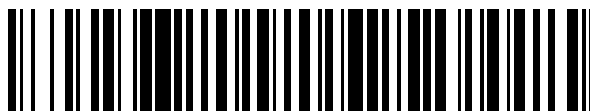


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 254**

51 Int. Cl.:

C08H 8/00 (2010.01)

C12P 19/00 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C08H 7/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2008 E 08104917 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2138528**

54 Título: **Procedimiento para la producción de madera y/o una materia derivada de la madera con un contenido reducido de materia de extracto de madera y/o VOC**

30 Prioridad:

23.06.2008 EP 08011385

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.12.2014

73 Titular/es:

**FRITZ EGGER GMBH & CO. OG (100.0%)
Tiroler Strasse 16
3105 Unterradlberg , AT**

72 Inventor/es:

**SREBOTNIK, EWALD y
TERS, THOMAS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 524 254 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de madera y/o una materia derivada de la madera con un contenido reducido de materia de extracto de madera y/o VOC

5 La invención se refiere a un procedimiento para la producción de madera y/o una materia derivada de la madera con un contenido reducido de materia de extracto de madera y/o VOC. Además, la invención se refiere a madera o a una materia derivada de la madera que se produce con un procedimiento de este tipo. También es objetivo de la invención el uso de un sistema de mediador de enzima, en particular un sistema de mediador de lacasa y/o lipoxidasas para la producción de madera o una materia derivada de la madera con un contenido reducido de materia de extracto de madera y/o VOC.

15 Básicamente son conocidos los procedimientos en los que se reduce el contenido de materias de extracto de madera de materiales que contienen celulosa. Las materias de extracto de madera representan una mezcla de distintos ingredientes de madera que son solubles en disolventes orgánicos polares y/o apolares y/o agua, por ejemplo, en agua, alcohol, benceno, hexano, ciclohexano, éter y/o acetona. Las materias de extracto de madera que, por lo habitual, representan de aproximadamente el 3 % al 10 % del peso de la madera contienen, por ejemplo, hidrocarburos de bajo peso molecular, terpenos, ácidos aromáticos y alifáticos, alcoholes, taninos, colorantes, proteínas, alcaloides y ligninas solubles.

20 Las materias de extracto de madera desempeñan un papel esencial durante el procesamiento de madera hasta dar pasta de madera así como durante la producción de papel. De este modo, las materias de extracto de madera lipófilas que están compuestas, principalmente, de ácidos grasos de cadena larga, ácidos resínicos, triglicéridos, esteroides, ésteres de esteroles, ceras y alcoholes grasos (D. Fengel y G. Wegener, Wood chemistry, ultrastructure, reactions. 1989, Berlín: Walter de Gruyter), tienden a la formación de pequeñas gotas. Estas pequeñas gotas se pueden acumular entonces en la propia pasta de madera o en el agua residual. Además, forman deposiciones pegajosas sobre máquinas papeleras (E. L. Black y L. H. Allen, Pitch control, wood resin and deresination. 2000, Atlanta: Tappi Press).

30 Los efectos que se han mencionado anteriormente son conocidos como "problemas de brea" y conducen a una vida útil reducida de máquinas así como a una mayor toxicidad del agua residual y a una calidad reducida de la pasta de madera (W. E. Hillis y M. Sumimoto, Effect of extractive on pulping. Natural products of woody plants ii, ed. J. W. Rowe. 1989: Springer Verlag. 880-920). Además de compuestos lipófilos, las materias de extracto de madera contienen también compuestos polares, principalmente fenólicos. Estos conducen con frecuencia a decoloraciones indeseadas en pastas de madera mecánicas (J. Polcin y W. H. Rapson, Sapwood and heartwood of western hemlock and jack pine. Part ii. Heat stability of extractives, Canadian Pulp and Paper Magazine 1971, 72, 324-330).

40 Pero las materias de extracto de madera no tienen un efecto negativo únicamente en la producción de pasta de madera y de papel. De este modo, las materias de extracto de madera influyen esencialmente en las propiedades de materiales que se emplean en la industria procesadora de madera, tales como, por ejemplo, las propiedades superficiales de la madera así como su comportamiento de secado o encolado.

45 Por consiguiente, existe una necesidad de reducir la cantidad de materias de extracto de madera en madera (en particular madera maciza) y materias derivadas de la madera (en particular tiras de madera, virutas de madera o fibras de madera), por ejemplo, para la producción de planchas de madera.

50 Pero la presencia de materias de extracto de madera en materiales que contienen celulosa es desventajosa también por otros motivos. De este modo, con calor, por ejemplo, en etapas de secado tales como las que se llevan a cabo habitualmente en la industria procesadora de la madera, los compuestos insaturados que aparecen en las materias de extracto de madera, por ejemplo, grasas o ácidos resínicos, se oxidan mediante inducción térmica, formándose compuestos orgánicos volátiles (VOC). Además, en particular la liberación de aldehídos de cadena corta conduce a la generación de un olor desagradable del producto final.

55 También a causa de la degradación química, en particular oxidativa de materias de extracto de madera se pueden producir VOC. Otras fuentes de VOC son la degradación térmica y/o química de lignina, hemicelulosa o celulosa así como de resinas. La liberación de VOC se ve favorecida además también por un aumento de la superficie de la partícula durante el procesamiento de productos que contienen celulosa.

60 Además de emisiones de formaldehído causadas por parte del aglutinante, las emisiones de VOC desempeñan un papel creciente en la valoración de las cargas de volumen de piezas constructivas y materias primas de materiales que contienen celulosa. En este caso es problemática en particular la liberación de monoterpenos, sesquiterpenos, fenoles (en particular guayacol) así como alcoholes alifáticos de bajo peso molecular y aldehídos (en particular hexanal y heptanol) que son emitidos por materiales que contienen celulosa. La emisión de VOC está sometida cada vez más, a causa de los temidos riesgos sanitarios, a restricciones. Por este motivo existe una gran necesidad en la industria de la madera y del plástico de reducir las emisiones de VOC de productos que contienen celulosa.

Es conocida una serie de procedimientos físico-químicos para la retirada de materias de extracto de madera. En los últimos tiempos se han propuesto además distintos procedimientos biotecnológicos, en particular mediante el uso de enzimas, como alternativa a estos procedimientos. Los procedimientos enzimáticos presentan la ventaja de que en general son sustancialmente más selectivos, proporcionan menos productos secundarios indeseados y, habitualmente, se pueden llevar a cabo en condiciones sustancialmente más cuidadosas que los procedimientos físico-químicos. Por ello se puede evitar sustancialmente la formación de sustancias tóxicas y de otras sustancias perjudiciales. Además, el uso de enzimas evita sustancialmente el empleo de metales pesados tales como Fe o Cu como catalizadores.

