medio se suplementó con azul de ramazol o con ABTS, tal y como se describe en el siguiente apartado. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 110 °C.

2.2. Decoloración de azul de ramazol y oxidación del ABTS

Para realizar la primera selección de hongos a emplear se utilizó la capacidad de estos microorganismos de decolorar el colorante antrónico azul de ramazol (Remazol Brilliant Blue R, Colour Index 61200), ya que su degradación se ha descrito como un buen indicador de la capacidad ligninolítica de un microorganismo (Pasti y Crawford, 1991). El colorante se preparó primero como una disolución concentrada (diez veces) que se esterilizó por filtración a través de filtros de 0,22 µm de poro. A continuación, se suplementó el medio de cultivo (agar-malta) con el colorante a una concentración final de 0,05 g/100 ml.

El ABTS es un sustrato de la lacasa ampliamente empleado para su cuantificación (ver 4.1.3 de esta sección). Aquí se emplea simplemente para comprobar si los hongos capaces de degradar el azul de ramazol poseen dicha enzima. Para ello se suplementaron las placas de agar-malta con ABTS a una concentración final de 2 mM. El ABTS se preparó como una disolución concentrada (20 mM) que se esterilizó por filtración a través de filtros de 0,22 µm de poro.

En ambos casos los hongos se incubaron a 28 °C durante diez días, tras lo cual se evaluó su capacidad para decolorar el azul de ramazol o para oxidar el ABTS, lo que se pone de manifiesto por la aparición de color verde intenso.

2.3. Preparación del hongo para su fermentación sobre astillas

Dado que los hongos basidiomicetos no suelen producir esporas en condiciones de laboratorio, para que el hongo pueda colonizar las astillas es necesario preparar primero una dispersión del micelio, a la que se conoce como preinóculo. El preinóculo se prepara a partir de placas Petri tras diez días de crecimiento del hongo. El agar de la placa se corta en cuadrados de aproximadamente 1 cm², que se introducen en un matraz

Erlenmeyer de 500 ml con 250 ml de agua estéril; todo el proceso se realiza manteniendo las condiciones de esterilidad. Para lograr una buena dispersión del micelio, se mantiene este cultivo durante 48 horas en agitación constante a 200 rpm y 28 °C. Transcurrido este tiempo, este preinóculo se utiliza para inocular las astillas en los diferentes experimentos.

3. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

3.1. Experimentos para biopasteado

3.1.1. *Diseño del reactor*

Para poder fermentar cantidades de madera suficientes para ser sometidas a pasteado mecánico, se diseñó y construyó un dispositivo adecuado (figura 13). El reactor cuenta con cavidades para albergar 10 botellas de 2 litros de capacidad que se describen a continuación. El reactor permite agitar y airear las astillas; gira a 1,25 rpm para permitir una mezcla de astillas en el interior de las botellas. Además, dispone de un sistema de distribución de aire que permite airear las diez botellas en paralelo. El aire, procedente de la atmosfera, es impulsado por una bomba de membrana y se hace burbujear a través de un frasco lavador con agua para saturarlo de humedad antes de llegar al distribuidor. Desde el distribuidor se reparte a las botellas, pudiéndose cerrar las salidas que no se utilicen. El equipo dispone de un temporizador para controlar los tiempos de agitación y paso de aire. Se encuentra ubicado en una estufa de cultivo para poder controlar la temperatura.

La fermentación se lleva a cabo en frascos de polipropileno esterilizables a los que se les ha modificado la tapa, añadiendo filtros de 0,22 mm para permitir la entrada de aire manteniendo la esterilidad (figura 13).

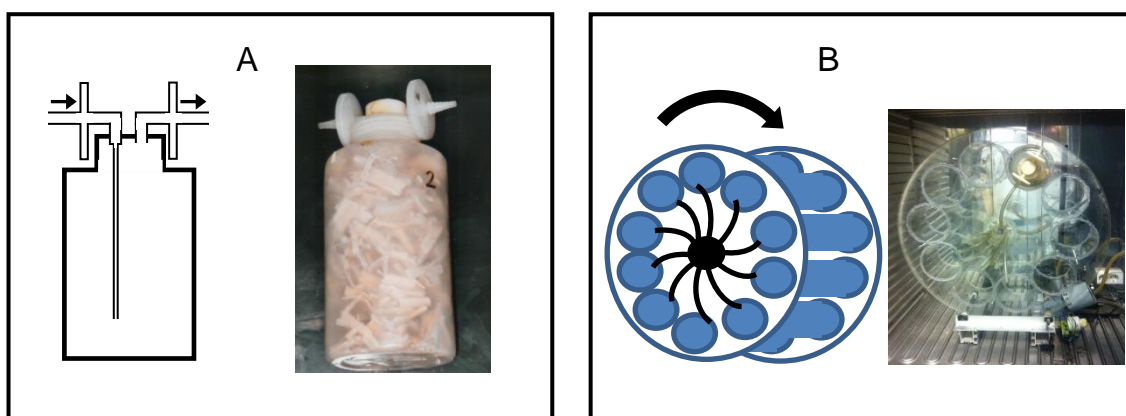


Figura 13.-Esquema y fotografía del recipiente donde se desarrolla la fermentación (A) y del reactor para albergarlos (B).

3.1.2. Condiciones y desarrollo de la fermentación

Las botellas de polipropileno, con 250 gramos secos de astillas, se esterilizaron en autoclave (20 minutos a 110 °C) y se inocularon con 250 ml del preinóculo antes descrito (apartado 2.3) manteniendo la esterilidad. Se agitaron manualmente durante unos pocos minutos hasta que el líquido del preinóculo fue absorbido por la madera y los propágulos del hongo quedaron adheridos sobre la superficie de las astillas. Las botellas fueron incubadas durante 30 días a 28 °C con agitación e inyección de aire durante un minuto cada hora. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado. Se realizaron experimentos control en los que las astillas fueron sometidas al mismo tratamiento pero el preinóculo se sustituyó por agua destilada.

3.2. Experimentos para el estudio de las condiciones de fermentación

Para realizar un estudio de los efectos del hongo a diferentes tiempos se realizaron experimentos con una pequeña cantidad de astillas de madera y un número alto de muestras. Para este estudio se empleó el equipo descrito en la figura 14. La fermentación se llevó a cabo en una columna de vidrio, en la que la madera se mantenía húmeda a través de un sistema de burbujeo de agua acoplado en su parte inferior (columna de Raimbault). Todo el sistema se encuentra sumergido en un baño termostático para controlar la temperatura. El aire proviene de una bala de aire sintético y a través de un distribuidor con múltiples salidas se regula el caudal para cada columna. Algunas de las columnas (las que se mantuvieron hasta el final de la fermentación) se conectaron a un analizador de CO₂ para evaluar el crecimiento del hongo. Estas columnas llevan en el extremo superior una salida que conduce a otra columna con gel de sílice para que el aire llegue seco al analizador de CO₂, situado a continuación. Se extraen columnas a los 6, 12, 18, 24 y 30 días de incubación.

Se prepararon 15 gramos secos de madera por columna. Tras la esterilización se añadió el inóculo en proporción 1:1 (al igual que en el caso anterior), llenándose cada columna, bajo condiciones de esterilidad, con 30 gramos húmedos de astillas inoculadas.

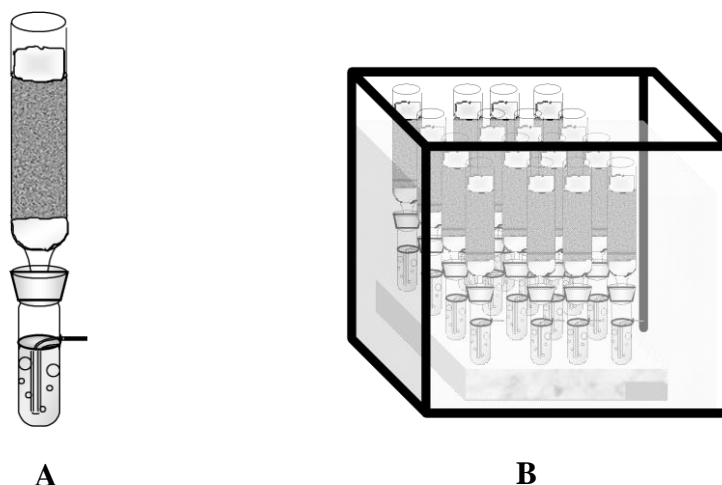


Figura 14.-Esquema de la columna de vidrio (A) y del incubador (B).

3.3. Tratamiento de las astillas una vez fermentadas

En los dos casos descritos, tras la fermentación se extraen las enzimas presentes en las astillas con tampón ácido acético/acetato de sodio 100 mM pH 5,2 durante una hora, sometido a agitación (Rios y Eyzaguirre, 1992). Se añaden 2 ml de tampón por cada gramo de astillas secas iniciales. En el caso de las astillas para estudios a distintos tiempos de fermentación, previamente se apartaron algunas astillas para los estudios de microscopía.

Tras esta extracción las astillas se dejan secar al ambiente 2-3 días, y en el caso de astillas para biopasteado, se pesan y se calcula su sequedad para saber el peso seco final, y junto con el peso seco inicial, calcular la pérdida de peso debida a la incubación. Una vez secas y pesadas las astillas se unen los duplicados y se toman 2 porciones de 150 gramos para pasteado y el resto se muele y tamiza para su análisis químico. El sobrenadante se filtra, primero por placas de vidrio del n° 2 y a continuación por filtros de 0,45 μm . Sobre él se determinan las actividades enzimáticas lacasa, LiP y MnP.

4. ANÁLISIS DE LOS SOBRENADANTES

4.1. Determinación de actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas se analizaron en un espectrofotómetro UV-Visible Jasco V-530. Todos los ensayos tuvieron una duración de un minuto.

4.1.1. *Actividad lignina peroxidasa*

El ensayo se basa en el método descrito por Tien y Kirk (1983), que usa como sustrato el alcohol veratrílico, que se oxida a veratraldehído en presencia de H₂O₂. La mezcla de reacción contiene una concentración final de tampón tartrato 100 mM (pH 3,0), alcohol veratrílico 2 mM, H₂O₂ 0,4 mM y el medio extracelular a evaluar. Se mide el incremento de absorbancia a $\lambda=310$ nm, para la cual el veratraldehído presenta un coeficiente de extinción molar, ϵ_0 , de 9300 M⁻¹cm⁻¹.

4.1.2. *Actividad manganeso peroxidasa*

Para cuantificar esta actividad se usa un método basado en la oxidación del alcohol veratrílico en presencia de H₂O₂ y Mn (Paszczynski *et al.*, 1988). La reacción se lleva a cabo en tampón tartrato 100 mM, midiendo la variación de absorbancia a $\lambda=238$ nm. Bajo estas condiciones el producto formado presenta un $\epsilon_0=6500$ M⁻¹cm⁻¹.

4.1.3. *Actividad lacasa*

Se empleó el ensayo que utiliza 2,6-dimetoxifenol como sustrato (Wariishi *et al.*, 1992). Se realiza el ensayo preparando una mezcla con el medio extracelular y 2,6-dimetoxifenol 10 mM en tampón acético/acetato 100 mM (pH 5,2). Se cuantifica la variación de absorbancia a $\lambda=468$ nm, para la que el producto de oxidación presenta un $\epsilon_0=49600$ M⁻¹cm⁻¹. Se empleó este método y no el del ABTS (Wolfenden y Willson, 1982), más ampliamente utilizado, porque se ha puesto de manifiesto que ciertas sustancias extraíbles de la madera, como es el caso del ácido tánico, causan interferencias con él (Terrón *et al.*, 2004b).

4.1.4. *Definición de unidad enzimática*

En todas las actividades enzimáticas que se determinaron se define la unidad de actividad (UA), como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de producto en un minuto.

4.2. **Técnicas electroforéticas**

4.2.1. *Electroforesis nativas. Zimogramas*

Un zimograma consiste en realizar una electroforesis en condiciones nativas y revelar el gel con un sustrato específico para la actividad enzimática a estudiar. El

procedimiento seguido en este tipo de electroforesis es similar al descrito por Laemmli (1970), salvo que los zimogramas se desarrollan en ausencia de β -mercaptoetanol y las muestras no se hierven. La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta Mini-Protean (Bio-Rad). El gel separador presentaba una concentración de acrilamida-bisacrilamida del 12%. El gel concentrante contenía acrilamida-bisacrilamida al 5%. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 80 V hasta que los marcadores de frente alcanzaron el extremo inferior del gel (aproximadamente dos horas). Como marcador de peso molecular se empleó el estándar preteñido “Precision Plus Protein Standards” suministrado por Bio-Rad, que consta de proteínas de 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 KDa.

Entre los diferentes sustratos de la lacasa se empleó 2,6-dimetoxifenol, que en presencia de actividad enzimática da lugar a bandas anaranjadas. Para la tinción se equilibró previamente el gel en tampón acético/acetato 100 mM (pH 5,2) durante 20 minutos, tras lo cual se puso en contacto con el 2,6-dimetoxifenol (10 mM en tampón acético/acetato 100 mM, pH 5,2) hasta la aparición de las bandas coloreadas. Para detener la reacción, el gel se lavó de nuevo utilizando el mismo tampón. Para su conservación el gel se secó entre dos láminas de celulosa.

4.2.2. *Isoelectroenfoque*

El isoelectroenfoque se realizó utilizando un equipo Mini IEF Cell 111 (Bio-Rad), preparando el gel con la siguiente composición: agua destilada 4,5 ml, anfolitos pH 2-4 (Bio-Rad) 200 μ l, acrilamida-bisacrilamida 3 ml, glicerol (25%) 2 ml, persulfato de amonio 70 μ l, riboflavina-5'-fosfato 70 μ l y TEMED 20 μ l. Se dejó polimerizar durante 30 minutos y posteriormente se cargaron 50 μ l de muestra junto con 50 μ l de tampón de carga (azul de bromofenol 0,1%, glicerol 50%, 0,04% anfolitos y 49,9% agua destilada). El isoelectroenfoque se desarrolló en las siguientes etapas:

15 minutos	100 V
15 minutos	200 V
30 minutos	400 V

Tras el desarrollo del isoelectroenfoque el revelado se realizó con 2,6-dimetoxifenol, de modo análogo al empleado para los zimogramas. Una vez

revelado el gel, se cortaron las bandas de color anaranjado, que indican presencia de lacasa, y se introdujeron en solución de cloruro de potasio 10 mM (2 ml). Transcurridos 30 minutos se midió el pH de la solución, correspondiendo el pH medido al punto isoeléctrico.

5. ANÁLISIS QUÍMICOS DE LA MADERA

5.1. Preparación de la muestra

Se muelen las astillas, previamente secas al ambiente, en un molino de martillos. A continuación se tamiza la muestra y se selecciona la fracción que atraviesa un tamiz de 0,400 mm de luz y que queda retenida por uno de 0,300 mm. La fracción gruesa se molió repetidas veces hasta obtener 20 gramos de serrín tamizado en dicho intervalo. Se conserva también la fracción que atraviesa un tamiz de 0,250 mm de luz para emplearla en los análisis de FTIR. Se determina su humedad por secado de una parte a 110 °C hasta peso constante. A continuación, se realizan extractos en acetona y agua caliente, con una doble finalidad, conocer los extraíbles de la madera y preparar las muestras para la determinación de lignina, holocelulosa y pentosanos.

5.2. Extractos en acetona y agua caliente

El serrín molido se separa en dos partes que se pesan y se colocan en cartuchos de extracción. De acuerdo con la norma UNE EN ISO 14453 se extraen en un extractor Soxhlet con acetona durante 3 horas. Se determinan los extractos por diferencia de peso del matraz del extractor. Del serrín extraído, una vez evaporada al aire la acetona residual, se determina su humedad y se somete a una extracción en agua caliente durante 3 horas. Por diferencia de peso del serrín seco se determinan los extraíbles en agua.

5.3. Lignina

Se determina a partir de serrín extraído en acetona y agua caliente. Se realiza de acuerdo a la norma UNE 57100. El método establece una hidrólisis ácida y la determinación por gravimetría del residuo, que corresponde a la lignina.

5.4. Holocelulosa

Se determina a partir de serrín extraído en acetona y agua caliente, mediante el método de Wise *et al.*, (1946). Se basa en la solubilización de la lignina por oxidación en contacto con dióxido de cloro.

5.5. Pentosanos

Se determina de acuerdo con la norma UNE 57086 a partir de serrín extraído en acetona y agua caliente. En una primera etapa los pentosanos se hidrolizan y convierten en furfural y a continuación éste se determina colorimétricamente.

5.6. Análisis por FTIR

El análisis se realizó en un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier Jasco FTIR-4600, equipado con un accesorio para la medida por reflectancia (ATR) mediante un cristal de ZnSe. Las bandas obtenidas se normalizaron por la señal a 1510 cm^{-1} que se considera constante, para poder realizar análisis cuantitativos con las muestras (Dorado *et al.*, 2001).

6. PRODUCCIÓN DE PASTA MECÁNICA Y ANÁLISIS

6.1. Producción de pasta. Medida del consumo de energía

Para la producción de pasta mecánica se empleó un refinador de discos Sprout Waldron D2202 con discos modelo C2976 (Fig 15). Las astillas de madera (dos porciones de 150 g) se colocan a remojo previo al desfibrado (durante la noche) para una total hidratación. Para el desfibrado de la madera se colocaron los discos a una separación de 5,08 mm. (0,2 pulgadas). Las astillas se añadieron al tornillo sin fin que alimenta al desfibrador en un tiempo aproximado de 3 minutos cada porción, junto con agua a 60 °C con un caudal de 2 l/min. El consumo de energía del motor se midió con un analizador Duccati y un software diseñado a tal efecto. La aplicación posibilita discriminar la energía activa y reactiva, así como descontar la potencia en vacío del equipo. La pasta producida se recoge sobre una malla metálica que permite que drene el agua. La pasta se somete a un refinado en el mismo equipo, empleando los mismos discos, pero en este caso con una separación de 2,03 mm. (0,08 pulgadas). El dividir las astillas en dos partes permite tener dos medidas del consumo de energía para poder evaluar si las diferencias entre muestras son significativas. Tras la etapa de refinado las

dos porciones de la pasta se mezclan para tener suficiente muestra para los análisis posteriores. La pasta obtenida se secó en una centrífuga y se conservó en forma de copos en bolsas de polietileno para posteriores análisis.

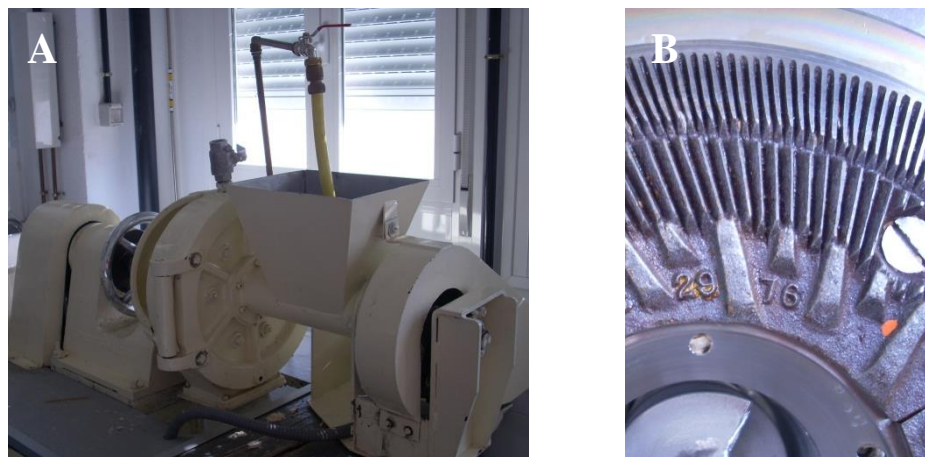


Figura 15.-Fotografía del refinador de discos (A) y detalle del disco empleado (B).

6.2. Análisis de la calidad de la pasta

6.2.1. Grado de refino Schopper-Riegler

El grado de refino Schopper-Riegler se determinó de acuerdo a la norma UNE EN ISO 5267-1. Este ensayo evalúa el grado de refino (fibrilación) de las fibras de celulosa a través de su capacidad para retener agua, obteniéndose un resultado de 0 a 100 grados Schopper-Riegler (°SR), correspondiendo un mayor °SR a un mayor refino.

6.2.2. Clasificación Bauer-McNett

Se realizó de acuerdo con la norma UNE 57118. El método consiste en hacer circular una suspensión de 10 gramos de pasta a través de una cascada de 4 cubetas dispuestas de tal forma que la salida de la primera cubeta vierta sobre la segunda y así sucesivamente. Un tamiz metálico, con luz cada vez menor, se sitúa a la salida de cada cubeta para retener fibras. Unas aspas ubicadas dentro de cada cubeta proporcionan la agitación necesaria para que las fibras circulen paralelas al tamiz y la retención se haga por su longitud. De esta forma el porcentaje de pasta retenido en cada cubeta corresponde a fibras con una longitud incapaz de atravesar el tamiz y el ensayo es un índice de la integridad de las fibras y de la agregación que se ha conseguido con el pasteado mecánico. Se realiza en ensayo con telas de número 30, 50, 100 y 200 (que corresponden a aberturas de 595, 297, 197 y 74 μm). Las fracciones obtenidas se

denotan como $F_{>30}$, F_{30-50} , F_{50-100} , $F_{100-200}$ y $F_{<200}$. La última fracción corresponde a los finos que atraviesan todos los tamices y se calcula por diferencia entre los 10 gramos iniciales y la suma de las fibras recogidas en las 4 cubetas.

6.2.3. *Determinación de rechazos “Sommerville”*

El “Sommerville” es un tamiz plano ampliamente utilizado aunque el método no se encuentra normalizado. El ensayo consiste en hacer pasar 50 gramos de pasta a través de un tamiz con 756 ranuras de 45 mm de longitud y una anchura de 0,15 mm. Se considera rechazo la cantidad de pasta que no ha sido capaz de atravesar el tamiz tras los 20 minutos de duración del ensayo.

6.3. **Formación de hojas y análisis de propiedades**

Para la formación de hojas de ensayo la pasta se desintegró en un equipo de laboratorio siguiendo la norma UNE EN ISO 5236. Las hojas se elaboraron en un formador Rapid-Köthen de acuerdo con la norma UNE EN ISO 5269-1, tras lo cual se acondicionaron en atmósfera normalizada (23 °C y 50 % H.R.) durante 24 horas para determinar sus características. Se determinaron gramaje (UNE EN ISO 536) y espesor (UNE EN 20534), para poder calcular la densidad aparente y el volumen específico. Se determinó la porosidad mediante el equipo Gurley (UNE 57066). Se determinaron la opacidad (UNE 57063) y la blancura (UNE 57062) con un espectrofotómetro Elrepho. Asimismo se determinaron las principales propiedades de resistencia: la resistencia al estallido (UNE EN ISO 2758) se determinó con un eclatómetro tipo Müllen, la resistencia al rasgado (UNE EN 21974) con un desgarrómetro de péndulo Elmendorf y la resistencia a la tracción y el alargamiento (UNE EN ISO 1924-2) con un dinamómetro Adamel Lhomargy.

7. ANÁLISIS MICROSCÓPICOS

7.1. **Microscopía óptica**

7.1.1. *Análisis de muestras de madera*

Se realizaron distintas observaciones de muestras de astillas biotratadas. Por un lado, las astillas completas, tras la incubación, se observaron con una lupa binocular (10-63 aumentos), realizando fotografías con una cámara acoplada al equipo. En este caso no se realizó ningún tipo de tinción ni de preparación de la muestra.

Para una observación más detallada se realizaron cortes con un microtomo y se tiñeron con una doble tinción de safranina y azul astra de acuerdo con Srebotnik y Mesner (1994). En este caso las preparaciones se observaron con un microscopio Olympus Vanox empleando 100 y 300 aumentos.

7.1.2. Análisis de muestras de pasta

Las pastas fueron observadas al microscopio para evaluar la calidad del desfibrado. Para ello se tiñeron con el reactivo de Herzberg preparado de acuerdo con la norma UNE 57021-2 y se observaron de modo similar al descrito para los cortes con el microtomo.

7.2. Microscopía electrónica de barrido

Se analizaron muestras de astillas tras la fermentación fúngica. El primer paso consistió en fijar la muestra para evitar que la afectara el tratamiento posterior. Para ello se sumergieron las astillas en una disolución de glutaraldehído al 5% en tampón fosfato 0,1M, pH 7,3 durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las astillas se lavaron con el mismo tampón para eliminar el glutaraldehído y se post-fijaron en una disolución de OsO₄ al 2% en el mismo tampón, manteniendo las astillas durante 2 horas a 4 °C.

Tras este proceso se procedió a deshidratar las muestras sumergiéndolas en acetona en concentraciones crecientes del 30, 40, 50, 70, 80, 90 y 100 %, realizándose dos tratamientos de 30 minutos para cada concentración. Finalmente la muestra se secó al punto crítico (empleando CO₂ líquido) en un equipo Samdri-780B.

Para hacer las muestras conductivas, tras fijarlas en un portamuestras de aluminio con adhesivo de carbón coloidal, se cubrieron con carbón y oro en una evaporadora Belzers. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico Jeol, JSM-5900LV. Se empleó una distancia focal de trabajo de 15 mm. y un voltaje de aceleración de 13 kV.

8. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE FILMS DE LIGNINA

8.1. Preparación de la lignina

Para poner a punto la técnica de formación de los films se empleó alcalilignina (Indulin AT). Dado que la alcalilignina comercial se encuentra en forma de sal y que esto puede interferir en la formación del film, dicha alcalilignina se sometió al siguiente tratamiento: 1 gramo de alcalilignina se solubilizó en 10 ml NaOH 1M y a continuación

se añadió un volumen igual del HCl 1M, lo que hace que la lignina quede en forma de suspensión (así conseguimos protonar los aniones de la sal comercial). La muestra se centrifugó 1h a 4500 rpm y el precipitado se liofilizó. Así se obtiene una lignina que ya no se encuentra en forma de sal sino protonada.

Los estudios finales se llevaron a cabo con una lignina que semejara la lignina nativa. Se seleccionó la lignina EAL (enzymatic/acidolysis lignin) descrita por Wu y Argyropoulos (2003), por ser similar a la ampliamente empleada MWL (milled wood lignin) (Björkman, 1956), pero más fácil de obtener y con más rendimiento. Ambas ligninas se disolvieron al 0,5 % en 1,4-dioxano para la formación de films delgados.

8.2. Formación de los films de lignina

La formación de films delgados se realizó en una recubridora giratoria o “spincoater” WS-400A-6NPP de Laurell Technologies (figura 16). Como soporte se emplearon láminas de sílice, excepto cuando la muestra se destinó a ensayos en la microbalanza de cristal de cuarzo, en cuyo caso se emplearon los electrodos de oro adecuados para dicho equipo. Ambos soportes fueron cubiertos con poliestireno para hidrofobarlos. Las láminas de sílice se recubrieron en la recubridora giratoria, mientras que los electrodos para la microbalanza se adquirieron ya recubiertos. Entre las distintas condiciones ensayadas se obtuvo un film uniforme y estable cuando el film se generó a 3000 rpm durante un minuto.



Figura 16.-Fotografía (A) y esquema (B) de funcionamiento de la recubridora giratoria o “spincoater”.

8.3. Caracterización de los films

Los films fueron caracterizados mediante microscopía de fuerza atómica (AFM), con un microscopio Q-Scope 250 (Queasant), en el modo de contacto intermitente (“tapping”) con puntas de Si₃N₄. Se exploraron superficies de 2 μm x 2 μm.

También se comprobó que la capa correspondía a lignina mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) utilizando un equipo RIVER LAS-3000.

8.4. Estudios de modificación de los films por acción de la lacasa

Para los estudios de degradación de los films se utilizó una lacasa comercial (Fluka) procedente de *Trametes versicolor* y se empleó 1-hidroxibenzotriazol (HBT) como mediador.

Se realizó un estudio dinámico de modificación de los films empleando una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) (figura 17). Se empleó una concentración de lacasa de 500 unidades por litro, con una concentración de HBT de 10 mM, en tampón acetato 100 mM pH 4,5. Se registraron las variaciones de frecuencia en la QCM al añadir el sistema lacasa mediador sobre el film de lignina y al variar el pH (hasta pH 10), añadiendo NaOH 100 mM antes y después del tratamiento con la enzima.



Figura 17.-Fotografía de la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM).

Se evaluó el efecto de la lacasa sobre el film de lignina midiendo el ángulo de contacto entre el film y agua destilada antes y después de la incubación con la enzima.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. SELECCIÓN DE HONGOS DE PODREDUMBRE BLANCA ADECUADOS PARA EL BIOPASTEADO

1.1. Preselección sobre placa

Se ha realizado una primera selección de hongos de acuerdo a bibliografía y disponibilidad. De los treinta hongos listados en la tabla IV de la metodología, muchos se han seleccionado revisando los trabajos de Leonovicz *et al.*, (1999, 2001), Mswaka y Magan (1998), Ferraz *et al.*, (2001) y Machuca y Ferraz (2001). Se seleccionaron asimismo hongos prometedores, aislados de madera en descomposición, donde el residuo presentaba aspecto de podredumbre blanca, poco estudiados hasta la fecha (*Pycnoporus sanguineus*, *Coriolus pubescens*). Junto con ellos, otros muy estudiados y tomados como modelo (*Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*) para poderlos usar como referencia. Tal y como se describe en los objetivos, la selección final del microorganismo se ha realizado en experimentos directos de biopasteado, pero ha sido necesario hacer una preselección previa. Para ella se tuvo en cuenta que los hongos tuvieran un crecimiento rápido, ya que el lento crecimiento de los hongos basidiomicetos es uno de los limitantes de su aplicación en el biopasteado (Akhtar *et al.*, 2000; Ferraz *et al.*, 2007). También se consideró un parámetro importante la capacidad de los hongos para decolorar el colorante antrónico azul de ramazol, que ha sido empleado como modelo para estudiar la capacidad deslignificadora (Mechichi *et al.*, 2006). Por último, también se realizaron placas suplementadas con ABTS para analizar la capacidad de producir lacasa de los hongos estudiados.

Los resultados se muestran en la tabla V. Los únicos que no cumplieron con dos criterios fueron *D. squalens*, *P. gigantea*, *D. dimorphosporum* y *L. degener* que fueron descartados por no decolorar el azul de ramazol ni colorear las placas de ABTS. *M. alliaceus*, *F. fomentarius*, *G. australe*, *H. annosum* y *P. ribis* crecieron muy lentamente, no llegando a cubrir ni la mitad del área de la placa Petri en 7 días de incubación, por lo que se consideró poco oportuno continuar con ellos. *P. pomaceus*, *F. velutipes*, *S. commune* y *G. vitellinum* colorearon la placa que contenía ABTS pero no decoloraron la que contenía azul de ramazol, por lo que si bien estos hongos pueden expresar lacasas, estas no parecen ser capaces de decolorar el colorante modelo, por lo que también se decidió no usar estas cepas. La coloración del ABTS indicaría que las cepas producen lacasa aunque, al no decolorar el azul de ramazol, esta enzima podría desempeñar papeles diferentes a la ligninólisis como puede ser la formación de cuerpos fructíferos o de pigmentos (Thurston, 1994).

Hongo	Decoloración de AR	Coloración ABTS	Crecimiento
<i>P. pomaceus</i>	-	+	++
<i>P. ribis</i>	+	+	+
<i>P. hirsutus</i>	+	+	++
<i>P. igniarius</i>	+	+	++
<i>F. velutipes</i>	-	+	++
<i>H. annosum</i>	+	+	+
<i>Trametes</i> sp. I-62	+	+	+++
<i>C. villosus</i>	+	+	++
<i>T. trogii</i>	+	+	++
<i>T. gallica</i>	+	+	++
<i>C. pubescens</i>	+	+	+++
<i>C. hirsutus</i>	+	+	++
<i>T. versicolor</i>	+	+	++
<i>T. villosa</i>	+	+	++
<i>T. pavonia</i>	+	+	++
<i>P. sanguineus</i>	+	+	+++
<i>P. chrysosporium</i>	-	?	+++
<i>P. gigantea</i>	-	-	++
<i>S. commune</i>	-	+	++
<i>M. alliaceus</i>	-	+	+
<i>F. fomentarius</i>	+	+	+
<i>P. eryngii</i>	+	+	++
<i>C. gallica</i>	+	+	++
<i>G. vitellinum</i>	-	+	++
<i>G. australe</i>	+	+	+
<i>P. chrysocrea</i>	+	+	++
<i>L. degener</i>	-	-	+
<i>B. adusta</i>	+	+	++
<i>D. dimorphosporum</i>	-	-	++
<i>D. squalens</i>	-	-	++

Tabla V.-Decoloración de azul de ramazol, coloración de ABTS y crecimiento de los hongos. En la columna de crecimiento + indica que el crecimiento fue inferior a media placa en 7 días, ++ un crecimiento cercano a cubrir toda la placa y +++ que el microorganismo cubrió toda la placa en menos de 7 días.

Dado que había suficientes hongos con potencial para ser seleccionados (17), se descartó emplear *P. chrysocrea* porque sólo se ha descrito su crecimiento sobre especies de frondosas (Berry, 1976) y el presente trabajo se desarrolla sobre una conífera.

P. chryso sporium se seleccionó, a pesar de no decolorar el azul de ramazol y presentar una coloración irregular del ABTS, por ser un organismo modelo en la biodegradación de la lignocelulosa sobre el que se han realizado numerosos estudios (Gold y Alic, 1983; Cullen, 1997; Martínez *et al.*, 2004; Shing y Chen 2008). De entre los hongos restantes un grupo importante pertenece al grupo de los denominados Trametoides (genero *Trametes* y afines): *Trametes* sp. I-62, *C. villosus*, *T. trogii*, *T. gallica*, *C. pubescens*, *C. hirsutus*, *T. versicolor*, *T. villosa*, *T. pavonia* y *C. gallica*. Se decidió descartar varios hongos de este grupo para que los seleccionados pertenecieran a diferentes géneros. De ellos se seleccionaron *T. versicolor* como organismo modelo y *C. pubescens* y *Trametes* sp. I-62 por su alta capacidad de crecimiento. *C. gallica* se seleccionó asimismo por la amplia información disponible sobre él en el grupo de trabajo (Calvo *et al.*, 1998; Yagüe *et al.*, 2000; Carbajo *et al.*, 2002; Terrón *et al.*, 2004b). Junto con *P. hirsutus*, *P. igniarius*, *P. sanguineus*, *P. eryngii* y *B. adusta* forman los diez hongos seleccionados para desarrollar los experimentos de biopasteado.

La selección de microorganismos con capacidad ligninolítica mediante ensayos en placa es un método ampliamente utilizado en una primera etapa de selección (Tortella *et al.*, 2008; Dhouib *et al.*, 2005; Kiiskinen *et al.*, 2004; de Koker *et al.*, 2000). Como medios de selección para evaluar la capacidad ligninolítica, clásicamente se empleaba el ácido tánico (Bavendamm, 1928) o la alcalilignina (Sundman y Näse, 1971), que en los últimos años han sido desplazados por colorantes sintéticos como el azul de ramazol o el Poly R 478 (Gold *et al.*, 1988). Como cabría esperar, debido a la preselección bibliográfica, la mayoría de los hongos tuvieron un resultado positivo. Sobre algunas cepas que no mostraron decoloración, se han encontrado trabajos donde otras cepas de la misma especie si la producen. Por ejemplo Eichlerová *et al.* (2005) encuentran decoloración del azul de ramazol en *D. squalens* y *P. chryso sporium*. Estas diferencias pueden atribuirse a la distinta capacidad ligninolítica en diferentes condiciones de cultivo, y a la variabilidad entre cepas de la misma especie, y ratifican la importancia de comprobar la eficiencia de nuevas cepas. Dicha variabilidad se confirma en el trabajo de Kiiskinen *et al.* (2005), que al estudiar dos cepas de *Mucor circinelloides* encuentra que una es capaz de degradar el azul de ramazol y la otra no. Estas diferencias dentro de una misma especie son también posibles cuando se estudia la capacidad del microorganismo

para producir una enzima en un determinado medio. Así, Tortella *et al.* (2008) encuentran que de dos cepas de *Neoclitocybe bisiseda*, una oxida ABTS (actividad lacasa) y otra no. Esto por ejemplo, junto con las diferencias en las condiciones de cultivo, explicaría por qué sus cepas de *S. comune* son capaces de oxidar ABTS y la aquí estudiada no lo es.

En muchos de los trabajos consultados, tras la primera selección en placa, sobre las cepas seleccionadas se evalúa cuantitativamente la producción de enzimas ligninolíticas en fermentaciones realizadas en medio líquido o sobre madera. En este caso también es frecuente evaluar las modificaciones producidas por el microorganismo a los componentes de la madera. En este trabajo, dicha tarea se ha sustituido por la evaluación directa de la capacidad de los hongos mediante experimentos de biopasteado que confirmarían, sin ningún tipo de duda, que la capacidad ligninolítica detectada, o la capacidad para producir enzimas ligninolíticas, guardan relación con cambios en la madera que facilitan su pasteado.

1.2. Selección mediante biopasteado

1.2.1. Variación del consumo de energía

Tal y como se ha comentado en los objetivos, en el presente trabajo se pretende realizar la selección del microorganismo mediante su aptitud directa para la reducción del consumo de energía en el pasteado mecánico, así como para la mejora de las propiedades de las pastas producidas.

Con los diez hongos preseleccionados en el apartado anterior se realizaron fermentaciones en estado sólido, utilizando el equipo descrito en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos, y se obtuvieron pastas mecánicas que fueron posteriormente caracterizadas. Se analizaron químicamente las astillas tras la fermentación así como las enzimas producidas por los hongos, para tratar de correlacionar las variaciones encontradas en las características de las pastas con los efectos de la fermentación sobre las astillas de partida.

La medida del consumo de energía en la elaboración de pasta mecánica en el laboratorio resulta compleja. Los desfibradores de laboratorio utilizan motores de alta potencia, con un elevado consumo en vacío, que pueden enmascarar pequeñas variaciones en el consumo energético entre las diferentes muestras. Además, la alimentación de astillas al equipo no es homogénea, por lo que el consumo de energía presenta numerosas oscilaciones. En algunos trabajos la energía consumida se estima

con un vatímetro (Sabharwal *et al.*, 1994, 1995). La determinación de la energía consumida así medida es siempre un valor aproximado ya que hay que estimar la potencia media a partir de las potencias instantáneas indicadas por el vatímetro. Esta ambigüedad se solventa en muchos estudios empleando un vatímetro que incorpora integración de medidas (Akhtar *et al.*, 1992, 1993, Akhtar, 1994, Kashino *et al.*, 1993, Leatham, *et al.*, 1990), lo que permite conocer el consumo total de energía en el desfibrado.

El sistema de análisis de energía empleado en este trabajo, y diseñado en los laboratorios de Celulosa y Papel de INIA para este fin (Carbajo *et al.*, 2003, 2004), además de calcular el consumo total, permite discriminar la energía activa y reactiva, el consumo en vacío y, en general, apreciar cualquier otra incidencia que se produzca durante el proceso. La energía activa indica con más precisión la energía absorbida por las astillas para ser desfibradas, eliminando otras variaciones dependientes del funcionamiento de la propia máquina. De este modo podemos evaluar mejor la eficacia del tratamiento fúngico.

El programa diseñado específicamente para estas medidas registra los datos de potencia instantánea y, posteriormente, los muestra en forma de gráfica. Además, tras descontar el consumo en vacío, integra las curvas de potencia y calcula el consumo (figura 18). Puede observarse que las variaciones en la curva de potencia activa son más acusadas que en la de potencia aparente.

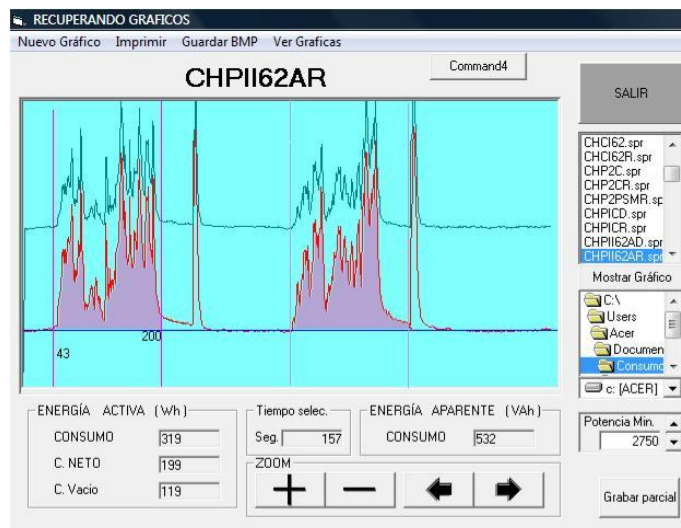


Figura 18.-Registro de datos de consumo de energía.

A continuación se presentan los datos de diferencias de consumo de energía, con referencia al control abiótico, para las astillas tratadas con los diez hongos seleccionados. Cada tanda de ensayos se realizó con un control abiótico y se presentan los datos de forma porcentual respecto al correspondiente control, para descontar la influencia de pequeñas variaciones ocasionadas por el ajuste del equipo en cada lote. Dentro de la misma muestra, las variaciones que se obtienen entre cada una de las dos porciones en las que ésta se divide no superan el 5 %.

La figura 19 muestra las diferencias porcentuales de consumo en la etapa de desfibrado, donde los ahorros con respecto al control se expresan con valores positivos y los aumentos del consumo de energía con valores negativos.

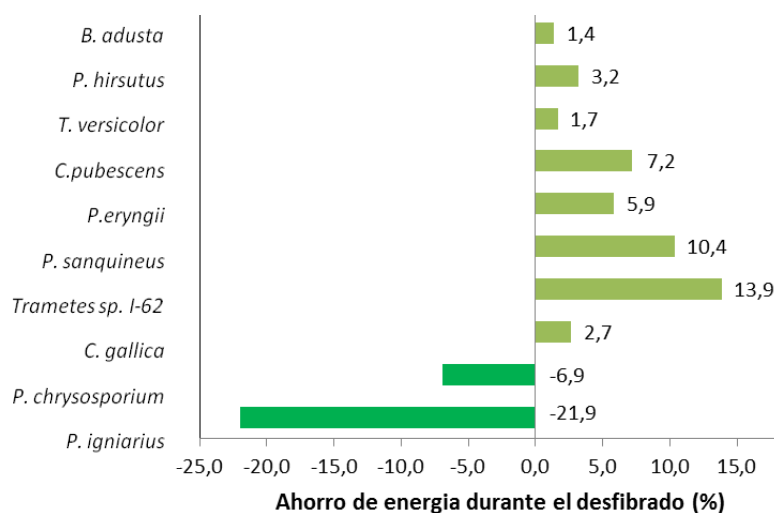


Figura 19.-Evaluación del ahorro de energía en la etapa de desfibrado.

Se observa que algunos hongos (*P. sanguineus* y *Trametes* sp. I-62) producen ahorros de más del 10 %, mientras que *P. chrysosporium* y *P. igniarius* gastaron más energía que el control abiótico. Tras la etapa de desfibrado se procedió a refinar la pasta aproximando los discos del refinador sin realizar ningún análisis intermedio, ya que se decidió evaluar la calidad de la pasta tras el tratamiento conjunto desfibrado-refino.

Durante el refinado, todas las pastas procedentes de maderas biotratadas presentaron un ahorro energético (figura 20). Resulta especialmente curioso el caso de *P. igniarius* que en la etapa de desfibrado había tenido un consumo notablemente superior al del control y ahora presenta un importante ahorro. Esto puede ser debido a que parte del refinado se ha producido durante la primera etapa, con el consecuente aumento del consumo energético en la primera etapa y ahorro en la segunda.

El resto de hongos que presentaron un ahorro importante de energía son *P. sanguineus* y *Trametes* sp. I-62.

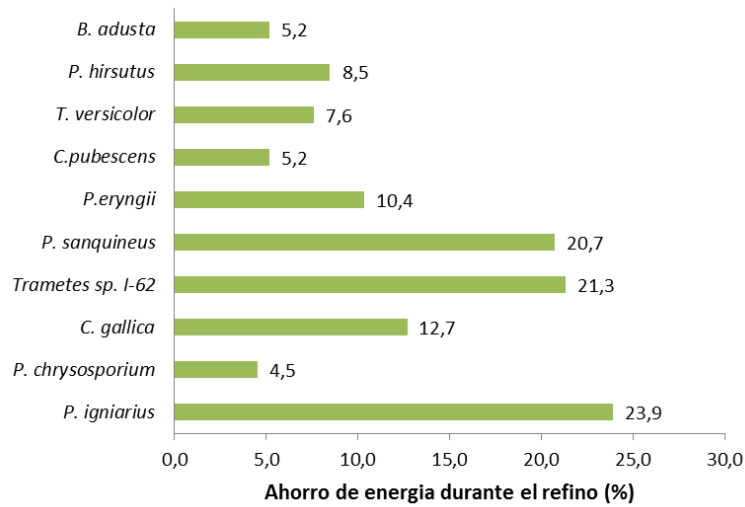


Figura 20.-Ahorro de energía en la etapa de refino.

En esta etapa los ahorros porcentuales son mayores, aunque el consumo de energía en esta etapa es menor. En la etapa de desfibrado los consumos de energía son del orden de 2000-2500 Wh/Kg mientras que en el refino estos valores se sitúan en 1000-1500 Wh/kg. Esto hace que los ahorros en la etapa de refino tengan menos repercusión en el ahorro energético global mostrado en la figura 21.

Se muestra en esta figura que los hongos que produjeron un mayor ahorro de energía fueron *P. sanguineus* y *Trametes* sp. I-62, superando el 10%. *C. pubescens* que también mostraba un ahorro energético importante tanto en la etapa de refino, como en la etapa de desfibrado, ahorra menos energía, su ahorro global se sitúa en torno al 7%.

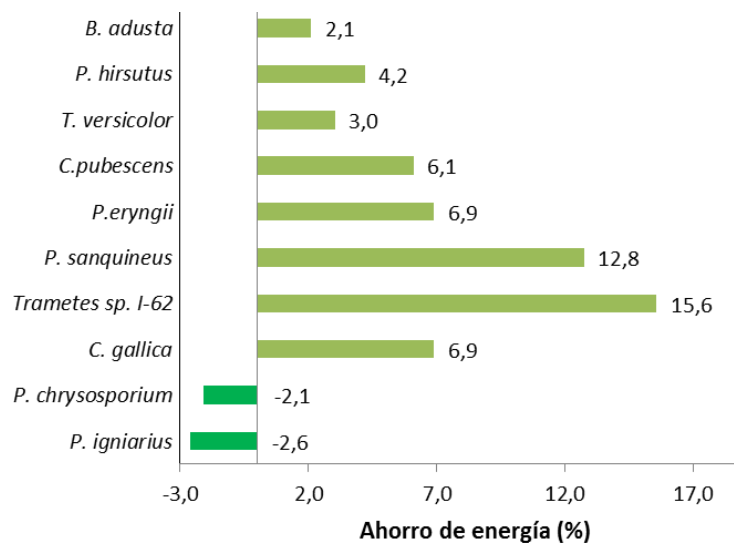


Figura 21.- Ahorro total de energía en el pastado.

Es difícil establecer comparaciones sobre consumos de energía con otros trabajos publicados, ya que las metodologías empleadas son muy diversas, tanto en las condiciones de fermentación como en las de pasteado, y estos parámetros tienen una clara influencia. Akthar *et al.*, (1993), empleando un reactor similar y tratando astillas de *Pinus taeda* consiguen ahorros entre un 7 y un 35%. Ellos congelan las astillas para facilitar el crecimiento del hongo, lo que puede desestructurarlas, y realizan diferente número de etapas de refinado con cada muestra hasta conseguir un mismo grado de refinado, lo que permite aumentar las diferencias en consumo de energía respecto al control. En el presente trabajo se ha realizado siempre una etapa de desfibrado y una de refinado para ver el efecto del microorganismo sobre pastas producidas del mismo modo. Leatham *et al.* (1990) utilizan reactores estáticos y agitados. Observan que, en experimentos sobre madera de álamo, *P. chrysosporium* produce un ahorro de energía 4 veces superior si se incubaba en agitación con respecto al obtenido si se incubaba en estático, mientras que *D. squalens* tiene un comportamiento opuesto. Logran importantes ahorros de energía, en torno al 40% en algunos casos, pero su control son astillas que no han sido autoclavadas, por lo que no tienen en cuenta el posible efecto de este proceso sobre el pasteado. En un trabajo realizado en planta piloto con astillas de eucalipto fermentadas durante 60 días con *C. subvermispora* (Ferraz *et al.*, 2008), se lograron ahorros de energía de un 18%. El ahorro se obtuvo fundamentalmente en la etapa de desfibrado. Este dato es significativo por obtenerse en unas condiciones más cercanas a las industriales, aunque no hemos de olvidar que realizan la fermentación durante 60 días, lo que podría dificultar su implementación.

1.2.2. *Modificaciones producidas por los hongos sobre las astillas*

El disminuir el consumo de energía manteniendo o mejorando la calidad de las pastas es el principal objetivo de este trabajo. No obstante, resulta interesante tratar de correlacionar dichas variaciones en consumo y propiedades con los efectos de los hongos sobre las astillas. Para ello se procedió, antes del pasteado, a evaluar la intensidad del crecimiento de los microorganismos determinando las pérdidas de peso en la madera causadas por la fermentación. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 22. Se puede observar que hay dos grupos bien definidos, uno formado por *T. versicolor*, *C. pubescens*, *P. sanguineus*, *Trametes* sp. I-62 y *P. igniarius*, con pérdidas superiores al 2,5 % y los hongos restantes con valores inferiores. Estos valores son concordantes por los encontrados por otros autores, aunque por la diversa metodología

empleada y la variación debida a las cepas, los datos reportados presentan siempre gran variación. Trabajando con madera de *Pinus radiata*, Ferraz *et al.* (2001) encuentran variaciones de pérdida de peso entre 0,4 y 7,7% a los 30 días de incubación, obteniendo el máximo valor con *Trametes versicolor*. Por otro lado, Leathman *et al.* (1990), con madera de álamo temblón, encuentran que *T. versicolor* presenta bajas pérdidas de peso, mientras que *P. chrysosporium* es el hongo con mayor degradación. Estas diferencias ponen una vez más de manifiesto la variabilidad de resultados según la cepa fúngica y la madera con la que se trabaje.

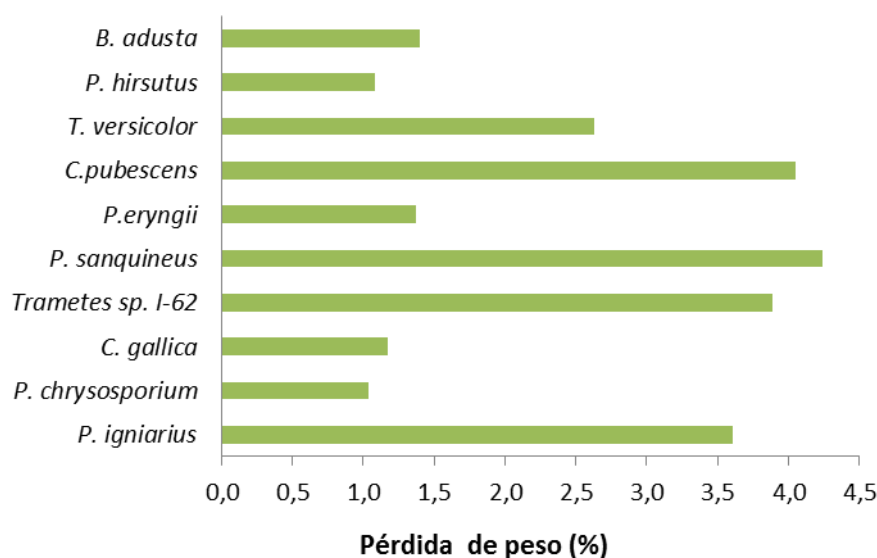


Figura 22.-Pérdida de peso durante la fermentación.

Un dato de una alta pérdida de peso indica un buen crecimiento del microorganismo. Si el ataque a la madera ha sido además selectivo, podría augurar un buen resultado en un posterior biopasteado, aunque no hemos de olvidar que conlleva una pérdida en el rendimiento global del proceso. Además, aunque el proceso sea selectivo, siempre se va a producir una degradación de la celulosa que puede acarrear una pérdida de propiedades mecánicas. Por lo tanto, junto con los datos de pérdida de peso es necesario conocer la variación en la composición química de la madera degradada, para así poder determinar la selectividad del ataque fúngico. Para ello se realizó un análisis químico de la madera en el que se determinaron sus distintos componentes. En la tabla VI se presentan los resultados del análisis químico de la madera original.

Componente	Cantidad (%)
Extractos en acetona	0,74
Extractos en agua caliente	3,54
Lignina	25,42
Holocelulosa	71,23
Pentosanos	8,27

Tabla VI.-Análisis de la madera utilizada en el estudio.

Los datos son coherentes con los encontrados en la bibliografía para esta especie. Ferraz *et al.* (2000) encuentran un valor de lignina de 27,5%. Macorra (2004) obtiene un valor de 26,2%. El resto de los datos se presentan como variaciones respecto a la muestra original. En la figura 23 se muestra la variación del contenido en extraíbles de las astillas tras la fermentación con los diferentes hongos.

Muchos de los microorganismos estudiados produjeron la disminución en el contenido de extraíbles en acetona, lo que puede atribuirse a una degradación preferente de estos compuestos. Entre los posibles compuestos que se extraen están ceras, grasas y resinas. Su degradación puede atribuirse a la facilidad del hongo para acceder a ellos, ya que muchas veces se encuentran en lugares de fácil acceso, situados entre distintas fibras, por ejemplo en los canales resiníferos donde se acumulan resinas. Cuando se produce un aumento, éste puede ser debido a un incremento relativo, por degradación preferente de otros compuestos o a que, por ataques a la lignina se liberen fragmentos de esta que, mediante las modificaciones que sufren en el ataque enzimático, puedan ser solubles en el solvente.

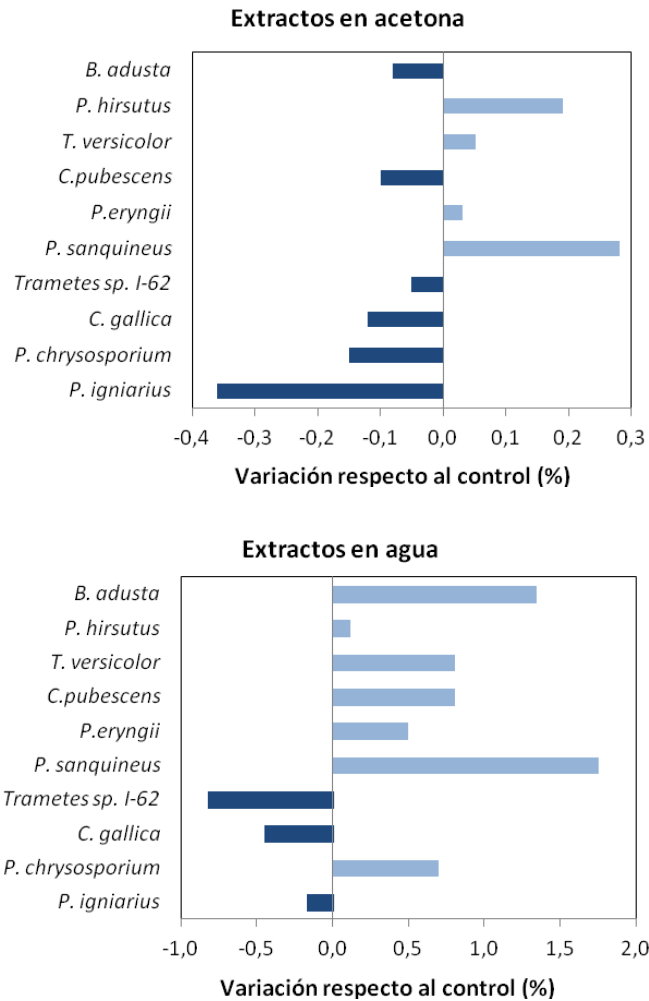


Figura 23.-Variación del contenido en extraíbles en acetona y agua caliente en la madera tras la fermentación con los diferentes hongos durante 30 días.