En los procedimientos biotecnológicos se usan habitualmente microorganismos o enzimas producidas por microorganismos. De este modo se han ensayado, por ejemplo mutaciones albinas de hongos de coloración de la albura (*sap stain fungi*) (principalmente *Ophiostoma spp.*), que entretanto están disponibles en el mercado, y algunos hongos de podredumbre blanca (*white rot fungi*) en relación con su capacidad de degradar compuestos lipófilos durante el almacenamiento (M. J. Martínez-Inigo, et al., Time course of fungal removal of lipophilic extractives from eucalyptus globulus wood, *Journal of Biotechnology* 2000, 84, 119-126; M. J. Martínez-Inigo, et al., Biodegradability of extractives in sapwood and heartwood from scots pine by sapstain and white rot fungi, *Holzforschung* 1999, 53(3), 247-252; T. A. van Beek, et al., Fungal bio-treatment of spruce wood with *trametes versicolor* for pitch control: Influence on extractive contents, pulping process parameters, paper quality and effluent toxicity, *Bioresource Technology* 2007, 98, 302-311).

También el tratamiento de pasta de madera y agua residual con enzimas mostró resultados prometedores. De este modo se usan las lipasas disponibles en el mercado desde los años 90 durante el tratamiento rutinario de pasta de madera blanda mecánica (K. Hata, et al., Mill-scale application of enzymatic pitch control during paper production. *Enzymes for pulp and paper processing*, ed. L. Viikari y T. W. Jeffries. Vol. 655. 1996: ACS. 280-296). Las lipasas son capaces de hidrolizar la mayoría de los triglicéridos de pasta de madera en pocas horas. Pero no son capaces de degradar ésteres de esteroles y otras sustancias que forman brea. Las lacasas se han empleado también para blanquear distintas pastas de madera de papel (H. P. Call e I. Mücke, History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (lignozym-process), *Journal of Biotechnology* 1997, 53, 163-202), para la modificación de fibras de madera (C. Felby, J. Hassingboe y M. Lund, Pilotscale production of fiberboards made by laccase oxidized wood fibers: Board properties and evidence for cross-linking of lignin, *Enzyme and Microbial Technology* 2002, 31(6), 736-741) y para la funcionalización de partículas de madera (K. Fackler, et al., Laccase-catalyzed functionalization with 4-hydroxy-3-methoxybenzylurea significantly improves internal bond of particle boards, *Holzforschung* 2008, 62(2), 223). Gutierrez et al. pudieron mostrar que los sistemas de mediador de lacasa se pueden emplear exitosamente para retirar materias de extracto de madera lipófilas en pasta de madera (A. Gutierrez, et al., Enzymatic removal of free and conjugated sterols forming pitch deposits in environmentally sound bleaching of eucalypt paper pulp, *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 3416-3422; A. Gutierrez, et al., Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase-mediator-system, *Biotechnology* 2006, 72, 845-851).

Por el documento DE 10 2006 057 566 A1 es conocido un procedimiento para la producción de una materia prima reducida en emisiones que está compuesta de partículas de lignocelulosa o sus constituyentes principales químicos o que contiene los mismos como componente. Se lleva a cabo una reacción catalizada enzimáticamente dado el caso en presencia de tensioactivos; reticulándose o degradándose sustancias relevantes para el olor y las emisiones de las partículas de materia prima. Gracias a una posterior deshidratación de la suspensión se vuelven a retirar los constituyentes de bajo peso molecular así como las enzimas.

En los procedimientos conocidos para la reducción del contenido en materias de extracto de madera es desventajoso que se llevan a cabo en condiciones que son típicas de reacciones catalizadas enzimáticamente sencillas. De este modo, por ejemplo, en los procedimientos enzimáticos conocidos se emplea una cantidad comparativamente grande de catalizador de oxidación y/o mediador o coadyuvantes. Son habituales cantidades de al menos el 0,02 % en peso de catalizador y/o el 1 % en peso de mediador en relación con la cantidad total de sustancia seca de materia prima. Por lo tanto, en los procedimientos conocidos permanece una cantidad comparativamente grande de catalizador y dado el caso mediador o coadyuvante en los materiales de madera tratados. Pero la permanencia de estas sustancias en los materiales de madera es indeseada debido a que su presencia tiene un efecto negativo sobre las propiedades de procesamiento tales como, por ejemplo, capacidad de encolado. Para evitar esto, en los procedimientos conocidos, el catalizador y dado el caso coadyuvante o mediador se tienen que separar en otra etapa, lo que está asociado a una complejidad aumentada en cuanto a la técnica del procedimiento.

La invención se basaba en el objetivo de facilitar un procedimiento del tipo que se ha mencionado al principio que no presentase las desventajas que se han mencionado anteriormente.

Este objetivo se consigue de acuerdo con la invención mediante un procedimiento para la producción de un material a base de madera y/o una materia derivada de la madera con un contenido reducido de materia de extracto de madera y/o VOC, en el que se trata la madera y/o una materia derivada de la madera con un catalizador de oxidación para iniciar una reacción de oxidación autocatalítica.

Por la iniciación de una reacción de oxidación autocatalítica se entiende, de acuerdo con la invención, en particular la selección de una o varias condiciones de reacción tales como están definidas en las reivindicaciones independientes 2, 4, 7, 10, 12 y/o 14.

- 5 Por la expresión materia de extracto de madera se entiende, de acuerdo con la invención, uno/o varios ingredientes de madera que se pueden extraer con disolventes orgánicos polares y/o apolares y/o agua, por ejemplo con agua, alcohol, benceno, hexano, ciclohexano, éter y/o acetona de la madera.

- 10 Por la expresión materia derivada de la madera se entiende, de acuerdo con la invención, materias primas que se generan mediante trituración de materiales que contienen celulosa y unión posterior de los elementos estructurales.

Sorprendentemente se halló que el contenido de materia de extracto de madera y/o VOC en materiales a base de celulosa se puede reducir de forma particularmente sencilla y económica cuando el material se trata en condiciones específicas para reacciones de oxidación autocatalíticas con un catalizador de oxidación.

- 15 Las reacciones autocatalíticas están caracterizadas por que los propios productos de reacción formados presentan una actividad catalítica. Por tanto, en una reacción autocatalítica aumenta la cantidad de catalizador en el transcurso de la reacción y aumenta la velocidad de la reacción. Por este motivo, las reacciones autocatalíticas después de una fase de iniciación se desarrollan más rápidamente de lo que sería esperable a causa de la cantidad empleada originalmente de catalizador.

- 25 Ahora se ha hallado, sorprendentemente, que la degradación oxidativa de materia de extracto de madera en madera y/o una materia derivada de la madera se basa en un mecanismo autocatalítico de este tipo. Este conocimiento posibilita la conducción de acuerdo con la invención del procedimiento en las condiciones de reacción específicas para una reacción autocatalítica. De este modo, en el procedimiento de acuerdo con la invención se puede emplear, por ejemplo, una cantidad extremadamente reducida de catalizador de oxidación y conseguirse, a pesar de esto, una velocidad de reacción satisfactoria. Ya que las autooxidaciones representan reacciones en cadena que tienen lugar con formación de radicales libres, es de presuponer que el catalizador de oxidación en el procedimiento de acuerdo con la invención hace de iniciador de la reacción en cadena.