En el caso de los extraíbles en agua caliente, las variaciones son más notables, ya que la madera presenta un mayor contenido en estos componentes, descritos principalmente como taninos y azúcares de bajo peso molecular. La mayoría de los microorganismos provocan un aumento de los extraíbles, posiblemente por hidrólisis de la celulosa que puede ser ahora extraída al haber disminuido su peso molecular. Este efecto es especialmente marcado en el caso de *P. sanguineus*, que también mostraba un incremento notable para los extractos en acetona. Este hongo presenta uno de los mayores ahorros de energía durante el pastado. *Trametes sp. I-62*, el otro microorganismo que presentaba altos ahorros, tiene un comportamiento muy diferente, con pequeñas disminuciones de ambos tipos de extractos. Esto puede atribuirse a que ambos microorganismos presenten diferentes vías de degradación de la madera, ya que

está descrito que las vías de degradación de la lignocelulosa no son las mismas para todos los microorganismos (Leonowicz *et al.*, 1999).

El estudio se ha hecho a un solo tiempo, y esto impide analizar cómo evoluciona el contenido en extractos con el tiempo, ya que es fácil que coexista la degradación de los extraíbles presentes originalmente en la madera con la generación por los hongos de compuestos extraíbles procedentes de la degradación de los componentes mayoritarios (lignina y celulosa y hemicelulosa). Estos dos hechos pueden darse a distinta velocidad y el momento analizado puede representar un estadio diferente para cada microorganismo.

Las variaciones encontradas en el contenido en lignina, holocelulosa y pentosanos se muestran en la figura 24. Se observa que *P. hirsutus*, *T. versicolor*, *P. eryngii*, y en menor medida *Trametes* sp. I-62, causan un incremento relativo en el contenido de lignina, lo que puede resultar sorprendente siendo muchos de ellos hongos ampliamente descritos como de podredumbre blanca. Al analizar los datos de holocelulosa, vemos que todos ellos, con la excepción de *P. eryngii* y *B. adusta* presentan incrementos de los polisacáridos superiores a los de lignina, es decir, han degradado preferencialmente la lignina. En cualquier caso, lo que es importante señalar es que las variaciones encontradas para la lignina son pequeñas (inferiores a 1,2%) lo que indica que la deslignificación no ha sido extensiva.

En el caso de la holocelulosa las variaciones son algo mayores, pero no hemos de olvidar que este componente supone cerca del 75% del peso de la madera, por lo que, si relativizamos el dato tampoco se puede decir que se hayan producidos grandes variaciones. Lo que sí resulta más significativo es que, aunque no sea muy marcada, en todos los casos se observa una disminución del contenido en pentosanos. Esto puede atribuirse a la mayor accesibilidad de los microorganismos a la hemicelulosa, por su situación más externa en la fibra y su menor grado de cristalinidad, o a la mayor facilidad para hidrolizar sus enlaces.

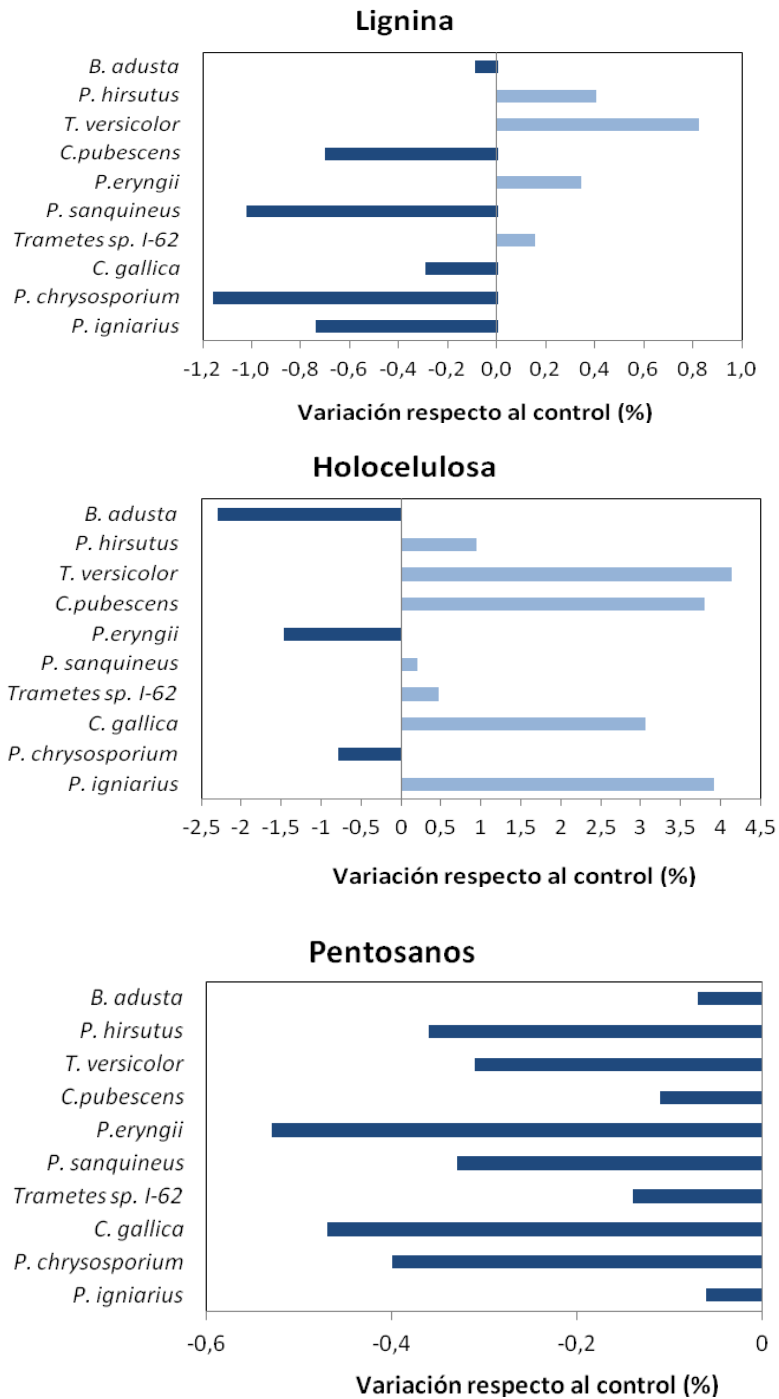


Figura 24.-Variación del contenido lignina, holocelulosa y pentosanos en la madera de *P. radiata* tras la fermentación fúngica.

Si bien interesa que la deslignificación sea lo más selectiva posible, no interesa una degradación muy extendida, ya que ello conllevaría importantes pérdidas de rendimiento en el proceso global. Sin embargo, está descrito (Leonowicz *et al.*, 1999) que en la biodegradación de la lignocelulosa se producen muchos cambios antes de la despolimerización, como desmetilaciones y reacciones rédox. Estos cambios pueden

afectar al comportamiento de la madera en su desfibrado, ya que se han afectado las estructuras de los polímeros, pero no conllevan variaciones sustanciales en las proporciones de lignina y holocelulosa en la madera. Además, todas estas modificaciones de la lignocelulosa son de especial interés de cara a un futuro pasteado mecánico, ya que por ejemplo, si la lignina se oxida aumentando su hidrofilia, o disminuye su peso molecular, ésto conllevará cambios en el pasteado, posiblemente con reducciones en el consumo de energía y mejoras en la calidad de las pastas. Por ello se decidió realizar un estudio mediante espectroscopia de infrarrojo de las maderas biotratadas para intentar identificar modificaciones estructurales producidas por el crecimiento fúngico. Se muestra un ejemplo de un espectro (pino control, sin fermentación) en la figura 25.

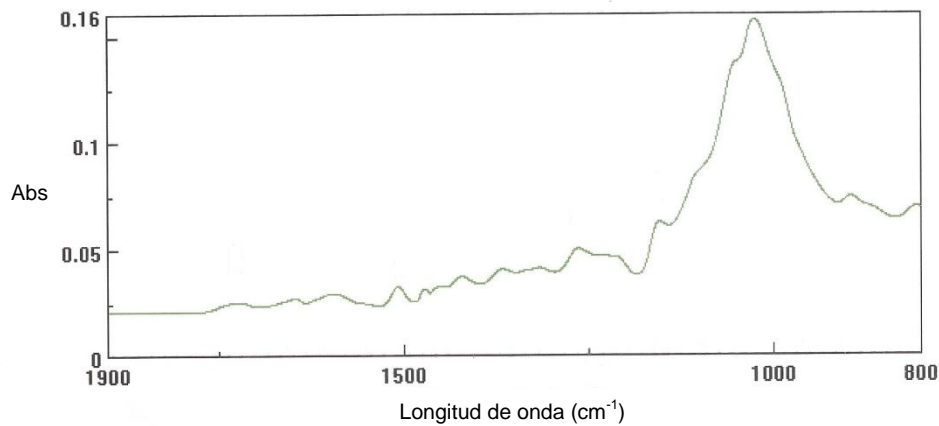


Figura 25.-Espectro de FTIR obtenido de una muestra de *P. radiata* control.

En el análisis FTIR, para poder hacer un estudio cuantitativo, las señales de interés se dividieron entre la señal a 1510 cm^{-1} , que para materiales lignocelulósicos se considera constante (Dorado *et al.*, 2001). Se analizaron las bandas de 1650 y 1540 cm^{-1} correspondientes a los enlaces amida, atribuyéndolos a la presencia de proteínas de origen fúngico, ya que todas las muestras presentaron un aumento respecto a la madera control (figura 26).

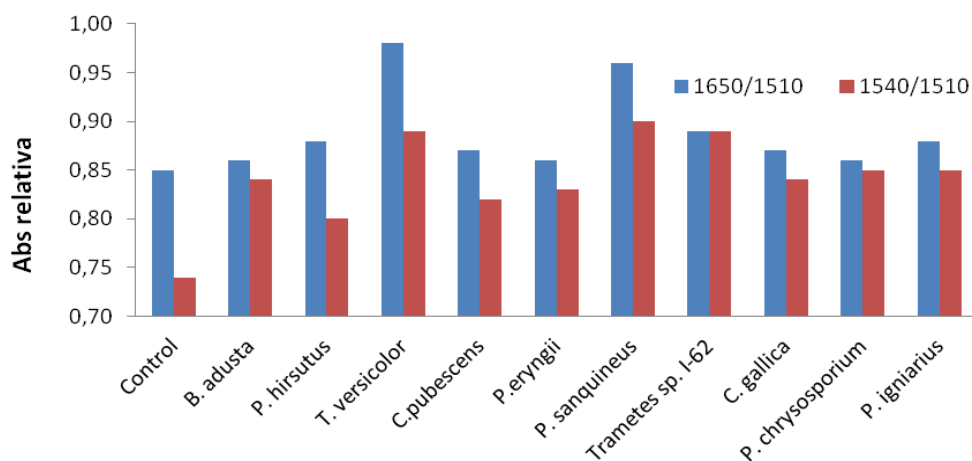


Figura 26.-Relación entre las bandas 1650 cm⁻¹ y 1540 cm⁻¹ (amidas) y 1510 cm⁻¹.

Si bien no se observa una correlación directa con la pérdida de peso observada en la figura 22, sí que se puede concluir que *T. versicolor*, *P. sanguineus* y *Trametes* sp. I-62, los hongos cuya fermentación presenta un mayor contenido proteico, son también de los que mayores pérdidas de peso presentan.

La banda que mostró un mayor interés fue la de 1720 cm⁻¹, que se atribuye a grupos carboxilo y se relaciona con un aumento de la oxidación de la lignina (Dorado *et al.*, 2001, Ke *et al.*, 2011). Se representa en la figura 27, donde de nuevo *T. versicolor*, *P. sanguineus* y *Trametes* sp. I-62 son los hongos que producen una variación de la señal más intensa. Dado que los hongos han sido preseleccionados por su capacidad ligninolítica, parece lógico esperar que aquellos que presenten un mayor crecimiento en las condiciones de cultivo ensayadas sean los que provoquen una mayor deslignificación.

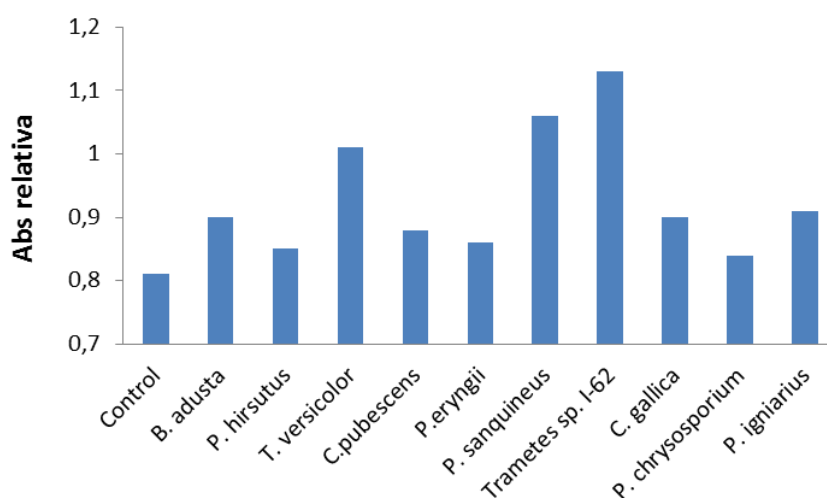


Figura 27.-Relación entre las bandas 1720 cm⁻¹ y 1510 cm⁻¹.

1.2.3. Análisis de las enzimas producidas por los hongos

Con el objeto de tratar de conocer qué enzimas fúngicas estaban causando las modificaciones sobre la madera, ésta se extrajo previamente al pasteado, y sobre los extractos se determinaron las actividades lignocelulolíticas. Con excepción de la lacasa no se encontraron datos de actividad para otras enzimas, obteniéndose en muchas ocasiones mediciones “sucias”, con mucha diferencia entre duplicados, y con variaciones no lineales de la concentración de sustrato o producto. Esto se atribuye principalmente a que las sustancias de la madera que se extraen conjuntamente con las enzimas interfieren en muchos de los ensayos enzimáticos. Además, para la lacasa se obtenían datos muy bajos de actividad, posiblemente por la dilución causada por la cantidad de tampón necesaria para extraer las astillas. Para tratar de minimizar estos problemas se procedió a concentrar las muestras y a dializarlas posteriormente, pero se comprobó que para el caso de la lacasa se perdía mucha actividad en el proceso, no resultando ser un procedimiento adecuado para cuantificar la actividad.

1.2.4. Análisis de la calidad de las pastas

Las pastas producidas con las astillas fermentadas por los diez microorganismos seleccionados y las astillas control (sometidas al mismo proceso pero donde el inóculo se sustituyó por agua destilada), se evaluaron en función de las características descritas en Materiales y Métodos (Apartado 6.2). Asimismo, se elaboraron hojas de ensayo y se caracterizaron (Apartado 6.3 de Materiales y Métodos).

En la figura 28 se muestran los resultados de la clasificación en Bauer-McNett. Este ensayo clasifica las fibras por su tamaño al hacerlas pasar a través de una cascada de tamices de luz cada vez más pequeña. De este modo las fracciones superiores corresponderán a fibras enteras y aglomerados de fibras, y las últimas a fibras rotas y pequeños restos comúnmente denominados finos.

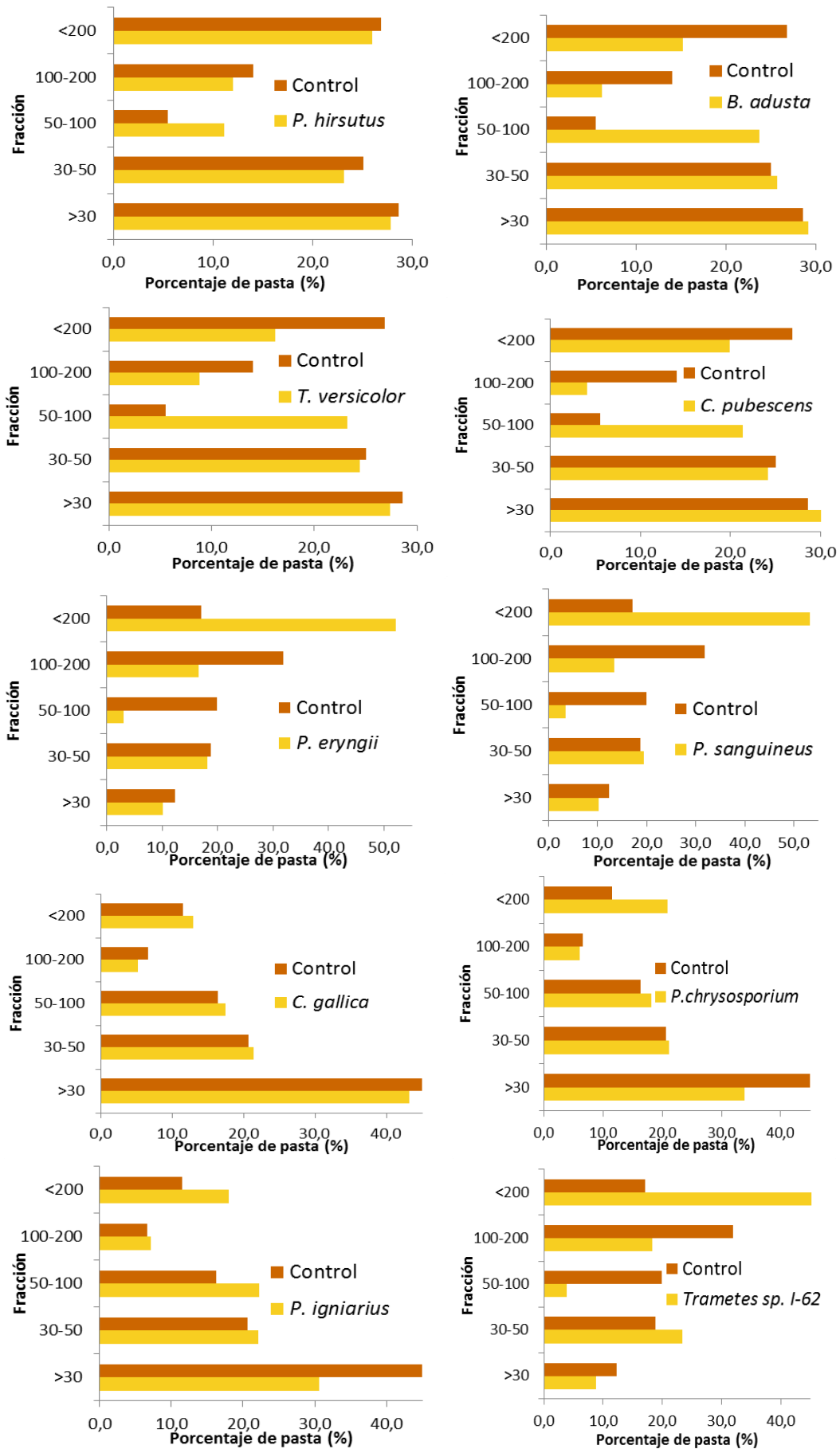


Figura 28.-Clasificación Bauer-McNett de las pastas.

Como se ha explicado antes para el consumo de energía, los distintos controles realizados en diferentes días presentan importantes diferencias, posiblemente debidas a las pequeñas variaciones en el pasteado. Por lo tanto, cada muestra se compara con un control realizado en la misma tanda de ensayos, dentro de la cual las variaciones aleatorias se minimizan. Debido a estas diferencias es difícil comparar los datos de distintos hongos en términos absolutos. No obstante, se ha observado una pauta común: en casi todos los casos, el tratamiento hizo que disminuyera la fracción de mayor tamaño ($F > 30$), que se atribuye a los agregados de fibras, indicando que el desfibrado ha sido más eficaz cuando la madera ha sido biotratada. Los únicos hongos que no producen este efecto son *C. pubescens* y *B. adusta* en la que esta fracción aumenta ligeramente. Esta disminución se correlaciona con un aumento en las fracciones de menor tamaño, aunque la fracción aumentada no es la misma en todos los casos. Además, varios de los hongos que han producido un ahorro notable de energía (*Trametes* sp. I-62, *P. sanguineus*, *P. eryngii*) provocan un aumento importante en los “finos” o fibras más degradadas ($F < 200$), indicando que posiblemente, para estos casos, donde la madera debe haber sido más desestructurada por los microorganismos, las condiciones de pasteado pueden haber sido demasiado severas.

Un comportamiento heterogéneo nos podría indicar que dependiendo del microorganismo estudiado el ataque la madera no sigue el mismo comportamiento. Esto es coherente con las revisiones (Leonowicz *et al.*, 1999; Pointing, 2001) que indican que distintos hongos poseen diferentes enzimas y las expresan de modo diferencial, lo que ha de provocar distintas maneras de degradar la madera y pone una vez más de manifiesto la importancia de realizar la selección de microorganismos para el biopasteado por parámetros pasteros y no por sus características enzimáticas, ya que no parece posible encontrar una correlación unívoca. Myers *et al.* (1988) trabajando con *P. chrysosporium* y *D. squalens*, encuentran un comportamiento muy diferente de los dos microorganismos. *P. chrysosporium* tiene un efecto poco marcado en las fracciones del Bauer-McNett, mientras que *D. squalens* provoca principalmente la disminución de las fracciones de menor tamaño y el aumento de las de mayor. No se pueden comparar sus datos con los aquí obtenidos ya que, junto a otras diferencias metodológicas, ellos refinan las pastas con hasta siete pasos a través del refinador para aumentar el grado de refinado, lo que modifica notablemente el tamaño de las fibras, pero nos indica la variación existente entre diferentes microorganismos.

El tamiz Sommerville es un tamiz analítico, empleado para evaluar la calidad del desfibrado. Consta de ranuras de 0,15 mm de espesor, que la pasta bien desfibrada es capaz de atravesar, pero no así los grandes agregados de fibras que no se han individualizado adecuadamente. En el ensayo, la pasta aceptada se elimina y se conservan los rechazos, para poderlos cuantificar por pesada. Este ensayo de rechazos Somerville muestra pequeñas variaciones entre el control y las muestras tratadas. Las muestras control presentan valores en torno a 1,8-2,5 %, mientras que los de las muestras tratadas no se alejan más allá de 1,5-2,7 %, de donde se deduce que el biotratamiento no provoca diferencias capaces de ser detectadas por este ensayo.

Se realizaron tinciones de las pastas con el reactivo de Herzberg y se observaron al microscopio (figura 29). Este reactivo tiñe las fibras de un color amarillento en presencia de lignina, como es el caso aquí presente, Si la cantidad de lignina fuera pequeña (como ocurre en las pastas químicas) las fibras tomarían un color azulado. El que no se observe un azulado en la coloración ratifica que la deslignificación no ha sido extensiva. En lo que sí se observan diferencias es en el estado de las fibras. En las muestras control el desfibrado en muchos casos no es completo siendo muy frecuente observar “paquetes” de fibras sin terminar de separar. En pastas procedentes de astillas biotratadas, si bien se siguen encontrando paquetes, éstos son menos frecuentes. Dicho efecto parece ser más acusado en el caso de *Trametes* sp. I-62, *P. sanguineus*, *P. eryngii*, y *C. pubescens*, aunque resulta complejo cuantificarlo pues depende mucho de la zona observada. También se observó en algunos casos un aumento de la producción de finos y de la fibrilación de las fibras, resultado muchas veces (*Trametes* sp. I-62, *P. sanguineus*, *P. eryngii*) coincidente con lo que se acaba de comentar para el ensayo Bauer-McNett.

Si bien la información que aporta la microscopía de fibras es en parte subjetiva y difícil de cuantificar, tiene la ventaja de obtenerse rápidamente, lo que permite una evaluación a primera vista del proceso de pasteado. Además, si se analiza la preparación en detalle permite diferenciar entre los microorganismos que provocan un efecto notable y los que no, observándose una alta correlación con el consumo de energía. Los microorganismos citados anteriormente (*Trametes* sp. I-62, *P. sanguineus*, *P. eryngii*, y *C. pubescens*) son 4 de los 5 hongos que más ahorro de energía producen (figura 21).

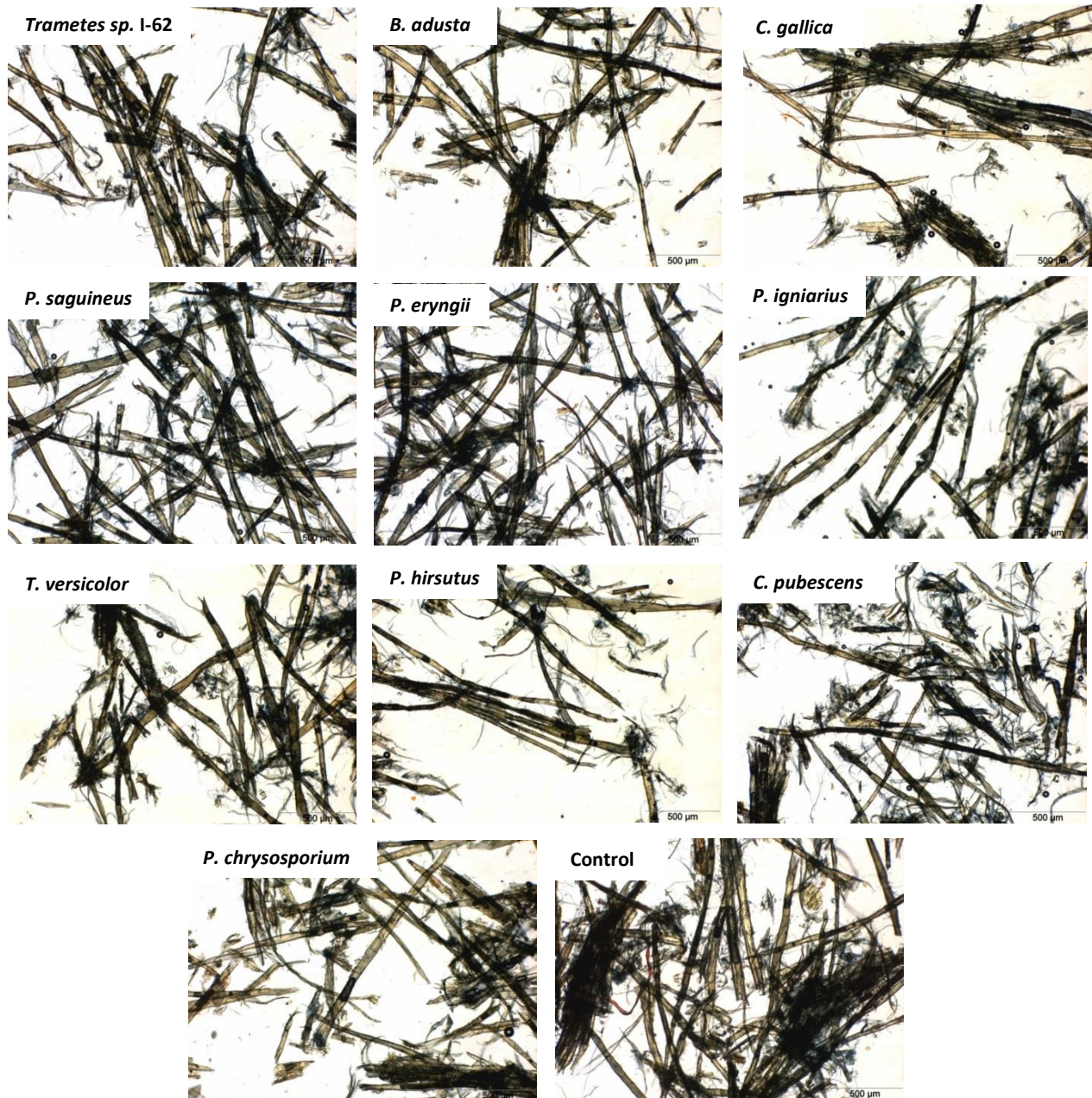


Figura 29.-Microfotografías de las pastas tras su tinción con el reactivo de Herzberg.

La formación de hojas de ensayo y determinación de sus propiedades dio los resultados mostrados en la tabla VII. Dado que en este caso hay pocas diferencias entre las muestras, se presenta la media de las pastas control y los valores encontrados para las hojas formadas con las pastas de los tratamientos con los diferentes microorganismos. Junto con los datos de las propiedades de las hojas se incluye el grado de refino obtenido en cada pasta. Las propiedades papeleras varían con el grado de refino, por lo que este parámetro es importante a la hora de comparar los valores obtenidos en las diferentes muestras y no debe variar en exceso si se pretende que la comparación entre las distintas pastas tenga sentido. Las propiedades físico-mecánicas

de las hojas guardan relación con la integridad de las fibras y con la calidad de las uniones fibra-fibra y estos parámetros se relacionan a su vez con la eficacia del desfibrado.

No se aprecian diferencias importantes entre las distintas hojas. Esto es coherente con las bajas pérdidas de peso encontradas y las pequeñas diferencias que aparecen en los análisis químicos. Indica que el biopasteado no produce una mejora notable de la calidad de las pastas, pero tampoco un detrimento. Por ejemplo, el peso específico es una característica que en la pasta mecánica presenta valores bajos, por la poca flexibilidad que tienen las fibras ya que al contener toda la lignina son rígidas y poco moldeables. Si la deslignificación hubiera sido extensiva y como consecuencia de esto las fibras fueran más flexibles, se habría observado un incremento en este valor, que sin embargo permanece constante. Si observamos los datos de longitud de rotura vemos que *P. sanguineus* y *Trametes* sp. I-62, que son los hongos que logran un mayor ahorro de energía, producen un ligero incremento. La longitud de rotura se considera que depende principalmente de las uniones fibra-fibra y por ello se desarrolla notablemente durante el refino (Smook, 1990). En cambio, el índice de desgarramiento disminuye con estos dos hongos y con casi todos. Esta resistencia se atribuye mayoritariamente a la integridad de las fibras y no a la unión entre ellas (Higham, 1968), por lo que el biotratamiento no podrá mejorarla, sino que pequeñas degradaciones de las fibras provocan un ligero descenso.

No obstante, hay algunos datos de los que se pueden extraer conclusiones interesantes. Por ejemplo, en los datos de blancura, con excepción de las pastas obtenidas por el tratamiento con *B. adusta*, se observa una pequeña caída. Estos datos coinciden con los descritos en otros trabajos (Akthar *et al.*, 1993, Kashino *et al.*, 1993). Esta caída puede atribuirse a las oxidaciones producidas por el microorganismo en la lignina, como se ha visto en la figura 26, lo que es coherente con que algunos autores encuentren que tras una etapa de blanqueo con peróxido de hidrógeno, las pastas tratadas superen en blancura a las control (Myers *et al.*, 1988, Kashino *et al.*, 1993), ya que si la lignina ha quedado parcialmente oxidada, puede incrementar su color, pero ser eliminada más eficazmente tras un blanqueo oxidativo con H₂O₂.

Hongo	Control	<i>B. adusta</i>	<i>P.hirsutus</i>	<i>T versicolor</i>	<i>C. pubescens</i>	<i>P. eryngii</i>	<i>P. sanguineus</i>	<i>Trametes</i> sp. I-62	<i>C. gallica</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. igniarius</i>
Refino (°SR)	47	42	48	43	51	37	43	46	37	52	43
Gramaje (g/m ²)	90,8	89,4	91,1	101,2	89,9	95,1	92,3	90,5	91,2	93,8	90,8
Espesor (mm)	0,354	0,351	0,335	0,376	0,316	0,350	0,362	0,352	0,386	0,359	0,349
Peso específico (g/cm ³)	0,257	0,254	0,272	0,269	0,285	0,272	0,255	0,257	0,236	0,261	0,260
Longitud rotura (m)	1340	1137	1249	1154	1539	836	1415	1384	827	1622	1422
Alargamiento (%)	1,2	0,9	1,1	1,1	1,1	0,8	1,1	1,2	1,0	1,3	1,3
Índice desgarró (mNm ² /g)	4,0	3,5	3,4	3,4	4,3	3,0	3,4	3,4	3,6	3,7	3,1
Blancura D65 (%)	45,0	46,2	45,3	41,1	42,0	41,4	42,3	43,2	41,6	39,9	44,0
Opacidad (%)	99,0	98,8	99,9	99,9	99,2	98,3	98,9	99,1	96,0	97,8	97,3

Tabla VI.-Propiedades fisicomecánicas de las hojas de ensayo.

1.3. Selección de microorganismos

Como se puede observar en los resultados precedentes, la preselección en placa es un método adecuado para seleccionar cepas ligninolíticas cuando el número de microorganismos es elevado, pero no permite realizar una selección definitiva, ya que se trata de métodos cualitativos y no es fácil obtener de ellos información más precisa. No obstante son tremendamente útiles para remarcar las diferencias de comportamiento entre diferentes cepas de la misma especie, y para poner de manifiesto las diferencias que se encuentran bajo distintas condiciones de cultivo.

Con los experimentos de fermentación en fase sólida y posterior biopasteado no se observa una correlación clara entre todas las variables analizadas (ahorro de energía, composición química, propiedades pastero-papeleras). Esta falta de correlación también ha sido descrita por otros autores. Leathman *et al.* (1990), al estudiar 9 hongos sobre madera de *Populus tremuloides*, encuentran que no hay relación entre el ahorro energético en el pasteado y la pérdida de peso causada por el microorganismo. Relacionando ahorro energético frente al contenido en lignina y el índice de estallido, encuentran cierta correlación, aunque hay varios microorganismos que se alejan mucho de la misma.

El principal criterio seguido para realizar la selección ha sido el ahorro energético, ya que, según se ha expuesto en la introducción es uno de los mayores limitantes en la producción de pasta mecánica. El ahorro logrado es menor que el descrito en otros trabajos, pero cabe destacar que se ha alcanzado en condiciones más fácilmente extrapolables a la industria. En muchos casos se ensayan fermentaciones de hasta 90 días, mientras que las aquí ensayadas tienen una duración de 30. Además, las astillas no se suplementan con ningún medio de cultivo que facilite el crecimiento del microorganismo.

De acuerdo con el ahorro energético que han logrado, se han seleccionado *Trametes* sp. I-62 y *Pycnoporus sanguineus* para continuar el estudio. Además, se tiene en cuenta que estos hongos no causan pérdidas en las propiedades papeleras. Se seleccionan estos dos microorganismos porque, siendo los dos que más ahorro energético causan, presentan unas variaciones en la composición química muy diferentes. Mientras que *P. sanguineus* disminuye el contenido en lignina sin apenas variar el de holocelulosa, *Trametes* sp. I-62 provoca un ligero aumento en ambas cantidades.

2. ESTUDIO DE LOS EXTRAIBLES DE LA MADERA EN EL BIOPASTEADO

A continuación, el trabajo se va a centrar en el estudio de la influencia de los extraíbles de la madera en el biopasteado. Se plantea el interés de este estudio porque no está claro el modo en que estos compuestos pueden influir en el crecimiento de los microorganismos. A los taninos y otros polifenoles se les atribuyen propiedades antifúngicas (Scalbert, 1991). No obstante, Morita *et al.* (2001) describen cómo varios hongos aumentaron su crecimiento en presencia de extractos acuosos de corteza de pino radiata, ricos en polifenoles. Por otro lado, los estilbenos, otro grupo de compuestos fenólicos también de efecto protector, mostraron un comportamiento muy diverso (Celimene *et al.*, 1999). Por un lado, había diferencias importantes según el microorganismo estudiado, incluso comparando dos hongos de podredumbre blanca (*Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium*). Por otra parte, el comportamiento tampoco era el mismo al añadir el compuesto a placas Petri que al cultivar el microorganismo sobre madera. Estos antecedentes ponen de manifiesto que no es claro cuál va a ser el efecto de retirar estos componentes minoritarios de la madera sobre el crecimiento de los hongos en las condiciones ensayadas, ni cuál va a ser, por tanto, el efecto sobre la calidad de las pastas producidas posteriormente.

El estudio se divide en dos partes. En una primera parte se analiza el efecto de los componentes minoritarios sobre el crecimiento del hongo a diferentes tiempos, y en un segundo estudio se ensaya la calidad de las pastas producidas con madera extraída previamente a su fermentación. Todos los ensayos se llevan a cabo con *Trametes* sp. I-62 y con *Pycnoporus sanguineus*, microorganismos seleccionados en la etapa precedente. Para este primer estudio se fermentan pequeñas cantidades de astillas en fermentadores de columna (columna Raimbault), lo que permite emplear un gran número de fermentadores y obtener muestras a diferentes tiempos. En la segunda parte del estudio se emplean de nuevo para la fermentación los reactores ya utilizados en la etapa de selección de los microorganismos.

2.1. Estudio del crecimiento del microorganismo a diferentes tiempos

Como se acaba de comentar, los ensayos descritos a continuación se han llevado a cabo en reactores que permiten fermentar una cantidad de muestra reducida (15 g). Esto, unido a la alta humedad relativa, hace difícil determinar la pérdida de peso con precisión, por lo que para estimar el crecimiento del hongo se determinó el consumo de O₂. Las astillas fueron extraídas a tiempos de 6, 12, 18, 24 y 30 días de incubación y se

determinaron las actividades ligninolíticas presentes. Las astillas también se observaron al microscopio óptico y electrónico (de barrido) para evaluar el crecimiento del microorganismo.

2.1.1. Análisis del consumo de O₂

El consumo de O₂ se muestra en la figura 30. En la parte A se presenta el consumo acumulado de O₂ frente al tiempo de incubación. En ella se observa cómo, bajo las mismas condiciones de cultivo, *P. sanguineus* (PS) presenta siempre un mayor consumo que *Trametes* sp. I-62 (I62). Si se analiza el efecto que tiene la extracción de las astillas, este no es igual para los dos microorganismos estudiados. *P. sanguineus* presenta un mayor consumo de O₂ cuando se incuba sobre astillas extraídas con acetona, mientras que la fermentación sobre astillas extraídas con agua provoca un importante descenso en el consumo de O₂ respecto a la fermentación sobre astillas sin extraer. En el caso de *Trametes* sp. I-62, la incubación sobre astillas extraídas con acetona también aporta los mayores consumos de O₂, pero no se observan apenas diferencias entre fermentar el hongo sobre astillas extraídas con agua o sobre astillas no extraídas.

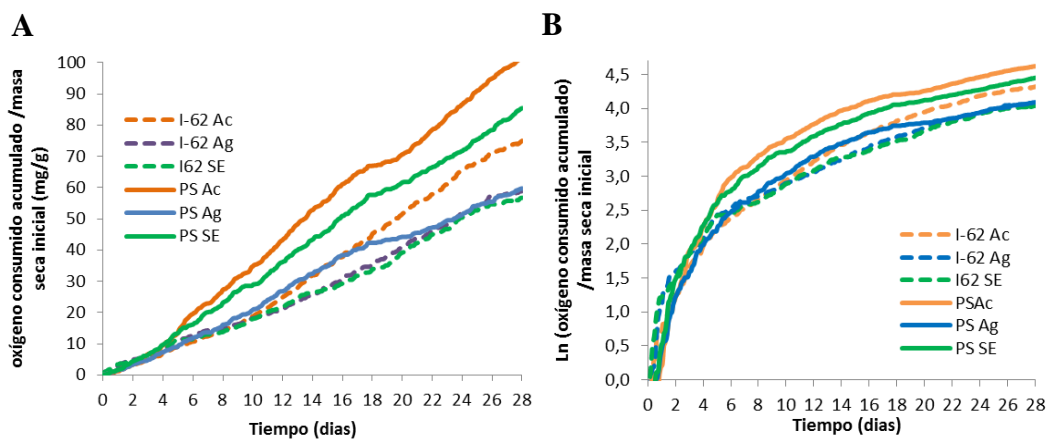


Figura 30.-Consumo de oxígeno vs. tiempo de fermentación (Ac:astillas extraídas con acetona; Ag: astillas extraídas con agua; SE: astillas sin extraer).

El mayor crecimiento en el caso de astillas extraídas con acetona puede atribuirse a dos factores, por un lado a la mayor accesibilidad de las hifas del hongo al interior de las astillas, por otro, al efecto inhibitor del crecimiento que pueden causar las sustancias que se han retirado con la extracción. Ya que hay notables diferencias entre la facilidad del hongo para crecer en astillas extraídas con agua o acetona, y en el caso del agua también hay diferencias entre los hongos, el efecto de las sustancias extraídas parece

claro. El carácter antimicrobiano de los compuestos extraíbles ha sido estudiado desde hace muchos años. Scheffer *et al.* (1944) estudiaban la relación entre los extractos en agua caliente de *Robinia pseudoacacia* y la resistencia de estos troncos al ataque por *Fomes rimosus*, encontrando una clara correlación. Rudman (1965) estudió cómo afectaban diversos compuestos fenólicos (flavonoides, isoflavonoides, antocianinas diterpenos fenólicos y otros) al crecimiento de *Coniophora olivacea* y *Lentinus lepideus*. Observó resultados muy distintos según el hongo estudiado, ya que *C. olivacea* se veía muy afectado por la mayoría de los compuestos estudiados mientras que el crecimiento de *L. lepideus* sólo se modificaba por un estilbeno, que curiosamente no afectaba al primer hongo. Por tanto, los resultados encontrados en este estudio en los que la eliminación de los extractos en agua caliente afectan al crecimiento de *P. sanguineus* pero no al de *Trametes* sp. I-62, tienen antecedentes bibliográficos con otras especies.

En la parte B de la figura se muestra el consumo de O₂ en escala logarítmica para poder apreciar mejor la evolución frente al tiempo. Se observa cómo la pendiente de la gráfica en los primeros 6 días es pronunciada, suavizándose a continuación aunque sin llegar a alcanzarse un estado estacionario. Esta pendiente es muy similar para todos los casos analizados, mostrando que los hongos se comportan de manera semejante y que no se ven afectados por la presencia o no de los extraíbles en su velocidad de crecimiento. Es decir, los extraíbles hacen que el hongo crezca en mayor o menor medida, pero no modifica su patrón temporal de crecimiento.

2.1.2. Estudio de enzimas ligninolíticas

Se han determinado las actividades ligninolíticas descritas en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos. Sólo se han encontrado niveles mensurables de actividad lacasa (tabla VII). Parece lógico que no se hayan encontrado otras enzimas ligninolíticas, pues además de las posibles interferencias descritas debidas a la presencia de los extraíbles de la madera, está descrito que los hongos del género *Pycnoporus* producen lacasa como principal enzima ligninolítica (Lomascolo *et al.*, 2011). Solamente se ha encontrado un trabajo (Liers *et al.*, 2011) en el que al cultivar *P. cinnabarinus* sobre madera de haya se detecta actividad manganeso peroxidasa. Para el *Trametes* sp. I-62 se describe asimismo la lacasa como su enzima ligninolítica predominante encontrándose en ciertos ensayos pequeños niveles de manganeso peroxidasa (Mansur *et al.*, 1997; Gonzalez *et al.*, 2000, 2008).

Hongo	Extracción de las astillas	Tiempo				
		6 días	12 días	18 días	24 días	30 días
<i>Trametes</i> sp. I-62	Acetona	--	0,2	6,4	--	--
	Agua	--	--	--	--	4,8
	Sin extraer	--	0,3	--	9,2	0,3
<i>P. sanguineus</i>	Acetona	--	0,1	0,2	5,4	1,3
	Agua	1,1	15,5	--	1,1	0,3
	Sin extraer	11,0	3,4	5,2	12,1	4,1

Tabla VII.-Actividad lacasa en mUA/ g de madera detectada a distintos tiempos.

Al analizar la actividad lacasa detectada (tabla VII) se pone de manifiesto que en los cultivos realizados en este ensayo los hongos crecen de modo diferente a cuando se incubaron en el reactor descrito en el apartado 1.3.1. Al final de la fermentación (30 días), en aquellos cultivos no se detectaba actividad y ahora, al cambiar el tipo de fermentador empleado, se encuentra en los cultivos sobre madera sin extraer, la misma madera sobre la que se realizó el experimento anterior. Se observa que sobre astillas extraídas con acetona ambos microorganismos tienen niveles similares de actividad, mientras que en el resto de los casos (astillas extraídas con agua o sin extraer) *P. sanguineus* presenta mayores niveles de actividad. Esto confirma que el efecto producido al retirar componentes minoritarios no tiene por qué ser el mismo sobre distintos microorganismos. En cualquier caso los niveles son bajos, lo que puede deberse tanto a la interferencia ya comentada como a la dilución necesaria para extraer las astillas. En otros trabajos desarrollados con madera en forma de serrín (Liers *et al.*, 2011) o de pequeños bloques (Hakala *et al.*, 2004) se necesita menos tampón para extraer las astillas mejorando la sensibilidad del método.

2.1.3. Estudio microscópico

Se ha evaluado el crecimiento y el tipo de ataque producido sobre la madera mediante microscopía óptica y electrónica de barrido. Los resultados de microscopía óptica de la madera con las diferentes extracciones fermentadas con *P. sanguineus* y con *Trametes* sp. I-62 a distintos tiempos se muestran en las figuras 31 (*P. sanguineus*) y 32 (*Trametes* sp. I-62).

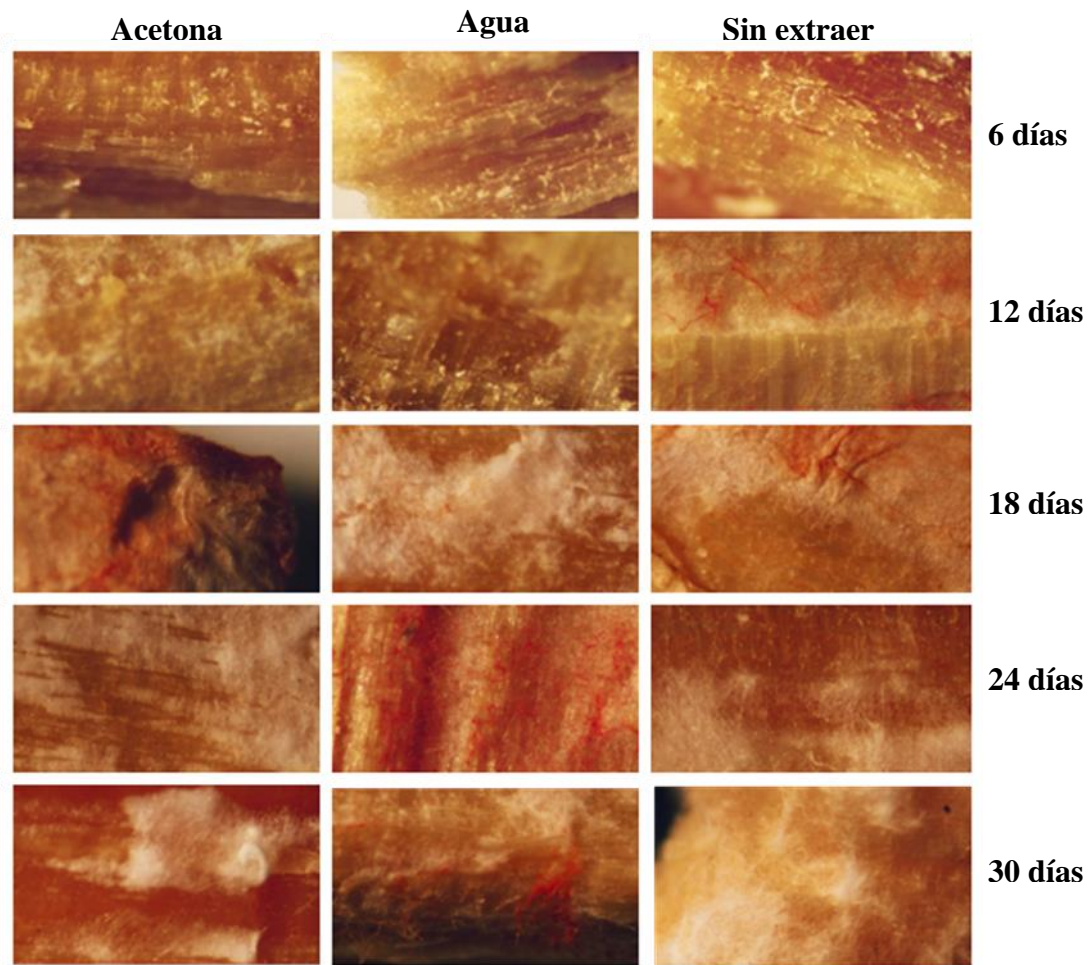


Figura 31.-Madera de *P. radiata* extraída con acetona, agua y sin extraer, y fermentada con *P. sanguineus*. Fotos obtenidas con lupa estereoscópica con 10 aumentos.

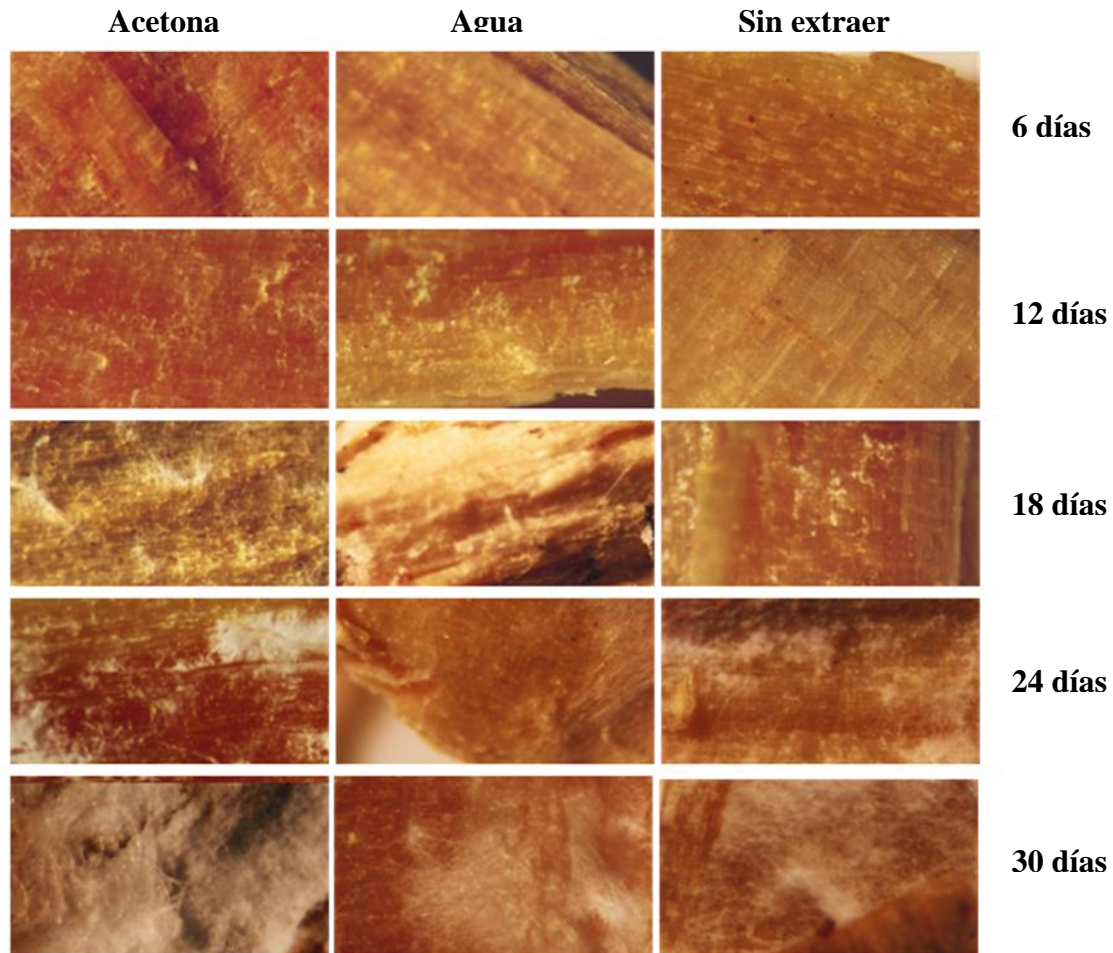


Figura 32.-Madera de *P. radiata* extraída con acetona, agua y sin extraer, y fermentada con *Trametes* sp. I-62. Fotos obtenidas con lupa estereoscópica con 10 aumentos.

Al observar las astillas se aprecia un mayor crecimiento del micelio fúngico en el caso de *P. sanguineus*, lo que está de acuerdo con los datos de consumo de O₂. En el caso de este microorganismo se observa micelio de color blanco que se va tornado anaranjado según aumenta el tiempo de fermentación, aunque siempre permanecen zonas de micelio blanco. En fotos a mayor aumento (figura 33) se observa cómo no se trata de contaminación sino del mismo micelio que toma el color anaranjado o no.

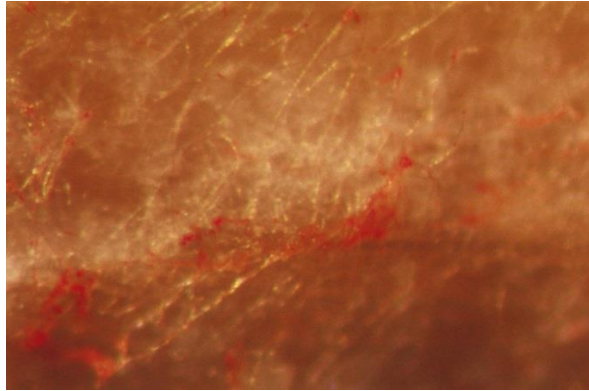


Figura 33.-Madera de *P. radiata* extraída con acetona y fermentada 30 días con *P. sanguineus*. Fotos obtenidas con lupa estereoscópica con 63 aumentos.

Se sabe que el color rojo del micelio del género *Pycnoporus* se debe a la formación de fenoxazinona y otros compuestos relacionados con carácter antibacteriano como el ácido cinabarínico y similares (Sullivan y Henry, 1971). Se ha descrito la relación de la actividad lacasa con la síntesis de estos compuestos y con la capacidad antibacteriana de *P. cinnabarinus* (Eggert, 1997b).

Al examinar cortes de madera con el microscopio electrónico (figura 34) se observa la estructura de la madera. En las fotos obtenidas a diferentes tiempos de incubación y con distintas extracciones de la madera se observaron diferentes comportamientos según la zona observada, por lo que las fotos no se presentan clasificadas. En todos los casos se observa cómo el micelio crece sobre las astillas y en algunos casos se observa cierta separación de las fibras por una degradación de la lámina media. Si bien esta degradación no es muy marcada, se aprecia con más claridad en los últimos tiempos de los cultivos con *P. sanguineus*. No obstante, cabe destacar que en ninguno de los casos se ha observado una degradación o rotura de las fibras que pueda conllevar un detrimento de las calidades papeleras de la pasta que se fabrique posteriormente con estas astillas.