- 30 La madera y/o la materia derivada de la madera tratadas con el procedimiento de acuerdo con la invención presentan un contenido reducido de materia de extracto de madera. En particular, el procedimiento de acuerdo con la invención posibilita una reducción eficaz del contenido de compuestos insaturados en la materia de extracto de madera tales como, por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, tales como, en particular, triglicéridos y ácido linoleico.

- 35 Como ya se ha discutido, de los compuestos contenidos en la materia de extracto de madera con calor se producen compuestos orgánicos volátiles (VOC). A causa de su contenido reducido en materia de extracto de madera, por consiguiente, el producto tratado con el procedimiento de acuerdo con la invención también se caracteriza por que con su calentamiento, por ejemplo, en una etapa de secado, se libera una menor cantidad de VOC.

- 40 Se consigue de acuerdo con la invención una proporción particularmente buena entre velocidad de reacción y catalizador de oxidación empleado cuando el catalizador de oxidación se emplea en una cantidad del 1×10^{-7} al 1 % en peso, preferentemente del 3×10^{-7} al 0,3 % en peso, más preferentemente del 1×10^{-6} al 0,1 % en peso, más preferentemente del 3×10^{-6} al 0,03 % en peso y en particular del 1×10^{-5} al 0,01 % en peso, respectivamente en relación con la sustancia seca de la madera y/o de la materia derivada de la madera.

- 45 El uso de cantidades tan reducidas de catalizador de oxidación tiene la ventaja de que el material tratado contiene solo un residuo extremadamente reducido de catalizador y dado el caso coadyuvantes empleados para la oxidación. Esto tiene un efecto en particular favorable sobre las propiedades de procesamiento del material, tales como, por ejemplo, su capacidad de encolado. Por tanto, en el procedimiento de acuerdo con la invención sobra una separación de los residuos, por ejemplo mediante extracción y/o filtración.

- 50 Evidentemente, también es posible emplear para la iniciación de la reacción de autooxidación una mayor cantidad de catalizador de oxidación. En este caso, la degradación oxidativa de los componentes de la materia de extracto de madera tiene el lugar más rápidamente de lo que sería esperable para una reacción de oxidación catalítica sencilla. De este modo, por ejemplo, en el caso del uso de catalizador de oxidación en una cantidad de más del 1 % en peso con respecto a la sustancia seca del material a base de celulosa es posible interrumpir la reacción incluso después de pocas horas y conseguir, a pesar de esto, una degradación satisfactoria de componentes de la materia de extracto de madera y/o VOC.

- 55 El tratamiento de acuerdo con la invención, no obstante, se puede terminar también, independientemente de la cantidad de catalizador empleada, antes de lo que se describe en el estado de la técnica, ya que la degradación oxidativa autocatalítica de los componentes de la materia de extracto de madera continúa también en caso de una humedad extremadamente menor del sustrato, por ejemplo después de una etapa de secado. De este modo, el procedimiento de acuerdo con la invención se puede interrumpir, independientemente de la cantidad de catalizador,

incluso después de pocas horas.

Además, sorprendentemente se ha mostrado que para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención no es necesario incluir aire y/u oxígeno en la mezcla de reacción. Tampoco es necesario ni remover ni agitar la mezcla durante la reacción.

Los ensayos prácticos han dado como resultado que las enzimas son catalizadores de oxidación particularmente adecuados para la iniciación de la reacción de oxidación autocatalítica. En el uso de enzimas es ventajoso en particular que tienen efectos negativos relativamente reducidos sobre las demás propiedades de procesamiento del material tratado. Además, los procedimientos catalizados enzimáticamente presentan la ventaja de que en general son sustancialmente más selectivos, proporcionan menos productos secundarios indeseados y se pueden llevar a cabo habitualmente en condiciones sustancialmente más cuidadosas que las oxidaciones catalizadas químicamente.

Básicamente son adecuadas las más diversas enzimas para el empleo en el procedimiento de acuerdo con la invención. Han resultado particularmente adecuadas de acuerdo con la invención las oxidasas, tales como la oxidasa multicobre azul, lacasas, catecol oxidasas, peroxidasas, bilirrubina oxidasas, manganeso peroxidasas, lignina peroxidasas, lipoxidasas (lipoxigenasas).

De este modo, ha resultado favorable que la cantidad total de enzima sea de 0,001 a 20 unidades enzimáticas (U), preferentemente de 0,01 a 15 U, más preferentemente de 0,05 a 10 U y en particular de 0,1 a 5 U, respectivamente en relación con 1 g de material a base de celulosa.

Con esta cantidad de enzima se obtiene una proporción particularmente buena entre la cantidad empleada de catalizador y la velocidad de reacción.

Por unidad enzimática (U) se entiende, de acuerdo con la invención, la cantidad de enzima que es necesaria para oxidar respectivamente un μmol de sustrato convencional por minuto a 30 °C. Los sustratos convencionales respectivos están definidos en "Methods in Enzymology" (Elsevier Academic Press, Amsterdam) y/o en la base de datos "BRENDA" de la Technischen Universität Braunschweig (www.brenda-enzymes.info). El sustrato convencional para lacasa es, de acuerdo con la invención, ABTS [ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sulfónico)]. El sustrato convencional para lipoxidasa (lipoxigenasas) es, de acuerdo con la invención, ácido linoleico. Otros sustratos convencionales de acuerdo con la invención son ABTS para bilirrubina oxidasa, catecol para catecol oxidasa, ABTS para peroxidasa, Mn^{2+} para manganeso peroxidasa y alcohol 3,4-dimetoxibencílico para lignina peroxidasa.

Las indicaciones de peso o porcentaje en peso para el catalizador de oxidación se refieren de acuerdo con la invención en el caso de enzimas siempre a la forma pura, es decir, electroforéticamente homogénea de la enzima. Por el contrario, la respectiva preparación técnica que se aplica puede contener también coadyuvantes, disolventes, proteínas extrañas e impurezas. Son proteínas extrañas, por ejemplo, proteínas catalíticamente inactivas y/o enzimas con otras actividades catalíticas que las pertinentes para el procedimiento de acuerdo con la invención.

Como catalizador de oxidación se emplea al menos un sistema de mediador de enzima, preferentemente un sistema de mediador de lacasa, en particular un sistema de mediador redox de lacasa y/o al menos una lipoxidasa. En el uso de lacasas en el sistema de mediador de enzima es ventajoso que pueden oxidar la mayoría de los triglicéridos y ácidos resínicos conjugados contenidos en materiales de madera en un tiempo corto. En presencia de mediadores, en particular mediadores redox, se puede ampliar aún más el intervalo de los sustratos de oxidación. Los mediadores redox hacen por un lado de sustrato y por otro lado, de oxidante. Otra ventaja del uso de lacasas radica en que presentan una elevada estabilidad a temperatura y están disponibles en el mercado.