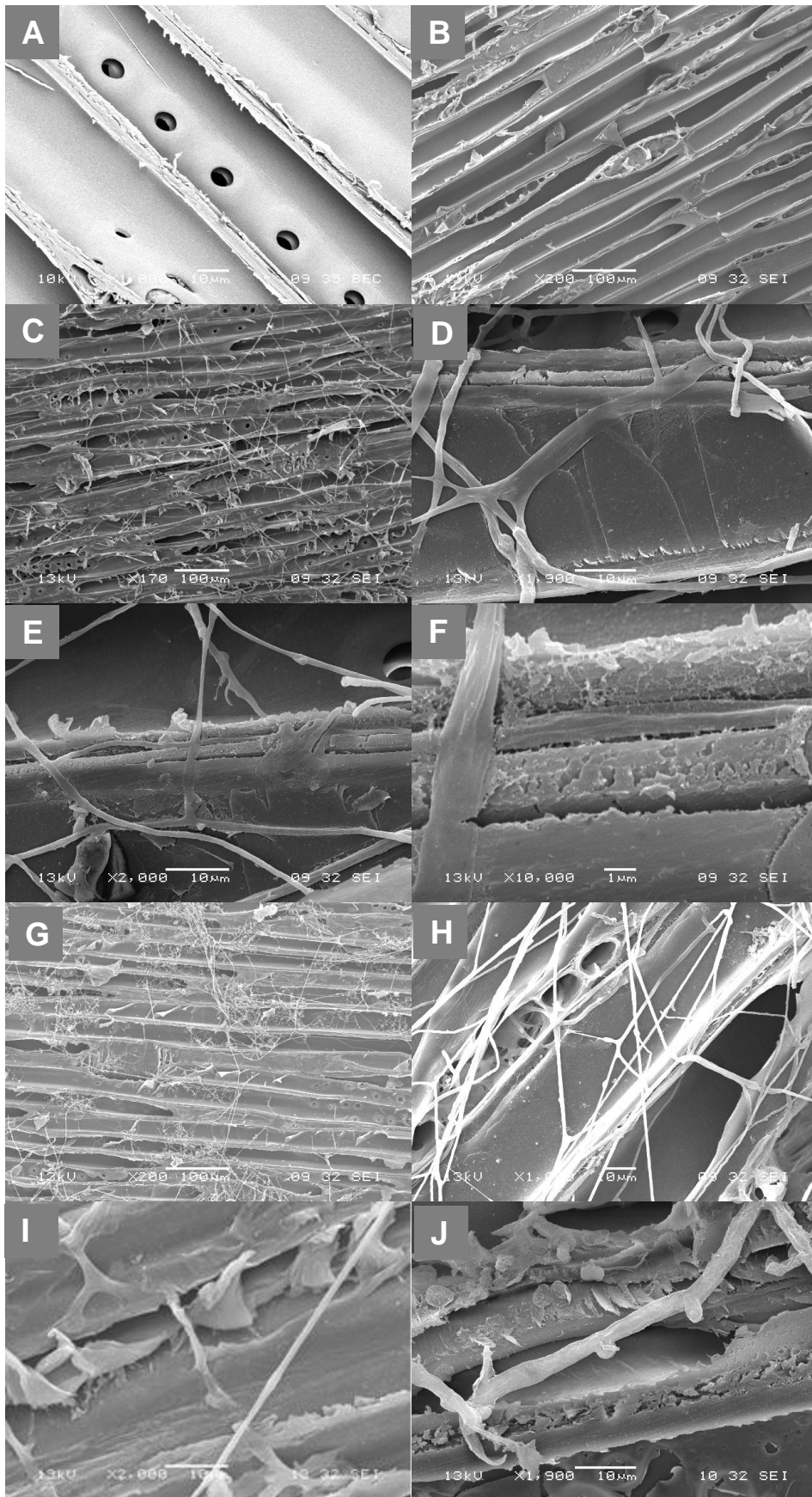


Figura 34.-Muestras de madera sin tratar (A, B). Incubada con *Trametes sp. I-62* (C, D, E, F). Incubada con *P. sanguineus* (G, H, I, J).

2.2. Estudio de la producción de pasta

Se han presentado los resultados obtenidos al fermentar astillas extraídas con agua caliente o acetona, con hongos de podredumbre blanca, empleando fermentadores de tipo columna de Raimbault, que emplean pequeñas cantidades de muestra. Los resultados obtenidos, en lo que respecta al crecimiento del hongo y en cómo afecta a la estructura de las astillas, hacen interesante realizar fermentaciones sobre suficiente cantidad de madera de astillas extraídas como para poder realizar pasta y caracterizarla en términos papeleros. Para ello se emplean los mismos fermentadores utilizados para la selección de los microorganismos.

2.2.1. Variación del consumo de energía

Como ya se ha comentado, el elevado consumo de energía es uno de los principales limitantes para que la producción de pasta mecánica alcance cotas superiores. Por ello se han seleccionado los dos microorganismos empleados en esta fase del estudio atendiendo al consumo energético, y ahora se pretende evaluar cómo afecta la extracción de componentes minoritarios a dicho consumo de energía. Al igual que en el apartado 1.2.1 se presentan los datos de forma porcentual para poder minimizar las diferencias entre lotes provenientes del ajuste del equipo y calculando siempre la media entre las dos partes en las que se dividen las astillas (cuyo consumo de energía se evalúa por separado).

En la figura 35 se muestran las diferencias porcentuales de consumo en la etapa de desfibrado. Cabe destacar, en primer lugar, el importante ahorro energético encontrado en los controles abióticos. La extracción de los compuestos solubles en acetona y agua provoca ahorros de energía de más de un 26% y 16% respectivamente. Las muestras que combinan extracción con tratamiento fúngico también consiguen mejorar notablemente el consumo de energía alcanzándose ahorros de más del 30% cuando se combina con la extracción con acetona. La extracción con agua caliente parece tener un efecto desigual. En las astillas tratadas con *Trametes* sp. I-62 produce un importante ahorro de casi diez puntos más que cuando sólo se realiza la extracción, mientras que en el caso de *P. sanguineus* el ahorro producido por el microorganismo apenas supone un uno por ciento más que el control abiótico.

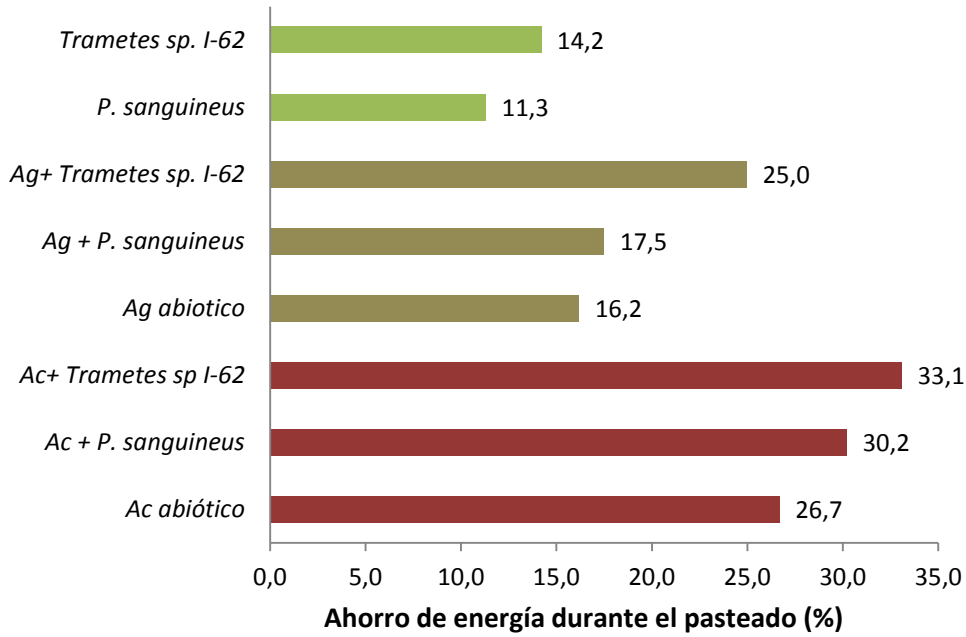


Figura 35.-Evaluación del ahorro de energía en la etapa de desfibrado.

Cuando se realiza el refinado de las pastas se puede observar en la figura 36 que las diferencias encontradas en el desfibrado se atenúan. Incluso en alguno de los casos no se produce ahorro sino un consumo ligeramente superior, aunque los consumos absolutos de energía en esta etapa son menores que en el desfibrado, como ya se comentó en la selección del microorganismo, y por tanto tienen menos peso en el consumo global de energía en el proceso.

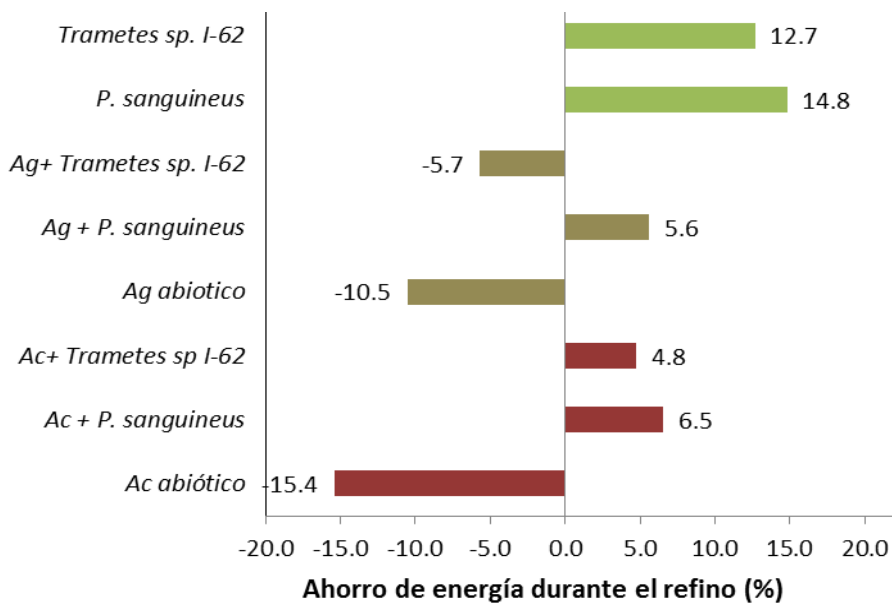


Figura 36.-Ahorro de energía en la etapa de refinado.

En cualquier caso, al analizar el consumo total de energía en las etapas de desfibrado y refino, podemos observar (figura 37) que no se modifican significativamente los resultados descritos para la etapa de desfibrado excepto en el caso de las astillas extraídas con agua, cuyos ahorros globales son similares a los producidos cuando el microorganismo crece sobre madera sin extraer. Como resumen cabe destacar el alto ahorro de energía conseguido por la extracción de componentes minoritarios aún sin tratamiento fúngico, y la mejora de dicho ahorro en el caso de astillas extraídas con acetona tras ser sometidas a la fermentación con los microorganismos. No obstante no podemos obviar que el calentar los solventes para la extracción conlleva un gasto energético cuya cuantificación escapa de los límites de este trabajo.

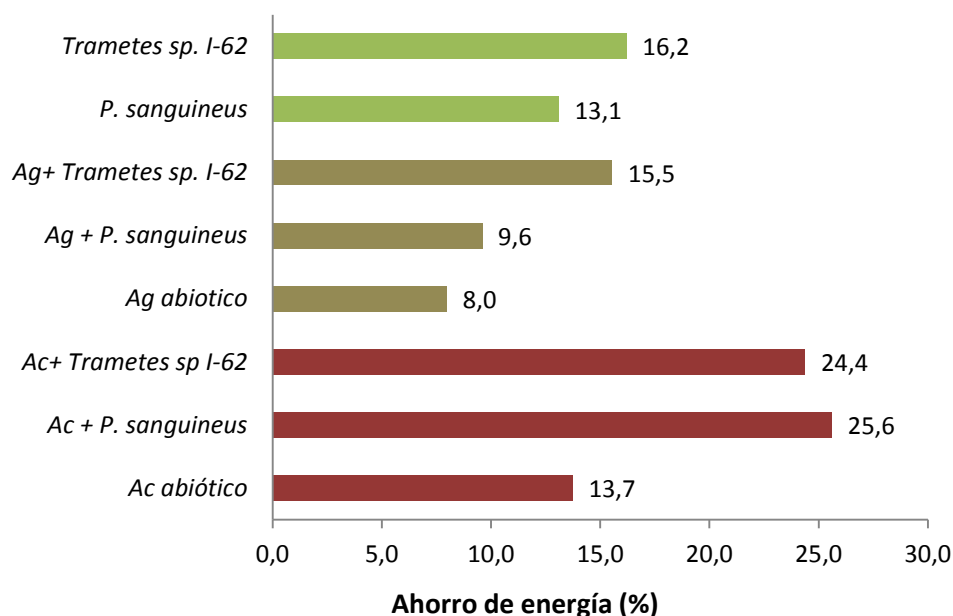


Figura 37.-Ahorro total de energía en el pasteado.

La posibilidad de realizar extracciones de las astillas previas a un pasteado no ha sido muy estudiada. Dado que se sabe que las resinas y otros componentes extraíbles son los responsables del *pitch*, hay algunos trabajos que estudian su eliminación en las etapas de blanqueo (Berguelin y Holmbon, 2003), pero sin duda la operación más parecida a una extracción son los procesos de pasteado conocidos como *organosolv*. Desde comienzo de los 70 se han presentado como una alternativa a los pasteados químicos convencionales por la facilidad de recuperación de los subproductos disueltos en el solvente (Botello *et al.*, 1999). No han conseguido implantarse a nivel industrial por los altos costes de la recuperación de los disolventes y de la instalación, por las altas

presiones que debe soportar, además de problemas en la calidad de las pastas. Estos mismos problemas aparecerían de modo similar si se pretendiera instalar la extracción realizada en este trabajo a escala industrial. No obstante, hay que destacar que con el auge de las denominadas biorrefinerías los procesos *organosolv* están volviendo a aparecer como una opción interesante por la ya descrita facilidad de recuperación de subproductos (Pan *et al.*, 2005). En este campo también podría situarse una extracción previa a un pasteado mecánico teniendo en cuenta, no solo el ahorro de energía producido y su influencia la calidad de la pasta, sino también la existencia de corrientes residuales de donde se podrían extraer productos de alto valor añadido.

Un pretratamiento similar al realizado en este trabajo, aunque trabajando a escala piloto y con fines últimos distintos es el realizado por Caperos *et al.* (1990). En este trabajo se pone de manifiesto la similitud entre los extractos de astillas de *Pinus pinaster* con diferentes solventes (acetona entre ellos) y los subproductos habituales obtenidos de esta madera como el *tall-oil*. Asimismo encuentran que las propiedades papeleras, tras un pasteado semiquímico al sulfito neutro, no se resienten. En los siguientes apartados de este trabajo se evalúa la calidad de las pastas producidas, pero el importante ahorro conseguido con la extracción, a pesar de las dificultades existentes para una implantación industrial, hace que su planteamiento no sea descabellado, más aún si pensamos en un aprovechamiento de los subproductos dentro del concepto de aprovechamiento integral o biorrefinería. Las mismas cepas que las aquí seleccionadas, han sido empleadas por nuestro grupo para producir pasta química de *E. globulus* (Martín-Sampedro *et al.*, 2011). Se observó, en este caso, que la extracción por si sola provocaba un incremento en la calidad de las pastas, evaluada como aumento en la viscosidad (integridad de la celulosa) y disminución del número kappa (indicativo de la lignina residual). Tras la fermentación de las astillas con los hongos y el posterior pasteado kraft, se observó que para astillas extraídas con acetona se producía una disminución más notable del número kappa, pero acompañada de una caída en la viscosidad. El tratamiento con agua resultó menos eficaz. Estos resultados son coherentes con los aquí descritos, aun cuando el comparar pastas químicas con pastas mecánicas hace difícil la evaluación al no poder utilizar los mismos parámetros de calidad.

2.2.2. *Modificaciones producidas por los hongos sobre las astillas*

De modo análogo al presentado para el apartado 1.2.2 se describen a continuación los resultados de las pérdidas de peso encontradas tras la fermentación, realizando siempre la comparación con la respectiva muestra control (figura 38). Se observa que las pérdidas son siempre inferiores al 6%, presentando las muestras extraídas con acetona valores ligeramente superiores a las muestras sin extraer, lo que indica una mayor degradación. En el caso de las muestras extraídas con agua, presentan un valor notablemente inferior a las muestras sin extraer tras la fermentación con *P. sanguineus*, mientras que para astillas incubadas con *Trametes sp. I-62* estas diferencias son pequeñas.

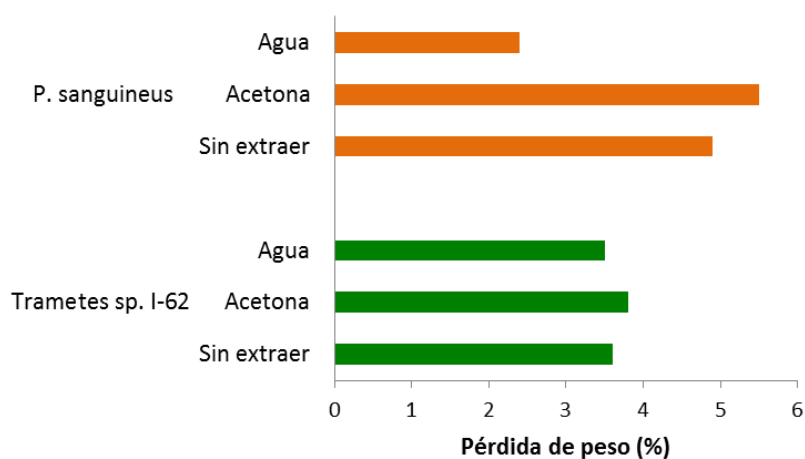


Figura 38.-Pérdida de peso durante la fermentación.

Los datos son coherentes con los presentados en el apartado anterior, en el estudio realizado a diferentes tiempos evaluando el consumo de O_2 por el microorganismo. Si bien no se alcanza una correlación numérica, ya que el consumo de O_2 puede verse influenciado por el metabolismo del microorganismo y no sólo por la degradación que realiza del sustrato, se observa que las condiciones que más O_2 consumen (*P. sanguineus* creciendo sobre astillas extraídas con acetona y sin extraer) son las que mayor pérdida de peso presentan. Más adelante (figuras 39 y 40) se presentan los datos de los análisis químicos realizados para correlacionar las pérdidas de peso con la degradación de los componentes de la madera. Se muestran los análisis de las astillas antes y después de la fermentación.

Se presentan en la tabla VIII los análisis de las astillas extraídas y sin extraer antes de la fermentación. En ella se observa como las extracciones con acetona y agua disminuyen el porcentaje de extractos pero no totalmente, aunque las extracciones se

prolongan durante 24 horas. Esto puede deberse a que la extracción se realiza sobre astillas y los análisis sobre serrín, y el menor tamaño de partícula facilitaría la extracción de compuestos. El que el tamaño de la astilla condicione la cantidad de extractos ha sido descrito por Caperos *et al.* (1991) para diferentes disolventes, entre ellos la acetona. Se comprueba además, que parte de los compuestos extraíbles en agua lo son en acetona y viceversa, ya que la extracción en un solvente disminuye los extraíbles en ambos, aunque no en la misma magnitud.

La extracción con acetona no provoca importantes variaciones en el resto de componentes de la madera. Para el caso del agua, Browing (1967), ya estableció que la extracción de compuestos en agua caliente aumenta con el tiempo de extracción ya que se produce degradación por la hidrólisis de grupos acetilo que generan ácido acético y la subsiguiente hidrólisis ácida. Esto se observa en la disminución del contenido en holocelulosa y en pentosanos que se produce tras la extracción con agua caliente.

	Tipo de extracción		
	Sin extraer	Acetona	Agua
Extractos en acetona (%)	0,83	0,20	0,55
Extractos en agua caliente (%)	3,12	2,60	1,97
Lignina (%)	26,19	25,89	26,68
Holocelulosa (%)	72,71	72,51	69,49
Pentosanos (%)	8,37	8,02	7,16

Tabla VIII.-Análisis de la madera con las diferentes condiciones de extracción.

Las variaciones de cada fracción causadas por la fermentación se muestran como las diferencias respecto a su correspondiente control abiótico. En la figura 39 se presentan los resultados para los extraíbles en agua y acetona. Respecto a los extraíbles en acetona, se observa un comportamiento diferente entre los dos microorganismos estudiados. *P. sanguineus* provoca, en todo los casos, pequeñas variaciones siempre inferiores al 0,1%, mientras que *Trametes* sp. I-62 provoca ligeros aumentos que sólo superan el 0,3% en el caso de astillas ya extraídas (cuyo contenido inicial era del 0,2%). Para los extraíbles en agua ambos microorganismos provocan un aumento en su contenido, aunque también es más acusado en el caso de *Trametes* sp. I-62. Este

aumento puede atribuirse a la solubilización de compuestos procedentes de la degradación fúngica de los polímeros (celulosa, hemicelulosa, lignina), insolubles antes de la fermentación, y a que estos compuestos se acumulen antes de ser totalmente degradados por los microorganismos.

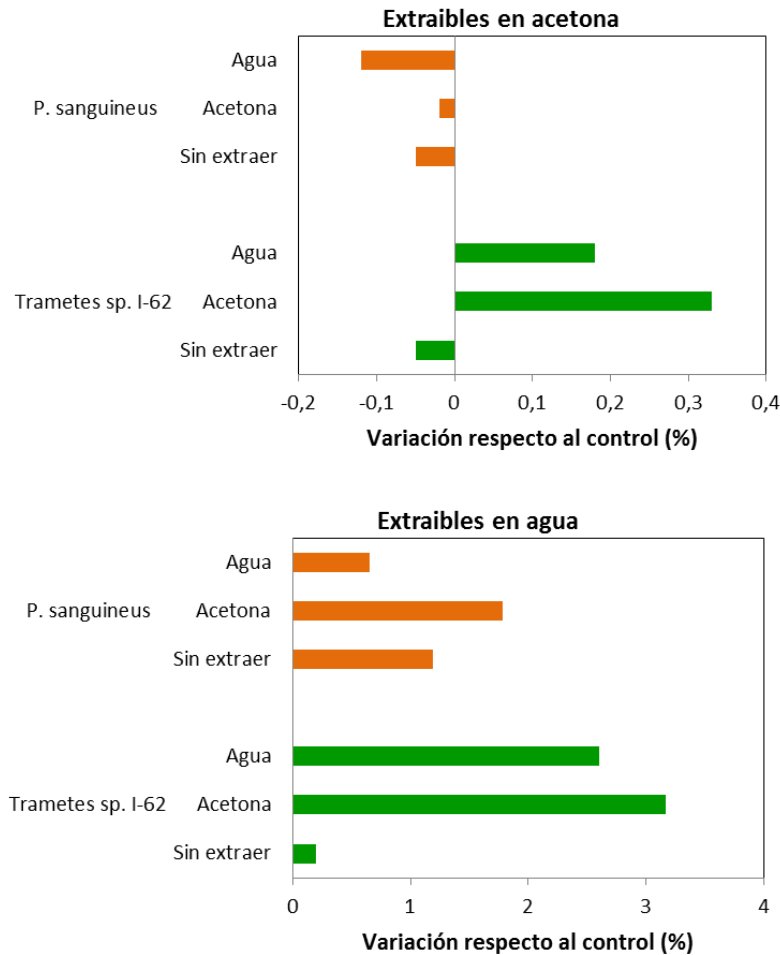


Figura 39.-Variación del contenido en extraíbles en acetona y agua caliente en la madera respecto a cada control tras la fermentación.

En la figura 40 se muestran los resultados de las determinaciones de los componentes mayoritarios. En general se puede observar que los cambios son pequeños, siempre inferiores al 3%, lo que es coherente con que las pérdidas de peso globales no superen nunca el 6%. Al analizar los datos para *Trametes* sp. I-62 se puede observar que en todos los casos este hongo provoca una disminución del contenido en lignina y de holocelulosa, compatible con el aumento de sustancias extraíbles. Esto indica que se degradan los polímeros y aparecen compuestos solubles. Todos estos cambios se ven incrementados por la extracción de las astillas, ya sea con acetona o con agua, aunque según se observaba en la figura 38 la extracción no provoca una mayor pérdida de peso.

Es decir, la extracción provoca una mayor degradación (disminución de lignina y holocelulosa y aumento de extraíbles) pero sin provocar una mayor mineralización (incremento en la pérdida de peso). Estos cambios, si bien no afectan al rendimiento del proceso, sí que pueden provocar modificaciones en la calidad de las pastas. Resulta significativo asimismo el aumento que la extracción produce en el contenido en pentosanos, poniendo así de manifiesto la degradación preferencialmente de la celulosa frente a las hemicelulosas.

El comportamiento de *P. sanguineus* es mucho más irregular dependiendo del tipo de extracción que se realice sobre la madera. La extracción con agua provoca una pérdida de la selectividad en el ataque fúngico, aumentando el contenido en lignina y disminuyendo el de holocelulosa. Por otro lado, la extracción con acetona produce una deslignificación aún más selectiva que en el caso de la madera sin extraer, lo que se corrobora porque junto a la disminución del contenido en lignina y el aumento de holocelulosa también se observa un aumento en el contenido en pentosanos.

No obstante, es de remarcar que los valores obtenidos para ambos hongos sobre madera sin extraer no coinciden con los obtenidos en la etapa de selección (figuras 23 y 24). Aunque las diferencias no son muy acusadas (nunca superan el 0,5%), son significativas por las pequeñas degradaciones producidas, y se atribuyen tanto a la dificultad de controlar con precisión factores tales como la cantidad de inóculo, lo que provoca diferencias entre fermentaciones, como a los pequeños errores en la determinación analítica.

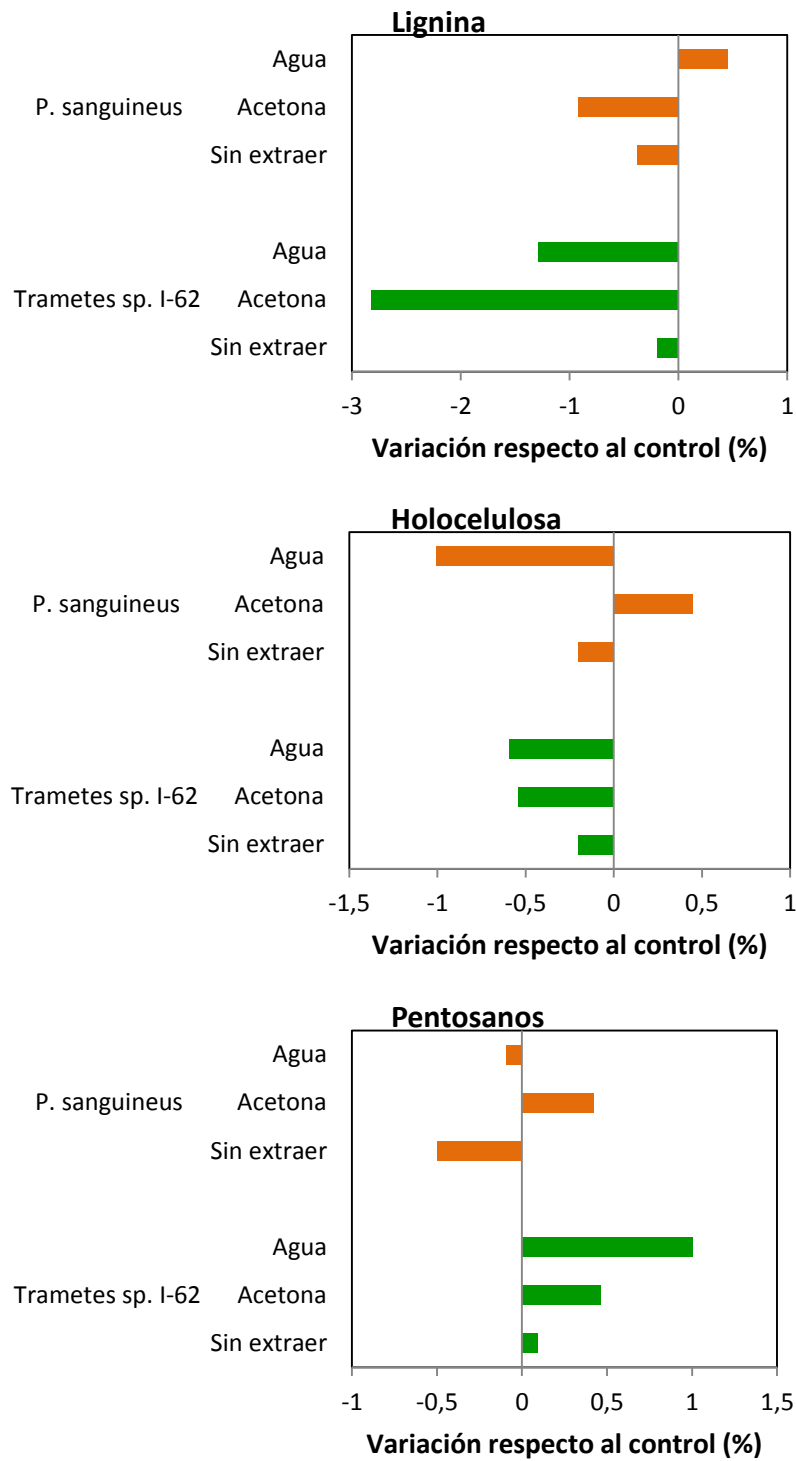


Figura 40.-Variación del contenido en lignina, holocelulosa y pentosanos en la madera respecto a cada control tras la fermentación.

Previamente al pasteado se seleccionaron astillas para realizar cortes transversales con el microtomo y observarlos al microscopio tras una doble tinción con safranina y azul astra. Todas las muestras dieron resultados similares. En la figura 41 se muestra como ejemplo la madera sin extraer tratada con *P. sanguineus* observándose siempre

una tinción rojiza, que indica la presencia de lignina, con zonas azuladas en la zona de los radios leñosos, mostrando los puntos por donde comienza la deslignificación. Se aprecia un canal resinífero, totalmente rodeado de un halo azul, que puede ser una vía de entrada de los hongos. También se observa claramente un anillo de crecimiento, mostrando cómo la madera de verano posee paredes de las fibras mucho más gruesas. En las condiciones de ensayo, esta técnica, descrita por Mesnner y Srebotnik (1994), resulta adecuada para mostrar la deslignificación pero no es capaz de detectar diferencias entre las distintas muestras tras 4 semanas de incubación. Esto se debe a que las diferencias entre zonas de una misma muestra son a veces mayores que las encontradas entre diferentes muestras e impiden estimar la degradación.

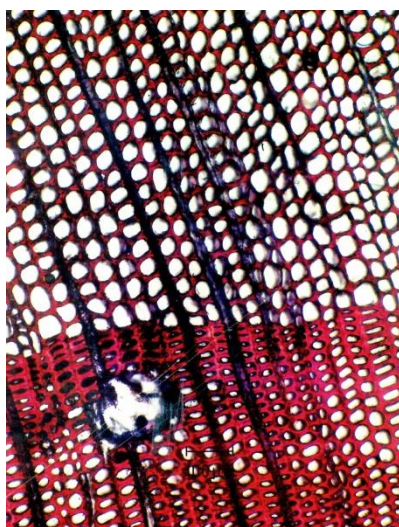


Figura 41.-Microfotografía del corte al microtomo de una astilla sin extraer tras 4 semanas de incubación con *P. sanguineus*.

2.2.3. *Análisis de las enzimas producidas por los hongos*

En el apartado 1.2.3 se comentó la imposibilidad de determinar actividades enzimáticas en los extractos de las astillas tras la fermentación, posiblemente debido a interferencias causadas por sustancias, como los polifenoles, extraídas junto con las enzimas. No obstante, en el apartado 2.1.2 donde se muestran los resultados sobre muestras obtenidas empleando otro sistema de fermentación, sí que se encuentran valores de actividad lacasa para muchas de las muestras analizadas. Por ello, se decidió realizar, sobre las muestras ahora analizadas, determinaciones de actividad lacasa. Los resultados se muestran en la tabla IX. En ella se observa que se han podido determinar ciertos niveles de actividad en varios casos aunque estos siempre son pequeños (inferiores a 2 mUA/g) y menores a los encontrados con el reactor empleado en el

apartado anterior (columnas de Raimbault) para llevar a cabo la fermentación. Esto puede deberse a una distinta producción de enzima por los hongos o a un crecimiento distinto que provoque la liberación de subproductos de la madera que puedan producir interferencias en la determinación.

	<i>Trametes</i> sp.I-62	<i>P. sanguineus</i>
Madera extraída con acetona	0,12	1,03
Madera extraída con agua	1,24	--
Madera sin extraer	--	0,18

Tabla IX.-Determinación de actividad lacasa (mUA/g) en los extractos tras la fermentación.

A pesar de encontrarse niveles bajos de actividad se decidió realizar un estudio mediante zimogramas para analizar las posibles isoformas producidas. Previamente se hizo una concentración de las muestras que, si bien en el apartado 1.2.3 se había mostrado inadecuada para cuantificar la actividad, fue ahora adecuada para poder apreciar bandas en el caso de las muestras procedentes de la fermentación con *P. sanguineus*. En la figura 42 se presenta el gel realizado donde se aprecian bandas para las tres maderas fermentadas con *P. sanguineus*. Para *Trametes* sp. I-62 se aprecia débilmente una señal pero su debilidad hace imposible interpretarla. Las bandas de lacasa de *P. sanguineus* muestran claramente dos bandas de diferente peso molecular. A pesar de que el zimograma, al no haber desnaturalizado la muestra, no es una técnica adecuada para calcular el peso molecular con precisión, éste puede determinarse de modo orientativo. Los resultados obtenidos son coherentes con los descritos por García *et al.* (2006) donde para *P.sanguineus* en cultivo líquido, en un medio inducido con 2,5-xilidina, observan la presencia de 2 isoformas. La primera isoforma, LacI, de 80 kDa, mayoritaria, y otra, Lac II, de 68 kDa, de la que se encuentra una cantidad menor. En nuestro caso, sobre astillas sin extraer sólo se detecta la isoforma I con peso molecular cercano a los 80 kDa, mientras que la extracción favorece la producción de la isoforma II (de unos 60 kDa), de un modo mucho más marcado en el caso de la extracción realizada con acetona. Si nos fijamos en la isoforma I ésta presenta en las distintas muestras pequeñas variaciones en su capacidad migratoria que pueden atribuirse a un

diferente grado de glicosilación, ya que está ampliamente descrito que las lacasas presentan un grado de glicosilación variable (Baldrian, 2006). Las dos isoformas pueden atribuirse a la expresión/inactivación de diferentes genes por las sustancias presentes o retiradas tras la extracción. La inducción de genes de lacasa por sustancias extraíbles en agua como el ácido tánico ha sido demostrada para el hongo *Coriolopsis gallica* (Carbajo *et al.*, 2002). En hongos como *Trametes* sp. I-62, de los que se conoce que cuentan con varios genes de lacasa, se sabe que estos se expresan de forma diferencial, excretando diferentes isoformas de lacasa, en presencia de distintas moléculas de bajo peso molecular que pueden ser parte de los extraíbles de la madera (Gonzalez *et al.*, 2003, 2008; Terrón *et al.*, 2004a).

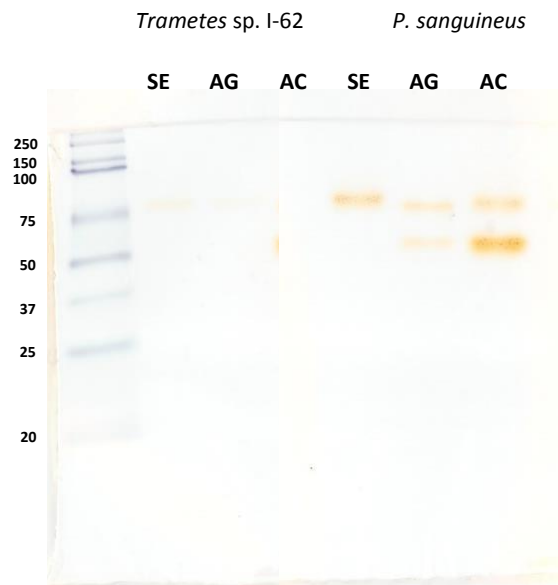


Figura 42.-Zimograma de la actividad lacasa en los extractos tras los cultivos de *Trametes* sp. I-62 y *P. sanguineus* sobre las astillas extraídas diferencialmente. SE: sin extraer; AG: extraídas con agua; AC: extraídas con acetona.

Se realizó un isoelectroenfoco de la muestra de *P. sanguineus*, no consiguiéndose separar más de una isoforma. La zona con presencia de actividad lacasa presentaba un pH de 3,1 a 3,4, siendo valores habituales para lacasas de hongos ligninolíticos, con pIs mayoritariamente en rango de 3 a 4 (Baldrian, 2006). No obstante, el que la zona con actividad sea relativamente amplia indica que posiblemente esté presente más de una isoforma aunque éstas no se puedan separar.

2.2.4. *Análisis de la calidad de las pastas*

En el apartado 2.2.1 se han expuesto los ahorros de energía producidos al emplear astillas previamente extraídas, que en algunos casos son notables. En los apartados 2.2.2 y 2.2.3 se han descrito las modificaciones químicas producidas por las extracciones y los cambios en los perfiles enzimáticos de dichas muestras. No obstante, el punto determinante para poder evaluar la importancia del ahorro energético viene dado por la caracterización de las pastas producidas. Para ello se ha seguido un procedimiento análogo al empleado en el apartado 1.2.4. En la figura 43 se presenta el análisis Bauer-McNett de la clasificación de fibras.

Como ya se comentó al discutir resultados obtenidos con este ensayo en el apartado 1.2.4, no se pueden comparar entre si pastas obtenidas en diferentes momentos ya que las variaciones causadas por los ajustes de refinador de discos enmascaran los posibles cambios. Por esto, cada pasta procedente de astillas tratadas con un hongo se compara con su correspondiente control abiótico que ha sido obtenido en el mismo lote de muestras.

Se observa que los tratamientos no producen diferencias muy acusadas, con la excepción de las pastas obtenidas a partir de astillas extraídas con acetona y tratadas con *P. sanguineus*. En este caso se produce una disminución de las fracciones más pequeñas, correspondientes a fibras más degradadas, aumentando las fracciones correspondientes a fibras no dañadas y agregados de fibras. Esto puede justificar el ahorro energético que se obtiene al producir esta pasta.

Además del ensayo Bauer-McNett se ha realizado la clasificación en un tamiz Sommerville obteniendo siempre valores situados entre el 1 y el 5%. La proximidad de los valores de las diferentes pastas hace concluir que los tratamientos no producirán diferencias importantes entre las pastas cuando estas sean depuradas mediante depuradores probabilísticos.

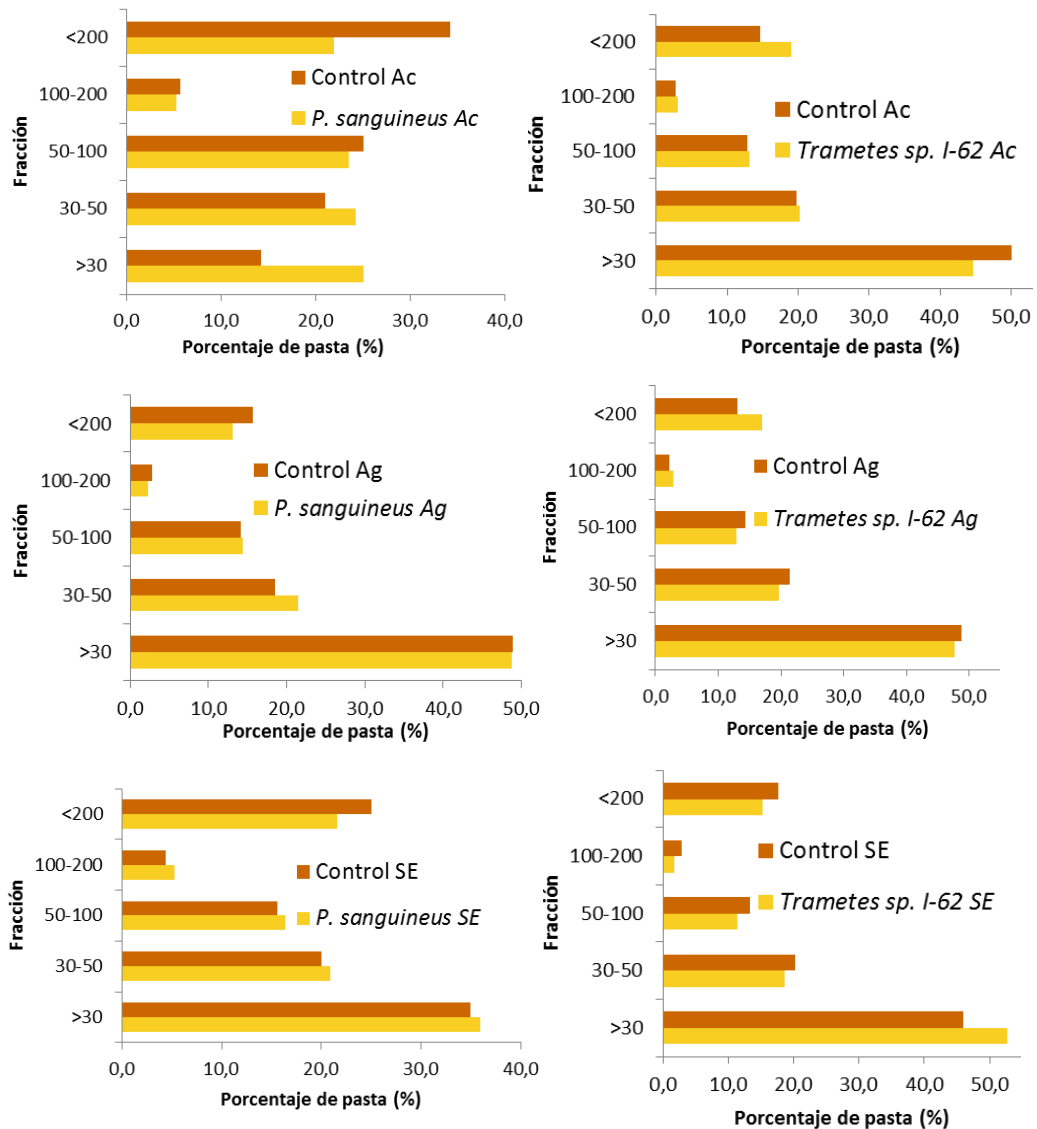


Figura 43.-Clasificación Bauer-McNett de las pastas procedentes de astillas extraídas.

En la figura 44 se muestra el aspecto de estas pastas al microscopio óptico. Tras el teñido con el reactivo de Herzberg todas las pastas muestran una coloración amarillenta similar, característica de la pasta mecánica, sin que el tratamiento de extracción o de fermentación con los microorganismos provoque deslignificaciones apreciables con esta técnica. Al comparar los distintos controles entre ellos, podemos observar cómo las extracciones con agua o con acetona provocan un ligero aumento en la fibrilación. Al comparar las pastas procedentes de astillas incubadas con los microorganismos con sus respectivos controles, se observa una disminución de paquetes de fibras indicando un desfibrado mas eficaz. No obstante, sobre todo en el caso de las astillas extraídas con

agua, también existe un aumento en los finos o fibras rotas en pequeños fragmentos. Tanto los controles, como las muestras tratadas en el caso del tratamiento con *P. sanguineus*, presentan un menor número de agregados de fibras y una mayor fibrilación.

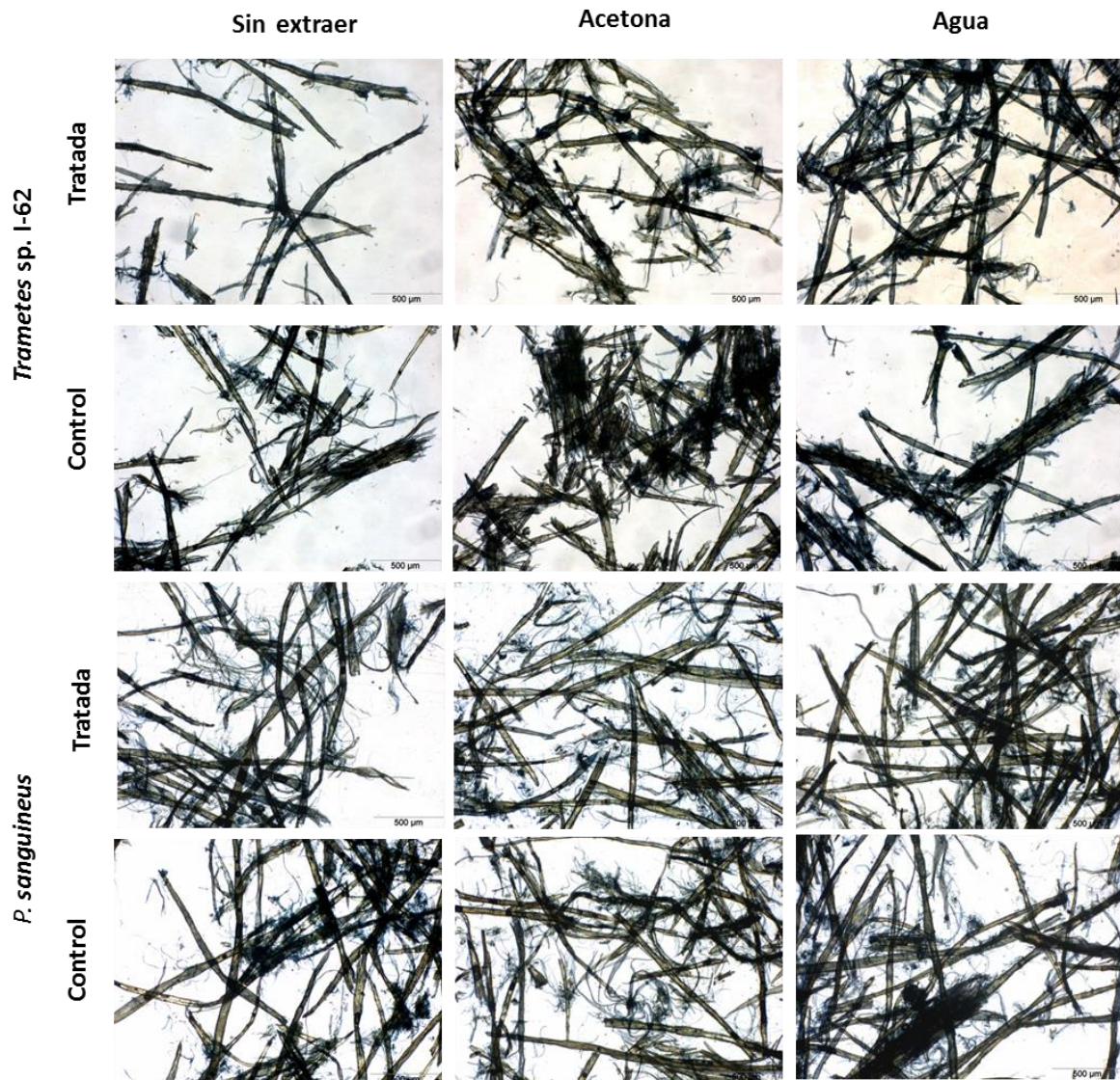


Figura 44.-Microfotografías de las pastas extraídas con acetona y agua caliente y tratadas con *Trametes* sp. I-62 y *P. sanguineus* y sus respectivos controles.

Aunque no parece que se produzcan grandes cambios en la calidad de las pastas, los resultados más concluyentes se obtienen al formar hojas de ensayo a partir de dichas pastas y caracterizarlas de acuerdo a lo expuesto en el apartado 6.3 de Materiales y Métodos. Los resultados de esta caracterización, junto con el grado de refinado, se presentan en la tabla X. Podemos comparar los controles entre si para ver el efecto que

produce la extracción de componentes minoritarios así como cada control abiótico con las pastas producidas a partir de astillas fermentadas con *P. sanguineus* y *Trametes* sp. I-62.

Al comparar los distintos controles entre si se observa que la mayoría de las propiedades permanecen prácticamente constantes. La extracción con acetona provoca un aumento de la resistencia a la tracción, lo que indica una mejor unión entre fibras (Smook, 1990), pero una menor resistencia al desgarro, asociada a la integridad de la fibra (Higham, 1968), lo que parece indicar que la eliminación de los compuestos solubles en acetona provoca una mejor unión entre fibras, aunque estas fibras se degraden ligeramente. La extracción con agua provoca el efecto contrario en la resistencia a la tracción. La pérdida de unión entre fibras puede atribuirse a la solubilización de una fracción de las hemicelulosas tal y como ya describió Browning (1967). La mejora en este caso de la resistencia al desgarro puede deberse a la eliminación de material no fibroso que no contribuya a dicha resistencia. La extracción con agua caliente, por otra parte también provoca un importante descenso de la blancura, posiblemente por la degradación que sufre la celulosa durante el proceso de extracción.

Al estudiar los tratamientos biológicos podemos observar que no hay grandes cambios respecto a sus respectivos controles. Los cambios más notables se producen de nuevo en la blancura que sufre un retroceso de en torno a 5 puntos, salvo en el caso de la madera previamente extraída con agua, que ya había sufrido este oscurecimiento en la extracción. Como ya se ha discutido previamente esta disminución de blancura, si bien es un inconveniente, no resulta dramática, ya que a las pastas mecánicas no se les demanda grandes blancuras y ésta podría aumentarse con algún blanqueo que no elimine la lignina, por ejemplo empleando peróxido de hidrógeno o ditionito sódico.

Madera	Sin extraer			Extraída con acetona			Extraída con agua		
	Control	<i>Trametes</i> sp. I-62	<i>P. sanguineus</i>	Control	<i>Trametes</i> sp. I-62	<i>P. sanguineus</i>	Control	<i>Trametes</i> sp. I-62	<i>P. sanguineus</i>
Refino (°SR)	36	40	38	35	37	38	38	36	39
Gramaje (g/m ²)	83,6	83,4	84,0	81,7	82,9	83,5	84,9	80,5	82,5
Espesor (mm)	0,216	0,251	0,218	0,184	0,216	0,198	0,227	0,222	0,226
Peso específico (g/cm ³)	0,389	0,332	0,385	0,445	0,384	0,422	0,375	0,363	0,366
Longitud rotura (m)	2860	2810	2850	3231	2915	2892	2220	2140	2273
Alargamiento (%)	1,8	1,7	1,8	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6
Índice desgarro (mNm ² /g)	4,8	4,9	4,2	3,6	3,5	3,7	5,6	5,3	5,3
Blancura D65 (%)	46,6	40,2	41,0	46,5	42,0	41,1	40,9	37,2	38,9
Opacidad (%)	97,9	98,8	98,3	97,1	98,2	99,0	98,4	98,5	98,9

Tabla X.-Propiedades de las hojas de ensayo elaboradas con las pastas procedentes de astillas extraídas.

Respecto a las propiedades mecánicas, se mantienen similares a sus respectivos controles, observándose una ligera caída en el caso de pastas procedentes de astillas extraídas con acetona para la longitud de rotura. Dado que este valor aumentaba en esta pasta control respecto a las astillas sin extraer, la pérdida devuelve el valor al que tenía la pasta de referencia, no observándose una pérdida global si consideramos el tratamiento en su conjunto.

2.3. Conclusión

Resulta especialmente notable el ahorro energético producido por las extracciones previas, sobre todo si se emplea acetona como solvente. Este hecho cobra especial importancia dentro del entorno actual en el que la producción de celulosa y papel se enmarca en el ámbito de las biorrefinerías, ya que la extracción genera una corriente secundaria de extractos que puede ser el origen de productos de alto valor añadido.

Si unimos este ahorro al provocado por la fermentación con los microorganismos seleccionados se alcanzan ahorros superiores al 30%. Estos ahorros no provocan grandes cambios en la calidad de las pastas. Al evaluar cómo actúan los microorganismos para producir los cambios en la estructura que dan lugar al menor consumo de energía, se pone de manifiesto que no hay un modo único de actuación. En el caso de los microorganismos empleados, *Trametes* sp. I-62 y *P. sanguineus* la actividad lacasa parece desempeñar un papel importante aunque con perfiles diferentes y viéndose su comportamiento afectado por el extracción previa de diferente manera.

3. ESTUDIO DE CAPAS DE LIGNINA Y SU DEGRADACIÓN POR EL SISTEMA LACASA MEDIADOR

Para tratar de avanzar en el conocimiento del papel de la lacasa en la degradación de la lignina que se acaba de plantear se decidió llevar a cabo unos experimentos en los que se ha evaluado la capacidad de la lacasa para degradar films de lignina. En primer lugar se optimizó la formación de films para posteriormente estudiar su degradación por el sistema lacasa mediador.

3.1. Formación de films de lignina

Hay numerosos estudios de films de celulosa para estudiar distintos aspectos como su degradación enzimática y la relación con su cristalinidad (Ahola *et al.*, 2008), pero por el contrario, los trabajos con films de lignina son mucho más escasos. En los

primeros trabajos se empleó lignina organosolv (Constantino *et al.*, 1996) y otras ligninas modificadas como la lignina kraft; trabajos en los que se realizan films empleando ligninas similares a la nativa, como la denominada MWL (“Milled Wood Lignin”) mucho más recientes (Tammelin *et al.*, 2006) ya que las ligninas nativas son más difíciles de obtener y trabajar, entre otros aspectos por su baja solubilidad en casi cualquier disolvente.

Para este estudio se ha empleado lignina kraft para la puesta a punto de la obtención del film. Ésta se trató tal y como se describe en el apartado 8.1 de Materiales y Métodos para eliminar los iones que presenta la lignina comercial (se vende en forma de sal) ya que la lignina nativa que se va a emplear a continuación se encuentra en la forma protonada y no como sal.

Los films se prepararon sobre obleas de sílice recubiertas con poliestireno para simular el sensor de la microbalanza de cristal de cuarzo que se usará posteriormente y se ensayaron diferentes tiempos y velocidades de giro de la recubridora giratoria, observando visualmente el aspecto del film formado. Cuando los films se formaban durante un minuto a 3000 rpm presentaban un aspecto uniforme. Para comprobar esta aparente uniformidad se examinó el film con el microscopio de fuerza atómica (AFM), ampliamente empleado para caracterizar este tipo de superficies.

En la figura 45 se muestran imágenes de la oblea de sílice recubierta con poliestireno (A) y tras recubrirla con lignina (B). Se observa como la lignina presenta un aspecto liso y uniforme lo que indica que el film se ha formado de manera regular.

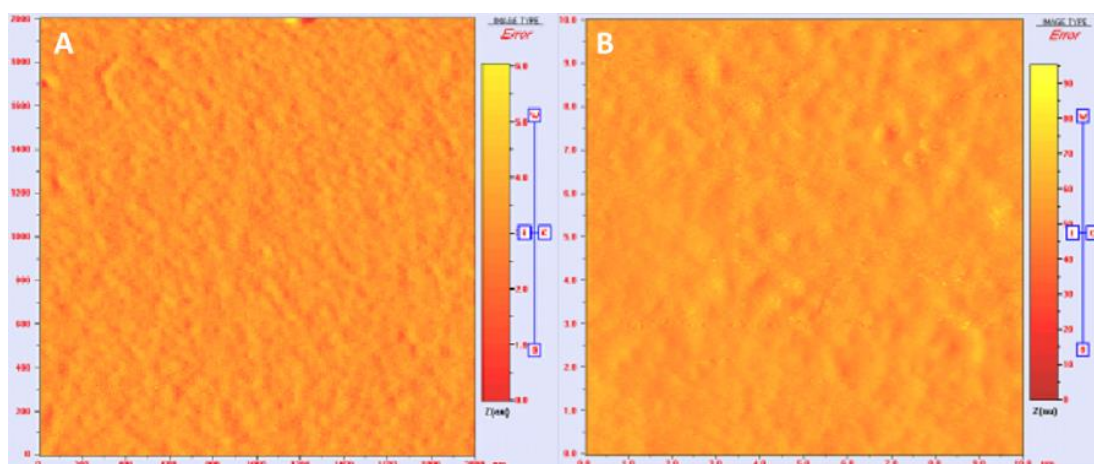


Figura 45.-Oblea de sílice recubierta con poliestireno (A) y con poliestireno y a continuación lignina (B).