Un mediador adecuado para el procedimiento de acuerdo con la invención es HBT (1-hidroxi-benzotriazol). El HBT es un mediador habitual para sistemas de mediador de lacasa. Sin embargo, en su uso son desventajosos su toxicidad y su elevado precio. Los mediadores adecuados para el procedimiento de acuerdo con la invención que no presentan las desventajas que se han mencionado anteriormente son ácido violurónico, TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo), ácido ferúlico (ácido trans-4-hidroxi-3-metoxicinámico), ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético), alcohol vanílico (alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico), ABTS [ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sulfónico)], siringaldehído (4-hidroxi-3,5-metoxibenzaldehído), acetosiringona (2,6-dimetoxi-4-acetilfenol), acetovanilona (2-metoxi-4-acetilfenol), ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico), vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), alcohol 4-hidroxibencílico, fenol y/o 2,6-dimetoxifenol. Mediante el uso de todos estos mediadores es posible degradar con el procedimiento de acuerdo con la invención materia de extracto de madera en madera y/o materia derivada de la madera.

De acuerdo con la invención se prefiere en particular el uso de ABTS como mediador, ya que es menos tóxico que el HBT y presenta, a pesar de esto, una actividad comparable. Pero en el caso de su uso es desventajoso que puede conducir a decoloraciones del sustrato tratado. De acuerdo con la invención se prefiere asimismo en particular el uso de ácido ferúlico y alcohol vanílico. Estos mediadores presentan, en comparación con el HBT, la ventaja de no ser tóxicos y de ser económicos. Además, estos compuestos son incoloros y conducen como mucho a ligeras decoloraciones del sustrato tratado.

La cantidad total de mediador es preferentemente del 0,001 al 1 % en peso, más preferentemente del 0,01 al 0,5 % en peso y en particular del 0,05 al 0,1 % en peso, respectivamente con respecto a la sustancia seca de la madera y/o materia derivada de la madera tratada.

Una desventaja en el caso del uso de sistemas de mediador de lacasa radica en que oxidan no solamente materia de extracto de madera, sino también lignina. De este modo, los sistemas de mediador de lacasa se usan, por ejemplo, también para blanquear pasta de madera. Esta propiedad de los sistemas de mediador de lacasa puede conducir durante su uso a reacciones indeseadas de oxidación y perjudicar la estabilidad de los sustratos tratados. Por este motivo, de acuerdo con la invención se deseaba facilitar catalizadores de oxidación alternativos de base enzimática.

Durante la búsqueda de catalizadores de oxidación alternativos, sorprendentemente, la lipoxidasa ha resultado particularmente adecuada para el procedimiento de acuerdo con la invención. El empleo de lipoxidasa tiene la ventaja frente a los sistemas de mediador de lacasa de que la lipoxidasa cataliza selectivamente la oxidación de compuestos insaturados, principalmente de ácidos grasos di- o tri-insaturados hasta dar los hidroperóxidos correspondientes. Por el contrario, la lipoxidasa no cataliza la oxidación de lignina, de tal manera que se pueden evitar mermas indeseadas de estabilidad en los materiales tratados. Además, ensayos prácticos han demostrado que la lipoxidasa es al menos igualmente adecuada o incluso más adecuada que los sistemas de mediador de lacasa para la iniciación de la oxidación autocatalítica de materia de extracto de madera.

Si se emplea una enzima como catalizador de oxidación, entonces es ventajoso llevar a cabo el tratamiento de la madera y/o de la materia derivada de la madera con el catalizador de oxidación en un medio acuoso. Se obtienen resultados particularmente buenos cuando el medio acuoso presenta un valor de pH de 4 a 10. En el caso del uso de sistemas de mediador de lacasa se consiguen resultados particularmente buenos cuando el medio acuoso presenta un valor de pH de 4 a 6, preferentemente de aproximadamente 5. Si se emplea lipoxidasa, entonces el medio acuoso presenta preferentemente un valor de pH de aproximadamente 8 a 10 y en particular de aproximadamente 9. El ajuste del valor del pH respectivamente deseado tiene lugar con ácido o lejía o, de forma apropiada, con un tampón. Para el ajuste del valor de pH durante el uso de un sistema de mediador de lacasa han resultado particularmente adecuados, en particular tampones acetato, succinato, malato, tartrato, citrato, glicolato, lactato, carbonato, oxalato, malonato y ftalato y durante el uso de lipoxidasa, tampones borato, carbonato, fosfato, glicinato, tricina, tris, glicilglicina y barbital.

Básicamente, la proporción en peso entre medio acuoso y madera y/o materia derivada de la madera a tratar no es crítica, siempre que esté presente una cantidad suficiente de agua para iniciar la reacción de oxidación autocatalítica. Se consiguen resultados particularmente buenos cuando la humedad de la madera y/o de la materia derivada de la madera se ajusta a un valor del 10 al 300 % en peso, preferentemente del 20 al 200 % en peso, aún más preferentemente del 50 al 150 % en peso y en particular del 60 al 130 % en peso, respectivamente con respecto a la sustancia seca de la madera y/o de la materia derivada de la madera.

En los procedimientos catalizados conocidos por el estado de la técnica, por el contrario, habitualmente se usa una cantidad considerablemente mayor de agua (suspensión). El hecho de que el procedimiento de acuerdo con la invención, por el contrario, se puede llevar a cabo con humedades de partida claramente menores, probablemente se debe a que el medio acuoso se necesita únicamente para la iniciación de la reacción de oxidación autocatalítica. La cantidad, reducida en comparación con el estado de la técnica, de agua de reacción tiene la ventaja, además de una conducción más sencilla del procedimiento, de que los materiales tratados se pueden secar más fácilmente.

Si el tratamiento de acuerdo con la invención de la madera y/o de la materia derivada de la madera se lleva a cabo en un medio acuoso que contiene una enzima, entonces la cantidad de enzima en el medio acuoso puede variar en amplios intervalos. Ha resultado particularmente adecuado que el medio acuoso contenga de 0,001 a 200 U ml⁻¹, preferentemente de 0,01 a 100 U ml⁻¹, más preferentemente de 0,03 a 50 U ml⁻¹ y en particular de 0,1 a 10 U ml⁻¹ de enzima.

También la temperatura a la que se lleva a cabo la oxidación autocatalítica puede variar en amplios intervalos. Una gran ventaja del procedimiento de acuerdo con la invención frente a una reacción catalítica sencilla consiste en que la reacción autocatalítica, después de la fase de iniciación, se puede llevar a cabo también en el caso del uso de un catalizador sensible a temperatura, tal como, por ejemplo, enzimas, a mayores temperaturas. La causa de esto probablemente radique en que los productos de oxidación de efecto catalítico formados en la autocatálisis, a diferencia de las enzimas empleadas como catalizadores, no son sensibles a temperatura. En una reacción catalizada por enzima sencilla, por tanto, básicamente se tiene que tener en cuenta que la temperatura de la reacción no supere un determinado valor a la que se descompone la enzima respectivamente usada. Esta medida de precaución no es necesaria en la conducción de acuerdo con la invención del procedimiento.

Ensayos prácticos han mostrado que la oxidación autocatalítica en el procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo después de la fase de iniciación de forma apropiada a una temperatura de por encima de 30 °C, preferentemente de más de 40 °C, más preferentemente de más de 60 °C, más preferentemente de más de 80 °C, más preferentemente de más de 100 °C y en particular de más de 150 °C.

El uso de mayores temperaturas de reacción es ventajoso debido a que conlleva velocidades de reacción mayores. Otra ventaja consiste en que a mayores temperaturas se facilita la expulsión de VOC del sustrato. Con el procedimiento de acuerdo con la invención se pueden eliminar, por tanto, los VOC incluso durante el procedimiento de producción.

Evidentemente, también es posible ajustar en el transcurso de la realización del procedimiento de acuerdo con la invención distintas temperaturas. De este modo, por ejemplo, se prefiere en particular ajustar al comienzo del procedimiento una temperatura menor que en su transcurso posterior. La realización de una etapa de secado después del tratamiento con el catalizador de oxidación ha resultado particularmente adecuada. Esta etapa de secado se lleva a cabo, preferentemente, a temperaturas de por encima de 100 °C, preferentemente por encima de 150 °C y en particular por encima de 200 °C.

Como madera y/o materias primas se pueden emplear en el procedimiento de acuerdo con la invención los más diversos materiales. Sin embargo, se obtienen resultados particularmente buenos en el tratamiento de virutas de madera, en particular de virutas para la producción de planchas de OSB.

Básicamente, la velocidad de reacción del procedimiento de acuerdo con la invención es mayor cuanto mayor sea la superficie de la madera y/o materia prima a tratar. Pero la superficie, como es sabido, aumenta con tamaño decreciente de partícula. De este modo, en el procedimiento de acuerdo con la invención se consigue una mayor velocidad de reacción cuando se tratan sustratos con un menor tamaño de partícula.

A diferencia de los procedimientos conocidos, sin embargo, el procedimiento de acuerdo con la invención no está limitado a emplear materiales de trozos pequeños, por ejemplo, fibras, como sustratos. De hecho, sorprendentemente se halló que es suficiente tratar únicamente la superficie o, preferentemente, únicamente una parte de la superficie del material a tratar con el catalizador de oxidación para causar una degradación de la materia de extracto de madera en todo el corte transversal del material. La causa de esto probablemente radica en que durante la autooxidación se forman productos de oxidación catalíticamente activos en el interior de la madera y/o materia derivada de la madera. Estos causan, a su vez, una oxidación de materia de extracto de madera en el interior de la madera y/o la materia derivada de la madera a tratar, de tal manera que en el transcurso de la autooxidación se puede degradar materia de extracto de madera en todo el corte transversal del material.

Por el mismo motivo, la conducción de acuerdo con la invención del procedimiento posibilita llevar a cabo la reacción de oxidación a presión normal y sin aplicar un vacío.

Otro objeto de la invención es madera o una materia derivada de la madera que se ha producido con el procedimiento de acuerdo con la invención. La madera de acuerdo con la invención o la materia derivada de la madera de acuerdo con la invención, a diferencia del estado de la técnica, se produce en condiciones de reacción autocatalíticas. Ya que en el transcurso de la autocatálisis se forman productos de oxidación que por sí mismos presentan actividad catalítica, de acuerdo con la invención es posible emplear para la producción de la materia derivada de la madera una menor cantidad de catalizador que en los procedimientos conocidos. Por consiguiente, la materia derivada de la madera de acuerdo con la invención, en comparación con las materias derivadas de madera producidas en procedimientos conocidos, contiene una menor cantidad de catalizador empleado originalmente, por ejemplo, enzima. Habitualmente, con la cantidad del catalizador empleado aumenta también el contenido de coadyuvantes empleados habitualmente tales como, por ejemplo, sustancias tampón. Por este motivo, la materia derivada de la madera de acuerdo con la invención, en comparación con el estado de la técnica, habitualmente contiene también una menor cantidad de coadyuvante.

Otra diferencia en relación con la madera y/o materia derivada de la madera producida con reacciones catalizadas enzimáticamente sencillas consiste en que la madera y/o materia derivada de la madera de acuerdo con la invención se puede producir con una menor humedad de partida. La fase acuosa, de acuerdo con la invención, de hecho se emplea únicamente para la iniciación de la reacción autocatalítica. Por consiguiente, la madera y/o materia derivada de la madera tratada de acuerdo con la invención después de su producción presenta una menor humedad de la madera que la madera y/o materia derivada de la madera que se han producido con los procedimientos conocidos en el estado de la técnica. Esto tiene la ventaja de que la madera y/o materia derivada de la madera de acuerdo con la invención se puede secar de forma sencilla.

A continuación se explica con más detalle la invención mediante varios ejemplos de realización:

1. Reactivos usados

Para los siguientes ensayos se usaron virutas de pino silvestre (*Pinus sylvestris* L) recién preparadas. Antes del tratamiento enzimático, la madera se molió en un molino de ultra-centrífuga Retsch ZM-1000 hasta un tamaño de partícula de menos de 2 mm (tamizado mediante un tamiz de alambre de malla 10). En paralelo a esto se trataron enzimáticamente virutas de OSB y tiras de madera de trozo grueso. Para obtener un material de referencia homogéneo, las virutas de OSB se produjeron en el laboratorio mediante un microtomo de carro en las dimensiones 0,4 x 20 x 30 mm. Las tiras de madera tenían una dimensión de 3 x 10 x 50 mm. Después del tratamiento

enzimático, las virutas de OBS de laboratorio y las tiras de madera se molieron, tal como se ha descrito anteriormente, a < 2 mm.

Para los ensayos de mediador de lacasa se empleó lacasa recombinante del tipo *Trametes villosa* (Producto N° 44008), obtenido de Novo Nordisk. La actividad de lacasa se midió mediante espectrofotometría a 420 nm y una concentración de 0,4 mmol l⁻¹ de ABTS [ácido 2,2' azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)] como sustrato ($\epsilon = 43,2 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$) in 20 mmol l⁻¹ de tampón succinato sódico a un valor de pH de 5. Una unidad (U) de lacasa se definió como la cantidad de enzima que es necesaria para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto a 30 °C. Como mediadores se usaron ácido violurónico, TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo), ácido ferúlico (ácido trans-4-hidroxi-3-metoxicinámico), ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético), alcohol vanílico (alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico) y/o ABTS y se comparó con HBT (1-hidroxibenzotriazol). Todos los mediadores examinados se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Se obtuvo lipoxidasas obtenida de semillas de soja (tipo 1B) también de Sigma-Aldrich como polvo liofilizado. Una unidad (U) de lipoxidasas se definió como la cantidad de enzima que es necesaria para oxidar 1 μmol de ácido linoleico como sustrato por minuto a un valor de pH de 9,0 y 25 °C. La medición de la oxidación de ácido linoleico se realizó mediante HPLC y detección UV a 200 nm y 234 nm.