Para poder asegurar que el film formado es de lignina se analizó su composición mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), obteniéndose un espectro (figura 46) que es coincidente con lo descrito por Johansson (2002) para la superficie de fibras procedentes de pasteado termomécanico, que tienen lignina en su superficie. La baja intensidad de la señal de silicio indica que el film recubre la superficie de la oblea de modo eficaz. Por tanto, se establece que el film de lignina es uniforme y adecuado para realizar estudios con él.

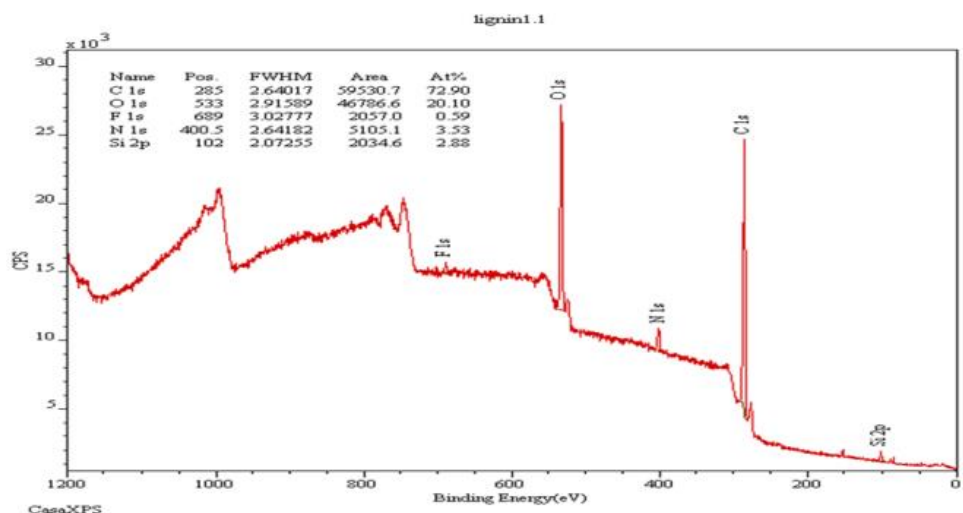


Figura 46.-Espectro XPS del film de lignina generado sobre la oblea de silicio.

3.2. Estudio del sistema lacasa mediador sobre los films de lignina

Se estudia el efecto del sistema lacasa mediador en los films de lignina para poder tener una idealización del ataque de las enzimas fúngicas sobre la lignocelulosa. Para ello se selecciona lacasa comercial de *Trametes versicolor* y HBT (hidroxibenzotriazol) como mediador por ser uno de los más empleados. Como modelo de lignina se selecciona una lignina de picea con una estructura similar a la nativa (EAL).

El estudio se hace empleando una microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (QCM-D), en la que los cambios en la frecuencia de oscilación del cristal del cuarzo se correlacionan con variaciones en la masa del film depositado sobre el sensor, incrementándose la frecuencia al disminuir el peso y viceversa. Por otro lado los cambios en la disipación de la señal tienen que ver con variaciones en la rigidez del film.

Tras formar un film de lignina sobre el sensor del QCM, éste se montó sobre el equipo y se sometió a la incubación con el sistema lacasa mediador para observar los

cambios en masa y en rigidez del film (Figura 47). En primer lugar el film se estabilizó en tampón acético/acetato 100 mM y se lavó con NaOH a pH 10 para eliminar el tampón. Esta etapa se realizó porque el tratamiento a pH alcalino es el modo de detener la reacción y se quería evaluar el efecto de someter el film a un pH alcalino antes de tratarlo con el sistema lacasa-mediador. Se observó que en presencia de NaOH, el film aumentaba de peso, posiblemente por la sustitución de protones por iones sodio en la lignina. Tras estabilizarse la señal el film fue de nuevo acondicionado a pH 4,5 recuperando una señal de frecuencia ligeramente menor a la inicial, indicando un ligero aumento de peso, pero un mayor cambio en la señal de disipación, lo que supone que el film es menos rígido, posiblemente debido a la desorganización causada en el film por la entrada de los iones sodio.

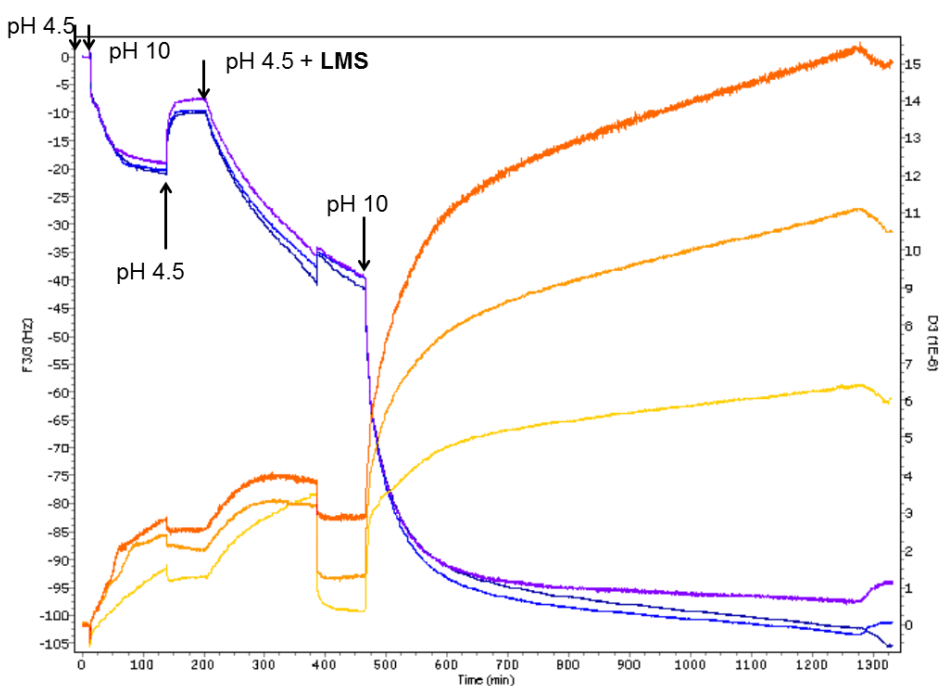


Figura 47.-Efecto del pH y del sistema lacasa mediador sobre el film de lignina.

Tonos azules: las variaciones de frecuencia; Tonos naranjas: variaciones de disipación.

Sobre este film estabilizado se inyecta el sistema lacasa mediador (lacasa 500 UA/l; HBT 10 mM), observándose un claro aumento de peso, posiblemente por la unión de la enzima al film. Si tras esta unión, la lignina hubiera empezado a degradarse hidrolizándose, se habría liberado del film, registrándose una disminución de peso, pero no se encontró esta degradación sino que el sistema tiende a estabilizarse. Al cambiar de

nuevo el pH a 10 para eliminar la enzima y tratar de recuperar el film se observa el mayor cambio tanto en aumento de peso como en pérdida de rigidez. Por tanto, si bien el sistema lacasa mediador no es capaz de solubilizar el film de lignina resulta evidente que lo degrada, posiblemente oxidándolo, provocando un fenómeno de hinchamiento o “swelling”.

El hinchamiento de films de lignina como efecto del pH ha sido descrito para films de lignina Kraft de coníferas para pHs superiores a 9,5 (Notley y Norgren, 2006). Los autores atribuyen este hinchamiento al incremento de grupos carboxilo en la lignina como consecuencia del proceso Kraft. En el caso de los films objeto de este estudio, la oxidación de la lacasa la está provocando el sistema lacasa mediador. Algo similar ha sido observado por Zhang *et al.* (2007) que describen cómo al tratar una pasta mecánica de pino con un sistema lacasa mediador su lignina disminuye de peso molecular y aumenta el contenido en grupos carbonilo y carboxilo. No se ha encontrado ningún estudio en el que se analice el efecto del sistema lacasa mediador sobre films de lignina con estructuras nativas.

Para confirmar que el tratamiento enzimático ha producido cambios químicos sobre el film se determinó el ángulo de contacto entre él y una gota de agua destilada. Los resultados se muestran en la figura 48, donde se observa coherencia entre estos resultados y lo descrito hasta ahora.

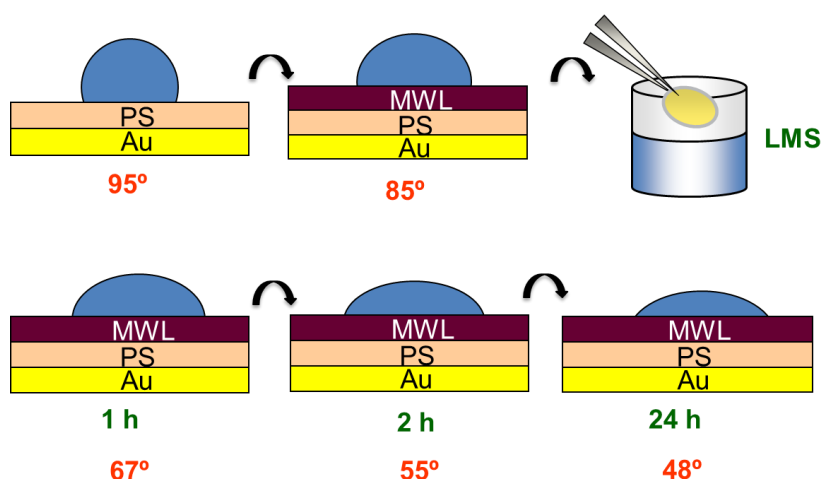


Figura 48.-Ángulo de contacto del sensor de QCM a los distintos tiempos del estudio. (Au: Base de oro del sensor; PS: Recubrimiento de poliestireno; MWL: Recubrimiento con “Milled Wood Lignin”).

Se puede comprobar, en primer lugar, que el film de lignina tiene un carácter hidrofóbico, presentando un ángulo (85°) cercano al obtenido por el poliestireno (95°). Tras incubarse con el sistema lacasa mediador este ángulo decrece rápidamente (pasa a 67° en una hora) alcanzándose un ángulo de 48° tras 24 horas de incubación. Esta disminución del ángulo de contacto refuerza la hipótesis propuesta de las modificaciones del sistema lacasa mediador sobre el film de lignina, oxidándolo y aumentando por tanto su hidrofilia.

3.3. Conclusión

El empleo de films de lignina y su degradación por el sistema lacasa mediador (LMS) parece ser una buena aproximación a la degradación de la madera causada por hongos de podredumbre blanca en las fermentaciones estudiadas en los capítulos precedentes. Esto es así porque en ambos casos no se observan importantes pérdidas de peso de lignina, indicando que no se produce una mineralización o solubilización de la misma. Además, si bien por su complejidad estructural no se ha caracterizado a fondo la molécula de lignina, se puede afirmar que ambos tratamientos modifican su estructura oxidándola y aumentando, por tanto, su hidrofilia.

V. CONCLUSIONES

De lo anteriormente descrito se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- La capacidad de un microorganismo para crecer sobre madera, degradándola selectivamente, es enormemente dependiente no sólo de la especie sino de la cepa estudiada, así como de la madera empleada como sustrato y de las condiciones de fermentación ensayadas. Por eso cabe destacar la importancia de estudiar y seleccionar los microorganismos mediante pruebas lo más aplicadas y directas posibles como es el estudio de la producción de pasta.
- La obtención de pasta mecánica tras una etapa de fermentación previa de las astillas (biopasteado) no tiene gran influencia sobre la composición de la madera ni sobre la calidad de la pasta, pero sí que provoca un ahorro de energía significativo en el desfibrado, que puede alcanzar el 15%, con pérdidas de peso inferiores al 5%.
- Las interferencias causadas por componentes de la madera dificultan una determinación sencilla de las enzimas fúngicas causantes de su degradación. No obstante, queda patente que la lacasa desempeña un papel importante en dicha degradación.
- Los componentes minoritarios de la madera desempeñan un papel fundamental en la fermentación. Este efecto es más acusado para *Pycnoporus sanguineus* que para *Trametes* sp. I-62. En ambos casos las mayores diferencias en cuanto a crecimiento y selectividad en la degradación se obtienen eliminando los compuestos solubles en acetona.
- La producción de pasta mecánica en astillas extraídas con acetona produce ahorros de energía de más de un 13%, alcanzándose el 25% si se combina con una etapa de fermentación. En este caso la calidad de la pasta sigue sin mostrar variaciones significativas. Además, los extractos obtenidos podrían tener cabida dentro de un esquema de biorrefinerías, que aportaría valor añadido a las industrias productoras de pasta.

- Se confirma el importante papel de la lacasa en la biodegradación de la madera. La caracterización de las modificaciones de films de lignina por estas enzimas es una herramienta útil en el estudio de la degradación de la lignocelulosa.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Adler, E. (1977). Lignin chemistry: past, present and future. *Wood Sci. Technol.* **11**: 169-218.
- Agrios, G.N. (Ed.), (1991). *Fitopatología*, 4ª ed. Editorial Limusa, México D. F.
- Ahmed, A., Scott, G.M., Akhtar, M. y Myers, G.C. (1998). Biokraft pulping of kenaf and its bleachability. *North American Nonwood fiber symposium*. Atlanta. 231-238.
- Ahola, S., Turon, X., Österberg, M., Laine, J. y Rojas, O.J. (2008). Enzymatic hydrolysis of native cellulose nanofibril and other cellulose model films- Effect of surface structure. *Langmuir* **24**: 11592-11599.
- Aitken, Y., Cadel, F. y Voillot, C. (1988). *Constituants fibreux des pâtes, papiers et cartons - Pratique de l'analyse*. Centre Technique de l'Industrie des Papiers, Cartons et Celluloses. Grenoble. France.
- Akhtar, M., Attrige, M.C., Myers, G.C., Kirk, T.K. y Blanchette, R.A. (1992). Biomechanical pulping of loblolly pine with different strains of the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *Tappi J.* **75**: 105-109.
- Akhtar, M., Attrige, M.C., Myers, G.C., y Blanchette, R.A. (1993). Biomechanical pulping of loblolly pine with selected white-rot fungi. *Holzforschung* **47**: 36-40.
- Akhtar, M. (1994). Biomechanical pulping of aspen wood chips with three strains of *Ceriporiopsis subvermispora*. *Holzforschung* **48**: 199-202.
- Akhtar, M., Lentz, M.J., Blanchette, R.A. y Kirk, T.K. (1997). Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. *Tappi J.* **80**: 161-164.
- Akhtar, M., Scott, G.M., Swaney, R.E. y Kirk, T.K. (1998). Overview of biomechanical and biochemical pulping research. En: *Enzyme applications in fiber processing*. Eriksson, K.-E.L. y Cavaco-Paulo, A. (Eds.). American Chemical Society. Washington DC. pp 15-26.
- Akhtar, M., Scott, G.M., Swaney, R.E. y Shipley, D.F. (2000). Biomechanical pulping: a mill scale evaluation. *Resour. Conserv. Recycl.* **28**: 241-252.

- Alexopoulos, C.J. y Mims, C.W. (Eds.), (1985). Introducción a la micología, Barcelona.
- Alic, M. y Gold, M.H. (1991). Genetics and molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. En: More gene manipulations in fungi, Bennett, J.W. y Lasure, L.L. (Eds.), Academic Press, San Diego, California. pp. 319-341.
- Ander, P. y Eriksson, K.E. (1976). The importance of phenol-oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Arch. Microbiol. **109**: 1-8.
- Arora, D.S. y Sandhu, D.K. (1984). Laccase production and wood degradation by *Trametes hirsuta*. Folia Microbiol. **29**: 310-315.
- Bajpai, P., Bhardwaj, N.K., Bajpai, P.K., y Jauhari, M.B. (1994). The impact of xylanases in bleaching of eucalyptus kraft pulp. J. Biotechnol. **36**: 1-6.
- Bajpai, P., Bajpai, P.K., Akhtar, M. y Jauhari, M.B. (2001). Bio-kraft pulping of eucalyptus with selected white-rot fungi. 8th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Helsinki, Finland. 177.
- Bajpai, P. (2004). Biological bleaching of chemical pulps. Crit. Rev. Biotechnol. **24**: 1-58.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases-occurrence and properties. FEMS Microbiol. Rev. **30**: 215-242.
- Barbosa, A.M., Dekker, R.F.M. y St. Hardy, G.E. (1996). Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete *Botryosphaeria* sp. when screened on the polymeric dye Poly R-748. Lett. Appl. Biotechnol. **23**: 93-96.
- Bavendamm, W. (1928). Über das vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzerstorenden Pilzen. Z. Pflanzenkr. Pflanzensch. **38**: 257-276.
- Berguelin, E. y Holmbom, B. (2003). Deresination of birch kraft pulp in bleaching. J. Pulp Paper Sci. **29**: 29-34.

- Berry, F.H. (1976).** *Phlebia chrysocrea* causes a heart rot of oaks and other hardwoods. Plant Dis. Rep. **60**: 308-311.
- Bertrand, G. (1896).** Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. **123**: 463-465.
- Betts, W.B. y King, P.E. (1991).** Biodegradation: natural and synthetic materials. Springer-Verlag, London.
- Bhat, M.K. y Bhat. S. (1997).** Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnol. Adv. **15**: 583-620.
- Björkman, A. (1956).** Studies on finely divided wood. Part I: Extraction of lignin with neutral solvents. Sven Papperstidn. **13**: 477-485.
- Blanchette, R.A., Burnes, T.A., Eerdmans, M.M. y Akhtar, M. (1992).** Evaluating isolates of *Phanerochaete chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispora* for use in biological pulping processes. Holzforschung, **46**: 109-115.
- Bollag, J.M. y Leonovicz, A. (1984).** Comparative studies of extracellular fungal laccases. Appl. Environ. Microbiol. **48**: 849-854.
- Bonnarme, P. y Jeffries, T.W. (1990).** Mn (II) Regulation of lignin peroxidases and manganese dependent peroxidases from lignin-degrading white-rot fungi. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 210-217.
- Botello, J.I., Gilarranz, M.A., Rodríguez, F. y Oliet, M. (1990).** Preliminary study on products distribution in alcohol pulping of *Eucalyptus globulus*. J. Chem. Technol. Biotechnol. **74**:141-148.
- Bourbonnais, R. y Paice, M.G. (1990).** Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Lett. **267**: 99-102.
- Bourbonnais, R. y 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). Appl. Microbiol. Biotechnol. **36**: 823-827.

- Bourbonnais, R. y Paice, M.G. (1996).** Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi J.* **79:** 199-204.
- Broda, P., Sims, P.F.G. y Mason, J.C. (1989).** Lignin biodegradation: a molecular approach. *Essays Biochem.* **24:** 82-114.
- Broda, P., Birch, P.R.J., Brooks, P.R. y Sims, P.F.G. (1996).** Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: gene families and gene expression for a complex process. *Molecular Microbiol.* **19:** 923-932.
- Browning, B.L. (1967).** *Methods of wood chemistry.* John Wiley, New York.
- Buswell, J.A. y Odier, E. (1987).** Lignin biodegradation. *Crit. Rev. Biotechnol.* **6:** 1-60.
- Call, H.P. y Mücke, Y. (1997).** History, overview and applications of mediated ligninolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym[®]-process). *J. Biotechnol.* **53:** 163-202.
- Calvo, A.M., Copa-Patiño, J.L., Alonso, O., y González, A.E. (1998).** Studies of the production and characterisation of laccase activity in the basidiomycete *Coriolopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. *Arch. Microbiol.* **171:** 31-36.
- Caperos, A., Romero, A. y Garcia –Ochoa, F. (1990).** Extraction of wood with solvents. *TAPPI J.* **73:** 221-224.
- Caperos, A., Romero, A. y Garcia –Ochoa, F. (1991).** Kinetics of wood extraction with solvents. *TAPPI J.* **74:** 191-196.
- Carbajo, J.M., Junca, H., Terrón, M.C., Yagüe, S., González, T., Zapico, E. y González, A.E. (2002).** Tannic acid induces transcription of laccase gene *cglcc1* in the white-rot fungus *Coriolopsis gallica*. *Can. J. Microbiol.* **48:** 1041-1047.
- Carbajo, J.M., Terrón, M.C., Silva, R.A., Revilla, E., González, A.E. y Villar, J.C. (2003).** The effect of wood extractives on *Pinus radiata* biopulping. Proceedings 28th EUCEPA Conference. I351. Lisboa.

- Carbajo, J.M., Villar, J. C., Mogollón, G., Araujo, G. A. Gómez, N., Revilla, E. y de la Macorra, C. (2004).** Evaluación de tres hongos basidiomicetos de podredumbre blanca para su aplicación al biopulpeo mecánico de pino radiata. III Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel. 165-167. Cordoba.
- Carnicero, A., Trojanowski, J., Falcón, M.A., de la Fuente, G., Kharazipour, A. y Hüttermann, A. (1992).** Lignin degrading capacities of several fungi-imperfecti isolated from soils tested by the radioespirometric method. *Microbios*. **72**: 17-25.
- Celimene, C.C., Micales, J.A., Ferge, L. y Young, R.A. (1999).** Efficacy of pinsylvins against white-rot and brown-rot fungi. *Holzforschung* **53**: 491-497.
- Chen, C.L. y Chang, H.M. (1985).** Chemistry of Lignin Biodegradation.. En: Biosynthesis and biodegradation of wood components. Higuchi. T. (Ed.), Academic Press, Orlando. pp. 535-555.
- Collins, P.J., Kotterman, M.J.J., Field, J.A. y Dobson, A.D.W. (1996).** Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccase from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4363-4567.
- Collins, P.J. y Dobson, A.D.W. (1997).** Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3444-3450.
- Constantino, C.J.L., Juliani, L.P., Botaro, V.R., Balogh, D.T., Pereira, M.R., Ticianelli, E.A., Curvelo, A.A.S. y Oliveira Jr, O.N. (1996).** Langmuir-Blodgett films from lignins. *Thin Solid Films* **284-285**: 191-194.
- Corbett, N.H. (1965).** Micro-morphological studies on the degradation of lignified cell walls by ascomycetes and fungi imperfecti. *J. Inst. Wood Sci.* **4**: 18-29.
- Cowling, E.B. y Kirk, T.K. (1976).** Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**: 95-123.
- Cullen, D. (1997).** Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *J. Biotechnol.* **53**: 273-289.

- de Koker, T.H., Zhao, J., Allsop, S.F. y Janse, B.J.H. (2000).** Isolation and enzymic characterization of South African white-rot fungi. *Mycol. Res.* **104**: 820-824.
- Dhouib, A., Hamza, M., Zouari, H., Mechichi, T., Hmidi, R., Labat, M., Martinez M.J. y Sayadi. S. (2005).** Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**:1514-1523.
- Dorado, J., Almendros, G., Field, J.A. y Sierra-Álvarez, R. (2001).** Infrared spectroscopy análisis of hemp (*Cannabis sativa*) after selective delignification by *Bjerkandera sp.* at different nitrogen levels. *Enzyme Microb. Technol.* **28**: 550-559.
- Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Østergaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H. y Davies, G.J. (1997).** Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 310-316.
- Eggert, C., Temp, U. y Eriksson, K.E. (1996a).** The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1151-1158.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D. y Eriksson, K.E. (1996b).** A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* **39**: 144-148.
- Eggert, C., Temp, U. y Eriksson K.E. (1997a).** Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS Lett.* **407**: 89-92.
- Eggert, C. (1997b).** Laccase-catalyzed formation of cinnabarinic acid is responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Microbiol. Res.* **152**: 315-318.
- Eichlerová, I., Homolka, L., Lisá, L. y Nerud, F. (2005).** Orange G and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinsum* and *Pleurotus calyptratus*. *Chemosphere* **60**: 398-404.
- Enguita, F.J., Martins, L.O., Henriques, A.O. y Carrondo, M.A. (2003).** Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *J. Biol. Chem.* **278**: 19416-19425.

- Eriksson, K.-E. y Vallander, L. (1980).** Biomechanical pulping. En: Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry and potencial applications. Volume II. Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H.-M. (Eds.) CRC Press Inc. Boca Ratón. Florida. pp. 213-224.
- Eriksson, K.-E. (1985).** Swedish developments in biotechnology related to the pulp and paper industry. *Tappi J.* **68**: 46-55.
- Eugenio, M.E., Santos, S.M., Carbajo, J.M., Martín, J.A., Martín-Sampedro, R. y Villar, J.M. (2010).** Kraft pulp biobleaching using an extracelular enzymatic fluid produced by *Pycnoporus sanguineus*. *Biores. Technol.* **101**: 1866-1870.
- Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, F. y Veness, R.G. (1994).** Enzymes and small molecular agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 235-240.
- Farrell, R.L., Blanchette, R.A., Brush, T.S., Hadar, Y., Iverson, S., Krisa, K., Wendler, P.A. y Zimmerman, W. (1993).** Cartapip™: a biopulping product for control of pitch and resin acid problems in pulp mills *J.Biotechnol.* **30**: 115-122.
- Ferraroni, M., Myasoedova, N.M., Schamatchenko, V., Leontievsky, A.A. Golovleva, L.A., Scozzafava, A. y Briganti, F. (2007).** Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. *BMC Struc. Biol.* **7**: 60-73.
- Ferraz, A., Parra, C., Freer, J., Baeza, J. y Rodríguez, J., (2000).** Characterization of white zones produced on *Pinus radiata* wood chips by *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 641-645.
- Ferraz, A., Rodríguez, J., Freer, J. y Baeza, J. (2001).** Biodegradation of *Pinus radiata* softwood by white- and brown-rot fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 31-34.
- Ferraz, A., Guerra, A., Mendoca, R., Vicentin, M.P., Aguiar, A., Masarin, F., Seabra, G.G. y Pavan, P.C. (2007).** Mill evaluation of Wood chips biotreated on a 50-ton biopulping pilot-plant and advances on understanding biopulping mechanisms. 10th International Congress on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. pp: 23-24.

- Ferraz, A., Guerra, A., Mendonça, R., Masarin, F., Vicentin, M.P., Aguiar, A., y Pavan, P.C. (2008). Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. *Enzyme Microb. Technol.* **43**: 178-185.
- Forney, L.J., Reddy, C.A. y Aust, S.D. (1982). The involvement of hidroxil radicals derived from hydrogen peroxide in lignin degradation by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **257**: 11455-11462.
- Fujita, Y., Awaji, H., Taneda, H., Matsukura, M., Hata, K., Shimoto, H., Sharyo, M., Sakaguchi, H., y Gibson, K. (1992). Recent advances in enzymic pitch control. *Tappi J.* **75**: 117-122.
- Garavaglia, S., Cambria, M.T., Miglio, M., Ragusa, S., Iacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A. y Rizzi, M. (2004). The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *J. Mol. Biol.* **342**: 1519-1531.
- García, T.A., Santiago, M.F. y Ulhoa, C.J. (2006). Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylidine. *Biotechnol. Lett.* **28**: 633-636.
- Garg, S.K. y Modi, D.R. (1999). Decolorization of pulp-paper mill effluents by White-Rot Fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.* **19**: 85-112.
- Geiger, J.P., Nicole, M., Nandris, D. y Rio, B. (1986). Root rot diseases of *Hevea brasiliensis* I. Physiological and biochemical aspects of root aggression. *Eur. J. Forest. Pathol.* **16**: 22-336.
- Gettemy, J.M., Ma, B., Alic, M. y Gold, M.H. (1998). Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 569-574.
- Giardina. P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S, y Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**: 369-385.
- Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M. y Gold, M.H. (1983). An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation

by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **114**: 1077-1083.

-Gold, M.H. y Alic, M. (1993). Molecular biology of the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microb. Review **57**: 605-622.

-Gold, M.H., Glenn, J.K. y Alic, M. (1988). Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. Methods Enzymol. **161**: 74-78.

-González, A.E., Griva, E. y Grinbergs, J. (1986). Biologische Umwandlung von Holz in Rinderfutter-“Palo podrido”. Zentralbl. Mikrobiol. **141**: 181-186.