2. Examen de la actividad catalítica de sistemas de mediador de lacasa y lipoxidasas

2.1. Forma de proceder general

1 g de madera (partículas, virutas o tiras de trozos gruesos tal como se han descrito anteriormente) con un contenido de humedad de aproximadamente el 50 % se puso en un frasco de vidrio con cierre giratorio. Después de la mezcla con 1 ml de tampón acetato (0,01 M, pH 5), que contenía mediador 0,005 M y 5 U ml⁻¹ de lacasa (150 % en peso de humedad total), las muestras se incubaron durante al menos 24 horas. En ensayos para el establecimiento de la influencia sobre la humedad de la madera se usaron además 0,5 ml de tampón acetato (para el 100 % en peso de humedad total), que contenía mediador 0,01 M y 10 U ml⁻¹ de lacasa así como 0,1 ml de tampón de acetato (para el 60 % en peso de humedad total) que contenía mediador 0,05 M y 50 U ml⁻¹ de lacasa. Se trataron del mismo modo muestras ciegas con agua, tampón o tampón y mediadores sin enzimas. Las mezclas de reacción con lipoxidasas contenían 2 U ml⁻¹ de lipoxidasas en un tampón borato (0,1 M, pH 9).

Todos los ensayos se repitieron al menos tres veces. Después del tratamiento enzimático, las muestras se liofilizaron y se mantuvieron en un estado congelado hasta la extracción. Las virutas de OSB de laboratorio tratadas así como las tiras de maderas de trozo grueso se molieron tal como se ha descrito bajo la cifra 1 a <2 mm. En ensayos para el establecimiento de la influencia de la temperatura, las muestras se secaron durante 15 minutos a 200 °C y después se extrajeron. La extracción se llevó a cabo con un ASE 100 (Accelerated Solvent Extractor, Dionex) con acetona/agua (95:5 v v⁻¹) a 110 °C con cuatro ciclos estáticos de cinco minutos. El disolvente se retiró mediante evaporación y las muestras se sililaron mediante el uso de 80 μl de bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida, 20 μl de piridina y 20 μl de trimetilclorosilano. Para completar la reacción, los matraces se mantuvieron durante 45 minutos a 70 °C. Se usaron ácido heneicosanoico y betulínol como patrones internos. Las sustancias se separaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N provisto de una columna DB-5 30 m x 0,25 mm diámetro interno (0,25 μm de espesor de película). El programa de temperatura del horno de columna era 100 °C (1,5 min), 5 °C/min a 300 °C (15 min) con un caudal de He de 1,5 ml/min y una proporción de división de 20:1, 260 °C de inyector y 330 °C de temperatura FID. Todos los resultados se calcularon basándose en la madera liofilizada. Los compuestos individuales se identificaron mediante análisis de EM-CG de los extractos sililados mediante el uso de una columna similar y en el mismo programa de temperatura tal como se ha descrito anteriormente.

Para la localización de las enzimas en la madera se trataron enzimáticamente tiras de madera de trozos gruesos durante 6 y 24 horas tal como se ha descrito anteriormente, se enjuagaron con 3 x 5 ml de tampón, seguido de un enjuagado posterior exhaustivo con aproximadamente 50 ml de tampón. Se midió y sumó la actividad de la lacasa o lipoxidasas en las soluciones combinadas. Entonces, las tiras de madera enjuagadas se molieron tal como se ha descrito anteriormente a <2 mm, se mezclaron con 10 ml de tampón y se incubaron durante 2 horas con intensa agitación. Después se eliminó mediante centrifugación el material de madera y se estableció la actividad enzimática a su vez en el sobrenadante. En algunos ensayos se añadió al tampón el 0,1 % de Tween 20, lo que, sin embargo, no mejoró sustancialmente el rendimiento enzimático.

Para la medición de VOC de madera, se secaron muestras no tratadas y tratadas enzimáticamente en un horno durante 15 minutos a 200 °C. Este secado intenso se llevó a cabo para simular el proceso de secado tal como se usa en la industria para partículas de madera. 0,5 g de la madera secada se introdujeron en un frasco de 20 ml con espacio de gas, que se cerró con un tabique de PTFE/silicona, y se almacenó durante una semana a 25 °C. Se obtuvieron las fibras de SPME y la sujeción de Supelco (Bellefonte, PA, EE.UU.). Las fibras revestidas con carboxenpolidimetilsiloxano (CAR-PDMS, 75 μm) se expusieron después del acondicionado de acuerdo con la recomendación del fabricante durante 30 minutos a 25 °C en la fase gas por encima de las muestras. A continuación, las fibras se introdujeron mediante una aguja en el inyector de CG para desorber las sustancias a analizar. El programa de temperatura para el análisis de SPME era: 40 °C (4 min), 4 °C/min a 110 °C, 30 °C/min a 300 °C (5 min). La inyección sin división se llevó a cabo a 270 °C y se mantuvo el detector a 330 °C. Se usó la

misma columna tal como se ha descrito anteriormente.

La Tabla 1 muestra las concentraciones de las materias de extracto de madera que se usaron para los ensayos de acuerdo con la invención para la degradación enzimática.

5

Tabla 1: contenido de materia de extracto de madera en muestras de madera no tratadas, tal como se emplearon para los ensayos de degradación enzimáticos

	Contenido [mg g ⁻¹]	SD [mg g ⁻¹]
Ácido linoleico	0,98	0,04
Ácido oleico	1,22	0,07
Estilbeno (STIL)	1,59	0,08
Ácidos resínicos conjugados (CRA)	3,95	0,12
Ácidos resínicos no conjugados (NCRA)	3,89	0,14

Ya que algunas materias de extracto de madera en los ensayos de degradación se comportaron de forma similar, se combinaron de forma correspondiente a sus estructuras básicas químicas en distintos grupos:

10

1. El grupo de estilbeno comprende pinosilvinmonometiléter y pinosilvina. La proporción del pinosilvinmonometiléter a pinosilvina asciende aproximadamente a 2:1;

15

2. Ácido palústrico, ácido abético, ácido levopimarico y ácido neoabiético están compilados en el grupo de los ácidos resínicos conjugados (CRA) y

20

3. Ácido pimarínico, ácido sandaropimarico, ácido isopimarico y ácido dehidroabiético forman el grupo de los ácidos resínicos no conjugados (NCRA). El ácido linoleico y ácido oleico se examinan por separado, ya que a causa de su contenido de dobles enlaces muestran otro patrón de degradación. Los triglicéridos y el ácido estearílico se detectaron únicamente en trazas y, por este motivo, no se tuvieron en cuenta.

20

2.2 Examen de la actividad catalítica de sistemas de mediador de lacasa

25

En este ensayo se examinaron seis sustratos de lacasa diferentes con distintos grupos funcionales en relación con su capacidad de catalizar la autooxidación de materia de extracto de madera y se compararon con HBT. En el pasado, el HBT ha resultado ser uno de los mediadores más potentes en sistemas de mediador de lacasa. Sin embargo, a causa de su probable toxicidad y su elevado precio existe una necesidad de emplear mediadores alternativos. La Tabla 2 muestra que todos los mediadores ensayados estaban en disposición de degradar los distintos grupos de materia de extracto de madera en el intervalo de 24 horas al menos hasta cierto grado.

30

Tabla 2: comparación de la eficacia de la degradación de materia de extracto de madera de distintos sistemas de mediador de lacasa con el 150 % en peso de humedad total después de incubación durante 24 horas a 30 °C en porcentaje [%]

	Ácido linoleico	Ácido oleico	STIL	CRA	NCRA
Ácido homovanílico	16,7	9,7	26,6	34,8	3,4
Alcohol vanílico	37,2	17,8	31,5	47,0	1,6
Ácido ferúlico	40,9	19,0	37,3	43,6	4,2
Ácido violurónico	20,3	10,5	11,1	7,2	2,8
TEMPO	12,1	6,2	25,4	11,0	0,3
ABTS	59,2	29,9	57,8	51,9	1,8
HBT	63,6	30,4	37,2	52,0	8,1

35

De la Tabla 2 se obtiene que el HBT y ABTS como mediadores condujeron en el intervalo de 24 horas a una reducción de la cantidad de ácido linoleico de aproximadamente el 60 %, de CRA de aproximadamente el 50 % y de ácido oleico de aproximadamente el 30 %. En el caso del uso de ABTS como mediador es desventajoso que el catión radical que representa la especie reactiva presenta un color verde oscuro y, por tanto, conduce a decoloraciones de la madera tratada. Además, el ABTS es un compuesto sintético.

40

Los otros mediadores ensayados, tales como ácido ferúlico o alcohol vanílico, causaron índices de degradación ligeramente menores que el HBT, pero a pesar de esto resultaron prometedores. En todos los experimentos, la degradación de ácido linoleico era mayor que la del ácido oleico, lo que se puede explicar a causa del diferente contenido de grupos insaturados en las moléculas. Resultó que los CRA se podían degradar con facilidad enzimáticamente de forma similar al ácido linoleico. La cantidad de NCRA, por el contrario, permaneció prácticamente sin cambios. Los estilbenos, que muestran un potencial como sustratos de lacasa y los antioxidantes

45

asimismo se oxidaron, pero no en la misma medida que los CRA y el ácido linoleico.

Por tanto, la combinación de lacasa y ABTS así como, en particular, de lacasa y ácido ferúlico y alcohol vanílico, ha resultado particularmente adecuada para el empleo en el procedimiento de acuerdo con la invención.

2.3 Comparación de la eficacia de la degradación de materia de extracto de madera con distintas humedades totales

Tabla 3: comparación de la eficacia de la degradación de materia de extracto de madera de sistemas de mediador de lacasa (lacasa-ácido ferúlico y lacasa-HBT) con el 100 % en peso de humedad total después de incubación durante 24 horas a 30 °C en porcentaje [%]

	Ácido linoleico	Ácido oleico	STIL	CRA	NCRA
Ácido ferúlico	41,0	17,0	35,1	43,5	3,5
HBT	59,9	28,2	37,0	50,3	7,1

Tabla 4: comparación de la eficacia de la degradación de materia de extracto de madera de sistemas de mediador de lacasa (lacasa-ácido ferúlico y lacasa-HBT) con el 60 % en peso de humedad total después de incubación durante 24 horas a 30 °C en porcentaje [%]

	Ácido linoleico	Ácido oleico	STIL	CRA	NCRA
Ácido ferúlico	30,0	14,0	27,1	32,2	3,0
HBT	44,2	25,6	30,2	22,0	8,0

Las Tablas 3 y 4 representan resultados de ensayo que se llevaron a cabo en las mismas condiciones que en los ensayos de la Tabla 2, sin embargo, con menores humedades de madera. Se mostró que la reducción del contenido de humedad al 100 % en peso (Tabla 3) no causó ninguna disminución significativa de la eficacia de degradación y que incluso con la humedad de la madera muy reducida del 60 % en peso aparece todavía una degradación significativa.

2.4 Comparación de la eficacia de la degradación de materia de extracto de madera en distintos materiales de madera

Tabla 5: comparación de la eficacia de la degradación de materia de extracto de madera de sistemas de mediador de lacasa (lacasa-ácido ferúlico y lacasa-HBT) con el 150 % en peso de humedad total con distintos materiales de madera después de incubación durante 24 horas a 30 °C en porcentaje [%]

	Ácido linoleico	Ácido oleico	STIL	CRA	NCRA
Partículas de madera < 2 mm:					
Ácido ferúlico	40,9	19,0	37,3	43,6	4,2
HBT	63,6	30,4	37,2	52,0	8,1
Virutas de OSB de laboratorio 0,4 x 20 x 30 mm:					
Ácido ferúlico	33,1	16,0	32,3	33,5	4,1
HBT	63,1	25,2	35,0	46,0	6,1
Tiras de madera de trozos gruesos 3 x 10 x 50 mm:					
Ácido ferúlico	31,9	15,2	30,2	30,6	3,7
HBT	61,0	24,4	32,2	45,8	5,0

De la Tabla 5 se obtiene que la eficacia de la degradación de materia de extracto de madera depende solo en una medida reducida del tamaño, es decir, las dimensiones del material de madera. Una posible explicación de esto radica en que la enzima penetra, a lo largo de la reacción, en todo el corte transversal del material de madera para oxidar allí las materias de extracto de madera. Para comprobar esta teoría, la actividad enzimática se estableció después de 24 horas en tiras de madera de trozos gruesos conducidas en paralelo y tratadas idénticamente, como se ha descrito bajo la cifra 1. En la Tabla 6 están resumidos los resultados.

Tabla 6: actividad de la lacasa en tiras de madera de trozos gruesos en relación con 1 g de madera después de tratamiento enzimático durante 6 y 24 h en comparación con la actividad aplicada originalmente.

	Actividad [U] después de 6 h	Actividad [U] después de 24 h
Actividad lacasa aplicada originalmente sobre el material de madera	5,105	5,050
Actividad lacasa en la superficie del material de	4,623	3,153

madera		
Actividad lacasa en el interior del material de madera	<0,001	<0,001

De la Tabla 6 se obtiene que la lacasa aplicada sobre la superficie de la madera no penetra, tal como se presupone, en el corte transversal de la madera. La menor actividad en comparación con la actividad aplicada originalmente se debe posiblemente a una inactivación parcial de la enzima durante el tratamiento.

2.5 Examen de la actividad catalítica de lipoxidasas

En la Tabla 7 se comparará la eficacia de degradación de lacasa-HBT y de lipoxidasa después de incubación durante 24 horas a 30 °C (indicaciones en porcentaje [%]).

Tabla 7: comparación de la eficacia de degradación de lacasa-HBT y de lipoxidasa después de incubación durante 24 horas a 30 °C en porcentaje [%]

	Ácido linoleico	Ácido oleico	STIL	CRA	NCRA
Partículas de madera < 2 mm:					
Lacasa-HBT	63,6	30,4	37,2	52,0	8,1
Lipoxidasa	84,7	53,8	1,5	36,9	0,2
Virutas de OSB de laboratorio 0,4 x 20 x 30 mm:					
Lacasa-HBT	63,1	25,2	35,0	46,0	6,1
Lipoxidasa	80,1	51,0	1,7	33,3	0,4
Tiras de madera de trozos gruesos 3 x 10 x 50 mm:					
Lacasa-HBT	61,0	24,4	32,2	45,8	5,0
Lipoxidasa	84,0	49,2	0,9	29,1	0,2

La Tabla 7 muestra que la lipoxidasa es al menos igual de adecuada o incluso más adecuada que la lacasa-HBT para la oxidación autocatalítica de materia de extracto de madera. Se oxidan no solamente ácidos grasos, sino también otros componentes de la materia de extracto de madera.