-González, A.E., Terrón, M.C., González, T., Arana, A. y Carbajo, J.M. (2005). Biodegradación de compuestos aromáticos por hongos basidiomicetos. En: Biotecnología y medioambiente (Marín, I., Sanz, J.L. y Amils, R. Eds.) Editorial Ephemera, Madrid 2005.

-González, T., Terrón, M.C., Yagüe, S., Zapico, E., Galletti, G.C. y González, A.E. (2000). Fungal biotreatment of a Cuban distillery wastewater using *Trametes* sp. I-62 CECT 20197 monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. **14**: 1417-1424.

-González, T., Terrón, M.C., Zapico, E.J., Téllez, A. Yagüe, S., Carbajo, J.M. y González, A.E. (2003). Use of multiplex reverse transcription-PCR to study the expression of a laccase gene family in a basidiomycetous fungus. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 7083-7090.

-González, T., Terrón, M.C., Yagüe, S., Junca, H., Carbajo, J.M., Zapico, E.J., Silva, R., Arana-Cuenca, A., Téllez, A. y González, A.E. (2008). Melanoidin-containing wastewaters induce selective laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes* sp. I-62. Res. Microbiol. **159**: 103-109.

-Guerra, A., Mendonça, R. y Ferraz, A. (2002). Characterization of the residual lignins in *Pinus taeda* biodegraded by *Ceriporiopsis subvermispora* by using in situ CuO oxidation and DFRC methods. Holzforschung, **56**: 157-160.

- Guerra, A., Mendonça, R., Ferraz, A., Lu, F. y Ralph, J. (2004).** Structural characterization of lignin during *Pinus taeda* wood treatment with *Ceriporiopsis subvermispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4073-4078.
- Guerra, A., Pavan, P.C. y Ferraz, A. (2006).** Bleaching, brightness stability and chemical characteristics of *Eucalyptus grandis*-bio-TMP pulps prepared in a biopulping pilot plant. *Appita J.* **59**: 412-415.
- Gutiérrez, A., del Rio, J.C., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2001).** The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. *TRENDS Biotech.* **19**: 340-348.
- Hall, P.L., Glasser, W.G. y Drew, S.W. (1980).** Enzymatic transformations of lignin. En: *Lignin biodegradation: microbiology, chemistry, and potential applications*. Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds.) CRC, Boca Raton, Florida. USA, pp 33-49.
- Hammel, K.E., Tardone, P.J., Moen, M.A. y Price, L.A. (1989).** Biomimetic oxidation of nonphenolic lignin models by Mn(III): New observations on the oxidizability of guaiacyl and syringyl substructures. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**: 404-409.
- Hakala, T.K., Maijala, P., Konn, J. y Hatakka, A. (2004).** Evaluation of a novel wood-rotting polypores and corticoid fungi for the decay and biopulping of Norway spruce (*Picea abies*) wood. *Enzyme Microb. Technol.* **34**: 255-263.
- Hatakka, A., Lundell, T.K., Tervilawilo, A.L.M. y Brunow, G. (1991).** Metabolism of non-phenolic O-4 lignin model compounds by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 270-277.
- Hatakka, A. (1994).** Lignin-modifying enzymes from deleted white-rot fungi: production and role in lignin biodegradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 125-135.
- Hernández, M., Hernández-Coronado, M.J., Ball, A.S. y Arias, M.E. (2001).** Degradation of alkali-lignin residues from solid-state fermentation of wheat straw by streptomycetes. *Biodegradation.* **12**: 219-223.

- Hernández, M., Hernández-Coronado, M.J., Pérez, M.I., Revilla, E., Villar J.C., Ball, A.S., Viikari, L. and Arias, M.E. (2005).** Biomechanical pulping of spruce wood chips with *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 and handsheet characterization. *Holzforschung* **59**: 173-177.
- Higham, R.R.A. (1968).** A handbook of papermaking. The technology of pulp, paper, and board manufacture. Business Books Limited. London.
- Higuchi, T. (1985).** Degradative pathway of lignin model compounds. Biosynthesis and biodegradation of wood components. En: Biosynthesis and biodegradation of wood components. Higuchi, T. (Ed.). Academic Press, Orlando. pp.: 557-578.
- Higuchi, T. (1990).** Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* **24**: 23-63.
- Hillis, W.E. (1962).** Wood extractives and their significance to the pulp and paper industries. Academic Press. London.
- Janusz, G., Kucharzyk, K.H., Pawlik, A., Staszczak, M. y Paszczyński, A.J. (2013).** Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* **52**: 1-12.
- Johannes, C. y Majcherczyk, A. (2000).** Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediators systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 524-528.
- Johansson, L.S. (2002).** Monitoring fibre surfaces with XPS in papermaking process. *Mikrochim. Acta.* **138**: 217-223.
- Johansson, T. y Nyman, P.O. (1987).** A manganese (II)-dependent extracellular peroxidase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Acta Chemica Scand.* **42**: 762-765.
- Jönsson, L. y Nyman, P.O. (1992).** Characterization of a lignin peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biochimie.* **74**:177-182.

- Käärik, A.A. (1974).** Decomposition of wood. En: Biology of plant litter decomposition. Vol 1. Dickinson CH., Pugh GJF. Eds. Academic Press. New York.
- Kashino, Y., Nishida, T., Takahara, Y., Fujita, K., Kondo, R. y Sakai, K. (1993).** Biomechanical pulping using white-rot fungus IZU-154. Tappi J. **76**: 167-171.
- Kawai, S., Umezawa, T. y Higuchi, T. (1987).** *p*-Benzoquinone monoketals, novel degradation products of β -O-4 lignin model compounds by *Coriolus versicolor* and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. **210**: 61-65.
- Kawai, S., Umezawa, T. y Higuchi, T. (1988).** Degradation mechanism of phenolic β -1,4 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. Archiv. Biochem. Biophys. **262**: 99-110.
- Ke, J., Laskar, D. D. y Chen, S. (2011).** Biodegradation of hardwood lignocellulosics by the western poplar clearwing borer, *Paranthrene robiniae* (Hy. Edwards). Biomacromolecules **12**: 1610-1620.
- Keim, K. (1966).** El papel. Asociación de Investigación Técnica de la Industria Papelera Española. Madrid.
- Kersten, P.J., Kalyanaraman, B., Hammel, K.E., Reinhammar, B. y Kirk, T.K. (1990).** Comparison of lignin peroxidase, horseredish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. Biochem. J. **268**: 475-480.
- Kiiskinen, L.-L., Rättö, M. y Kruus, K. (2004).** Screening for novel laccase-producing microbes. J. Appl. Microbiol. **97**: 640-646.
- Kimura, Y., Asada, Y., Oka, T. y Kuwahara, M. (1991).** Molecular analysis of a *Bjerkandera adusta* lignin peroxidase. Gen. Appl. Microbial. Biotechnol. **35**: 510-514.
- Kirby, R. (2006).** Actinomycetes and lignin degradation. Adv. Appl. Microbiol. **58**: 125-168.
- Kirk, T.K. y Chang, H.-M. (1981).** Potential applications of bio-ligninolytic systems. Enzyme Microb. Technol. **3**: 189-196.

- Kirk, T.K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K.E. y Farrell, R.L (1986).** Production of multiple ligninases by *P. chrysosporium*. Effect of the selected growth conditions and the use of a mutant strain. *Enzyme Microb. Technol.* **8**: 27-32.
- Kirk, T.K. (1987).** Lignin-degrading enzymes. *Phil. Trans. Roy. Soc.* **321**: 461-474.
- Kirk, T.K. y Farrell, R.L. (1987).** Enzymatic “combustion”. The microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Biochem* **41**: 465-505.
- Kollmann, F. (1959).** Tecnología de la madera y sus aplicaciones. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- Kutsuki, H. y Gold, M.H. (1982).** Generation of hydroxyl radicals and its involvement in lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **251**: 688-696.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A. y Gold, M.H. (1984).** Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* **169**: 247-250.
- Laborde, J. (1896).** Sur lacasse des vins C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. **123**: 1074-1075.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leatham, G.F., Myers, G.C. y Wegner, T.H. (1990).** Biomechanical pulping of aspen chips: energy savings resulting from different fungal treatments. *Tappi J.* **73**: 197-200.
- Lee, C.K., Darah, I. y Ibrahim, C.O. (2007).** Enzymatic deinking of printed office waste papers: Some governing parameters on deinking efficiency. *Biores. Technol.* **98**: 1684-1689.
- Lee, J.Y., Lee, H.L., Lim, H.W. y Youn, H.J. (2008).** Renoval of fluorescent whitening agents from recycled fibers using enzyme. *Nord. Pulp Paper Res. J.* **23**: 19-23.

- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N-S., Hofrichter, M. y Rogalski, J. (1999).** Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genet. Biol.* **27**: 175-185.
- Leonowicz, A., Trojanowski, J. y Orlic, B. (1979).** Basidiomycetes: apparent activity of the inducible and constitutive forms of laccase with phenolic substrates. *Acta Biochim. Pol.* **25**: 369-378.
- Leonowicz, A., Cho, N-S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D. y Rogalski, J. (2001).** Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* **41**: 185-227.
- Leonowicz, A. y Trojanowski, J. (1975).** Induction of laccase by ferulic acid in basidiomycetes. *Acta Biochim. Pol.* **22**: 291-295.
- Levin, L., Villalba, L., Da Re, V., Forchiassin, F. y Papinutti, L. (2007).** Comparative studies of loblolly pine biodegradation and enzyme production by Argentinean white rot fungi focused on biopulping processes. *Process Biochem.* **42**: 995-1002.
- Liers, L., Arnstadt, T., Ullrich, R. y Hofrichter, M. (2011).** Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood- and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood. *FEMS Microbiol. Ecol.* **78**: 91-102.
- Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Herpoël-Gimbert, I., Sigoillot, J.-C. y Lesage-Messen, L. (2011).** Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**: 1129-1149.
- López, D., Morales, B., Vidal, T., Colom, J.F. y Torres, A.L. (2001).** Using amylases to optimize the desintegration process. *Afinidad* **58**: 169-174.
- Lundquist, K. y Kirk, T.K. (1978).** De novo synthesis and decomposition of veratryl alcohol by a lignin-degrading basidiomycete. *Phytochemistry* **17**: 1676.

- Lundquist, K. y Kristersson, P. (1985).** Exhaustive laccase-catalysed of a lignin model compound (vanillyl glycol) produces methanol and polymeric quinoid products. *Biochem. J.* **229**: 277-279.
- Lyashenko, A.V., Bento, I., Zaitsev, V.N., Zhukhlistova, N.E., Zhukova, Y.N., Gabdoulkhakov, A.G., Morgunova, E.Y., Voelter, W., Kachalova, G.S., Stepanova, E.V., Koroleva, O.V., Lamzin, V.S., Tishkov, V.I., Betzel, C., Lindley, P.F. y Mikhailov, A.M. (2006).** X-ray structural studies of the fungal laccase from *Cerrena maxima*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**: 963-973.
- Machuca, A. y Ferraz, A. (2001).** Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. *Enzyme Microb. Technol.* **29**: 386-391.
- Macorra, C. (2004).** Tratamientos de impregnación con álcali y peróxido de hidrógeno para reducir el consumo energético en la producción de pastas mecánicas. Modificaciones de la molécula de lignina. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Malmström, B.G. (1982).** Enzimology of oxygen. *Annu. Rev. Biochem.* **51**: 21-59.
- Mansur, M., Suárez, T., Fernández-Larrea, J.B., Brizuela, M.A. y González, A.E. (1997).** Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2637-2646.
- Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Carbajo, J.M. y Villar, J.M. (2011).** Combination of steam explosion and laccase-mediator treatments prior to *Eucalyptus globulus* kraft pulping. *Biores. Technol.* **102**: 7183-7189.
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J. Gutiérrez, A. y del Río, J.C. (2005).** Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* **8**: 195-204.
- Martínez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Gelpke, M.D., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K.G., Ramaiya, P., Detter, J.C., Larimer, F., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D. y Rokhsar, D. (2004).** Genome sequence of the

lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. Nat. Biotechnol. **22**: 695 – 700.

-**Mason, H.S. (1955)**. Comparative biochemistry of the phenolase complex. Adv. Enzymol. **16**: 105-184.

-**Mayer, A.M. y Staples, R.C. (2002)**. Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry **60**: 551-565.

-**Mechichi, T., Mhiri, N. y Sayadi, S. (2006)**. Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. Chemosphere **64**: 998-1005.

-**Mendoça, R., Guerra, A. y Ferraz, A. (2001)**. Biopulping of *Pinus taeda* wood chips for production of high yield kraft pulps. 8th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Helsinki, Finland. 180.

-**Mester, T. y Field, J.A. (1998)**. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. J. Biol. Chem. **273**: 15412-15417.

-**Mohiuddin, G., Rashid, M. y Hasib, S.A. (2001)**. Bio-pulping of whole jute plants (two varieties) with white-rot fungus in soda process. 8th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry., Helsinki, Finland. 178-179.

-**Moore-Landecker, E. (1996)**. Fundamentals of the fungi. 4th ed. Prentice-Hall, Inc. New Jersey.

-**Moore, R.T. y McAlear, J.R. (1962)**. Fine structure of mycota 7. Am. J. Bot. **49**: 86-94.

-**Morita, S., Yakazi, Y. y Johnson, G.C. (2001)**. Mycelium growth promotion by water extractives from the inner bark of radiata pine (*Pinus radiata* D. Don). Holzforschung, **55**: 155-158.

-**Morohoshi, N., Wariishi, H., Muraishi, C., Nagai, T. y Haraguchi, T. (1987)**. Degradation of lignin by the extracellular enzymes of *Coriolus versicolor*. IV.

Properties of three laccase fractions fractionated from the extracellular enzymes. *Mokuzai Gakkaishi* **33**: 218-225.

-**Mosai, S., Wolfaardt, J.F., Prior, B.A. y Christov, L.P. (1999)**. Evaluation of selected white rot fungi for biosulfite pulping. *Biores. Technol.* **68**: 89-93.

-**Mot, A. C. y Silaghi-Dumitrescu, R. (2012)**. Laccases: Complex architectures for one-electron oxidations. *Biochemistry (Moscow)* **77**: 1395-1407.

-**Mswaka, A.Y. y Magan, N. (1998)**. Wood degradation, and cellulose and ligninase production, by *Trametes* and other wood-inhabiting basidiomycetes from indigenous forests of Zimbabwe. *Mycol. Res.* **102**: 1399-1404.

-**Myers, G.C., Leatham, G.F., Wegner, T.H. y Blanchette, R.A. (1988)**. Fungal pretreatment of aspen chips improves strength of refiner mechanical pulp. *Tappi J.* **71**: 105-108.

-**Nakamura, K. y Go, N. (2005)**. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 2050-2066.

-**Notley, S.M. y Norgren, M. (2006)**. Measurement of interaction forces between lignin and cellulose as a function of aqueous electrolyte solution conditions. *Langmuir* **22**: 11199-11204.

-**Odendhal, S. (1994)**. Environmental protection and consumer demands: Overview of trends and impacts. *Pulp Paper Canada.* **95**: 30-34.

-**Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. y Sannia, G. (1997)**. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.* **272**: 31301-31307.

-**Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. y Sannia, G. (2000)**. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 920-924.

-**Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabee, W., Pye, K., Xiao, Z., Zhang, X. y Saddler, J. (2005)**. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping:

Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnol. Bioeng.* **90**: 473-481.

-Park, S.-B., Lee., J.-M. y Eom, T.J. (2004). The control of sticky contaminants with enzymes in the recycling of wastepaper. *J. Ind. Eng. Chem.* **10**: 72-77.

-Pasti, M.B. y Crawford D.L. (1991). Relationship between the abilities of streptomycetes to decolorize three antrone-type dyes and to degrade lignocellulose. *Can. J. Microbiol.* **37**: 902-907.

-Paszczynski, A., Crawford, R.L. y Huynh, V.B. (1988). Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Methods Enzymol.* **161**: 264-270.

-Pease, E.A. y Tien, M. (1992). Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **174**: 3532-3540.

-Peck, V. y Daley, R. (1994). Toward a "Greener" pulp and paper industry. *Environ. Sci. Technol.* **28**: 524A-527A.

-Peraza, C., Guindeo, A., García, L. y Laín, L. (1993). Tecnología de la madera I. Ed. Fundación Conde del Valle de Salazar. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid.

-Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T. y Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* **5**: 53-63.

-Périé, F.H. y Gold, M.H. (1991). Manganese regulation of manganese peroxidase from *P. chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **174**: 3532-3540.

-Phillipi, F. (1893). Die Pilze Chiles, soweit dieselden als Nahwngsmitted gebraucht weiden. *Haldwigia.* **32**: 115.

-Pickard, M.A. y Westlake, D.S.W. (1970). Fungal metabolism of flavonoids. Purification, properties, and substrate specificity of an inducible laccase from *Polyporus versicolor* PRL 572. *Can. J. Biochem.* **48**: 1351-1358.

- Piontek, K., Antorini, M. y Choinowski, T. (2002).** Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* **277**: 37663-37669.
- Pointing, S.B. (2001).** Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 20-33.
- Popp, J.L. y Kirk, T.K. (1991).** Oxidation of methoxybenzenes by manganese peroxidase and by Mn³⁺. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**: 145 -148.
- Reddy, C.A. (1993).** An overview of the recent physiology and molecular biology of lignin peroxidases genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* **30**: 91-107.
- Reid, I.D. y Seifert K.A. (1982).** Effect of an atmosphere of oxygen on growth, respiration and lignin degradation by white-rot fungi. *Can. J. Bot.* **60**: 252-269.
- Reid, I.D. (1995).** Biodegradation of lignin. *Can. J. Bot.* **73 (Suppl. 1)**: S1011-S1018.
- Reinhammar, B. y Malstrom, B.G. (1981).** Blue copper-containing oxidases. En: Copper proteins. Metal ions in biology. Vol.3, Spiro, T.G. (Ed.), Willey, New York. pp.109-149.
- Reinhammar, B. (1984).** Laccase.. En: Copper proteins and copper enzymes. Vol.3, Lontie, R. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida. pp.1-35.
- Rios, S. y Eyzaguirre, J. (1992).** Conditions for selective degradation of lignin by the fungus *Ganoderma australis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 667-669.
- Rodriguez-Couto S. y Toca-Herrera J.L. (2006).** Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol. Adv.* **24**: 500-513.
- Rösch, R. (1965).** Über die Funktion der Phenoloxidasen holzabbauender Pilze. *Holz und Organismen.* **12**: 173-185.
- Rubilar, O., Diez, M.C. y Gianfreda, L. (2008).** Transformation of chlorinated phenolic compounds by white rot fungi. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **38**: 227-268.

- Rudman, P. (1965).** The causes of natural durability in timber. Pt XVIII) Further notes on the fungi toxicity of wood extractives. *Holzforschung* **19**: 57-58.
- Rüttimann-Johnson, C., Salas, L., Vicuña, R. y Kirk, T.K. (1993).** Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1792-1797.
- Sabharwal, H.S., Akhtar, M., Blanchette, R.A. y Young, R.A. (1994).** Biomechanical pulping of kenaf. *Tappi J.* **77**: 105-112.
- Sabharwal, H.S., Akhtar, M., Blanchette, R.A. y Young, R.A. (1995).** Refiner mechanical and biomechanical pulping of jute. *Holzforschung* **49**: 537-544.
- Sachs, I.B., Leatham, G.F., Myers, G.C., y Wegner, T.H. (1990).** Distinguishing characteristics of biomechanical pulp. *Tappi J.* **73**: 249.254.
- Santoyo, F., González, A.E., Terrón, M.C., Ramírez, L. y Pisabarro, A. (2008).** Quantitative linkage mapping of lignin-degrading enzymatic activities in *Pleurotus ostreatus*. *Enz. Microb. Technol.* **43**:137-143.
- Sarkanen, K.V. y Ludwig, C.H. (Eds.) (1971).** Lignins occurrence, formation, structure and reactions. Wiley-Interscience. Nueva York.
- Savory, J.G. (1954).** Breakdown of timber by ascomycetes and fungi imperfecti. *Ann. Appl. Biol.* **41**: 336-347.
- Scalbert, A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30**: 3875-3883.
- Scheffer, T.C., Lachmund, H.g. y Hopp, H. (1944).** Relation between hot-water extractives and decay resistance of black locust wood. *J. Agric. Res.* **68**: 415-426.
- Schick Zapanta, L. y Tien, M. (1997).** The roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. *J. Biotechnol.* **53**: 93-102.
- Scott, G.M., Akhtar, M. y Lentz, M. (1995).** Fungal pretreatment of wood chips for sulfite pulping. *Proceedings of the 1995 TAPPI Pulping Conference* , Atlanta GA: TAPPI Press. 355-361.

- Scott, G.M., Akhtar, M., Lentz, M.J., Kirk, T.K. y Swaney, R. (1998).** New technology for papermaking: commercializing biopulping. *Tappi J.* **81:** 220–225.
- Singh, D. y Chen, S. (2008).** The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81:** 399-417.
- Singh, A.P. y Singh, T. (2014).** Biotechnological applications of wood-rooting fungi: a review. *Biomass Bioenerg.* **62:** 198-206.
- Singleton, V.L. y Rossi, J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* **16:** 144-158.
- Smook, G.A. (1990).** Manual para técnicos de pulpa y papel. TAPPI Press, Atlanta.
- Srebotnik, E. y Messner, K. (1994).** A simple method that uses differential staining and light microscopy to assess the selectivity of wood delignification by white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **60:** 1383-1986.
- Srebotnik, W., Jensen Jr, K.A. y Hammel, K.W. (1994).** Fungal degradation of recalcitrant nonphenolic lignin structures without lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91:** 12794-12797.
- Sterjiades, R., Dean, J.F.D. y Eriksson, K.E. (1992).** Laccase from *Sycamore* maple (*Acer pseudoplanatus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiol.* **99:** 1162-1168.
- Stewart, P., Kersten, P., van den Wymeleberg, A., Gaskell, J. y Cullen, D. (1992).** Lignin Peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*: Complex regulation by carbon and nitrogen limitation and identification of a second dimorphic chromosome. *J. Bacteriol.* **174:** 5036-5042.
- Stoll, D., Stålbrand, H. y Warren, R.A.J. (1999).** Mannan-Degrading enzymes from *Cellulomonas fimi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65:** 2598-2605.
- Sullivan, G. y Henry, E.D. (1971).** Occurrence and distribution of phenoxazinone pigments in the genus *Pycnoporus*. *J. Pharm. Sci.* **60:** 1097-1098.

- Sundman, V. y Näse, L. (1971). A simple plate test for direct visualization of biological lignin degradation. *Pap Timber*. **53**: 67-71.
- Talbot, P.H.B. (1971). *Principles of fungal taxonomy*. St. Martin's Press, New York.
- Tammelin, T., Österberg, M., Johansson, L.S. y Laine, J. (2006). Preparation of lignin and extractive model surfaces by using spincoating technique – Application for QCM-D studies. *Nordic Pulp Paper Res. J.* **21**: 444—450.
- Terrón, M.C., Martín, C., Manzanares, P., Galletti, G.C. y González, A.E. (1993). Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of lignin from paper-industry effluents decolorized by *Trametes versicolor*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **7**: 659-661.
- Terrón, M.C., González, T., Carbajo, J.M., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., Téllez, A., Dobson, A.D.W. y González, A.E. (2004a). Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on *lcc* gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genet. Biol.* **69**: 7083-7090.
- Terrón, M.C., López-Fernández, M., Carbajo, J.M., Hunca, H., Téllez, A., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., González, T. y González, A.E. (2004b). Tannic acid interferes with the commonly used laccase-detection assay based on ABTS as the substrate. *Biochimie* **86**: 519-522.
- Thurston, C. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19-26.
- Tien, M. y Kirk, T.K. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* **221**: 661-663.
- Tortella, G.R., Rubilar, O., Gianfreda, L., Valenzuela E. y Diez M.C. (2008). Enzymatic characterization of Chilean native wood-rotting fungi for potential use in the bioremediation of polluted environments with chlorophenols. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 2805-2818.
- Vicuña, R. (1988). Bacterial degradation of lignin. *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 646-655.

- Vicuña, R., Escobar, F., Osses, M. y Jara, A. (1997).** Bleaching of eucalyptus kraft pulp with commercial xylanases. *Biotechnol. Lett.* **19**: 575–578.
- Viesturs, U., Leite, M., Eisimonte, M., Eremeeva, T. y Treimanis, A. (1999).** Biological deinking technology for the recycling of office waste papers. *Biores. Technol.* **67**: 255-265.
- Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Linko, M. y Sundquist, J. (1986).** Bleaching with enzymes. En: *Proceedings 3rd Int. Conf. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* pp.67–69.
- Villar, J.C. (2008).** Biotecnología aplicada a la fabricación de pulpa y papel. En: *Panorama de la industria de celulosa y papel en Iberoamérica 2008*. Area, M.C. (Ed.) Misiones, Argentina. Pp 313-348.
- Von Arx, J.A. (1981).** The genera of fungi sporulating in pure culture. Vaduz. J. Cramer.
- Wall, M.B, Stafford, G., Noel, Y., Fritz, A., Iverson, S. y Farrell, R.L. (1995).** Treatment with *Ophiostoma piliferum* improves chemical pulping efficiency. En: *Proceedings of the 6th International Conference in Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Advances in Applied and Fundamental Research*, 205-210.
- Wariishi, H., Valli, K. y Gold, M.H. (1992).** Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *J. Biol. Chem.* **267**: 23688-23695.
- Widsten, P., Nguyen, T., Laine, J.E., Malmqvist, A. y Welander, T. (2004).** In-mill removal of TMP whitewater contaminants by biological treatment in an aerobic bioreactor used in conjunction with microfiltration and laccase treatment. *Nord. Pulp Pap. Res. J.* **19**: 379-383.
- Widsten, P. y Kandelbauer, A. (2008).** Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme Microb. Technol.* **42**: 293-307.

- Wise, L.E., Murphy, M. y D'Adieco, A. (1946).** Chlorite holocellulose, its fractionation and beating on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses. Paper Trade J. **122**: 35-43.
- Wolfaardt, F., Taljaard, J.L., Jacobs, A., Male, J.R. y Rabie, C.J. (2004).** Assessment of wood-inhabiting basidiomycetes pulping of softwood chips. Biores. Technol. **95**: 25–30.
- Wolfenden, B.S. y Willson, R.L. (1982).** Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). J. Chem. Soc. Perkin Trans. **1982**: 805-812.
- Wong, D.W.S. (2009).** Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. Appl. Biochem. Biotechnol. **157**: 174-209.
- Wong, K.K.Y., Yokota, S., Saddler, J.N. y de Jong, E. (1996).** Enzymatic hydrolysis of lignin-carbohydrate complexes isolated from kraft pulp. J. Wood Chem. Technol. **16**: 121-138.
- Wu, S. y Argyropoulos, D.S. (2003).** An improved method for isolating lignin in high yield and purity. J. Pulp Paper Sci. **29**: 235-240.
- Yagüe, S., Terrón, M.C., González, T., Zapico, E., Bocchini, P., Galletti, G.C. y González, A.E. (2000).** Biotreatment of a rich-tannin beer-factory wastewater with the white-rot basidiomycete *Coriolopsis gallica* monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. **14**: 905-910.
- Yoshida, H. (1883).** Chemistry of lacquer (Urishi) part 1. J. Chem. Soc. (Tokio). **43**: 472-486.
- Zadrazil, F., Grinbergs, J. y González, A. (1982).** “Palo podrido”. Decomposed wood used as feed. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **15**: 167-171.
- Zhang, A.P., Qin, M.H., Sun, R.C., Xu, Q.H., Fu, Y.J. y Liu, C.F. (2007).** Characterization of Masson pine stone groundwood pulp modified with laccase/mediator system. Cell. Chem. Technol. **41**: 63-75.

-Zollner, H.K. y Schroeder, L.R. (1998). Enzymatic deinking of nonimpact printed office paper with alpha-amylase. *Tappi J.* **81:** 166-170.