Tabla 8: actividad de la lipoxidasa en tiras de madera de trozos gruesos en relación con 1 g de madera después de tratamiento enzimático durante 6 y 24 h en comparación con la actividad aplicada originalmente.

	Actividad [U] después de 6 h	Actividad [U] después de 24 h
Actividad lipoxidasa aplicada originalmente sobre el material de madera	2,125	1,940
Actividad lipoxidasa en la superficie del material de madera	1,353	0,910
Actividad lipoxidasa en el interior del material de madera	<0,001	<0,001

A partir de la Tabla 8 se obtiene que la lipoxidasa aplicada sobre la superficie de la madera no penetra en el corte transversal de la madera. La menor actividad en comparación con la actividad aplicada originalmente se debe posiblemente a una inactivación parcial de la enzima durante el tratamiento.

Los resultados de las Tablas 7 y 8 muestran además que la lipoxidasa es adecuada para la oxidación eficaz de materias de extracto de madera a pesar de que, a diferencia del sistema de mediador de lacasa, no necesita ningún mediador y al igual que la lacasa no penetra en el corte transversal del material de madera.

Por tanto, se ha podido demostrar que la autooxidación de materia de extracto de madera se puede llevar a cabo de forma eficaz mediante el tratamiento con un catalizador de oxidación en condiciones de reacción autocatalíticas. En este caso ha resultado particularmente adecuado el empleo de sistemas de mediador de lacasa o de lipoxidasa como catalizadores de oxidación.

3. Examen de las calidades de mediador de estilbenos en sistemas de mediador de lacasa

Para averiguar si los estilbenos son adecuados como mediadores y, por tanto, contribuyen a la degradación de materia de extracto de madera durante el tratamiento enzimático, se extrajo paso a paso la madera con hexano y acetona. El extracto de hexano contenía sustancias no polares y, en parte, una parte reducida de pinosilvinmonometiléter. En el extracto de acetona, los dos estilbenos representaban las sustancias que aparecían

en las mayores proporciones. La madera extraída se mezcló en exclusiva con el extracto de hexano o conjuntamente con ambos extractos. Después de la evaporación de los disolventes al vacío, se trató tal como se ha descrito anteriormente la madera. La degradación de la materia de extracto de madera era prácticamente idéntica en ambas muestras. Por este motivo se puede partir de que los estilbenos no hacen de mediadores adicionales.

El mismo experimento mostró además que, en relación con la eficacia de degradación de las enzimas, no supone ninguna diferencia sustancial si la madera se trata directamente o si las materias de extracto de madera se extraen previamente, tal como se ha descrito anteriormente, y después se vuelven a aplicar sobre la madera. Esto es sorprendente, ya que las materias de extracto de madera en la madera están presentes principalmente en forma concentrada, por ejemplo, como resina en canales de resina o como sustancias de reserva en células parenquimatosas. Gracias a la extracción y nueva aplicación que se ha descrito anteriormente, sin embargo, las materias de extracto de madera se distribuyen uniformemente y de manera fina en la madera y, por tanto, han de ser considerablemente más fácilmente accesibles para una reacción catalizada enzimáticamente sencilla y, por consiguiente, degradarse de forma sustancialmente más rápida y eficaz. Pero este no es el caso, lo que indica que el procedimiento de acuerdo con la invención se basa en un proceso autocatalítico.

4. Dependencia de la temperatura de la autooxidación

Los ensayos que se han descrito anteriormente se llevaron a cabo a distintas temperaturas para optimizar las condiciones de temperatura en el procedimiento de acuerdo con la invención. En este caso, se halló que el procedimiento de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo básicamente en un intervalo amplio de temperaturas. Se obtienen resultados excelentes en particular al ajustar la temperatura de reacción a un valor de 30 °C a 50 °C. Muy probablemente, el motivo de esto se encuentra en que la enzima empleada para la reacción de iniciación a estas temperaturas no experimenta ninguna inactivación notable y, además, la velocidad de la reacción es suficientemente elevada. Sin embargo, incluso a 70 °C y 100 °C en el intervalo de 24 horas se degradó materia de extracto de madera en una medida notable. Esto se debe muy probablemente a procesos de autooxidación inducidos térmicamente, al igual que también la observación de que un secado de la madera a 200 °C después del tratamiento enzimático mejoró sustancialmente el resultado.

5. Optimización de la humedad de partida del sustrato

Los ensayos que se han descrito anteriormente se llevaron a cabo con distintas humedades de partida del sustrato. En este caso se ha mostrado que el procedimiento de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo básicamente con las más diversas humedades de partida del sustrato. Sin embargo, ha resultado particularmente adecuado el ajuste del contenido de la humedad a una proporción de sólido:líquido de 1:1 a 1:1,5 (correspondiente a un contenido de humedad del 100 % en peso al 150 % en peso).

A continuación se explica con más detalle la invención mediante el siguiente dibujo. En el dibujo muestra

La Fig. 1: el recorrido en el tiempo de la degradación de distintos componentes de la materia de extracto de madera con lacasa-HBT a 25 °C y a 50 °C.

La Fig. 1: el recorrido en el tiempo de la degradación de distintos componentes de la materia de extracto de madera con lacasa-HBT a 25 °C y a 50 °C.

La Fig. 3: el recorrido en el tiempo de la degradación de distintos componentes de la materia de extracto de madera con lacasa-HBT con distintas actividades enzimáticas (indicadas entre paréntesis), realizándose el tratamiento a 50 °C con secado posterior de las muestras durante 15 minutos a 200 °C.

La Fig. 4: un cromatograma de CG de compuestos volátiles que se han liberado por la madera no tratada secada.

La Fig. 5: un cromatograma de CG de compuestos volátiles, liberados de la madera secada que se había tratado con lacasa-HBT durante 24 horas.

En las Figuras 1 a 3 se representa el recorrido en el tiempo de la degradación de las materias de extracto de madera con lacasa-HBT a 25 °C y 50 °C.

Después de que se ha podido demostrar que es posible degradar ácido linoleico también en madera de trozos gruesos, tal como, por ejemplo, en virutas de OSB, en una medida significativa, era de interés el tiempo necesario para una retirada completa de ácido linoleico. En las Figuras 1 y 2 se muestra el tiempo y la dependencia de la temperatura de la retirada oxidativa de distintos componentes de la materia de extracto de madera.

De las Figuras 1 y 2 se obtiene que para una retirada prácticamente completa de los componentes insaturados de la materia de extracto de madera a 25 °C se necesita ocho días. A 50 °C se reduce la velocidad de la reacción después de las primeras 24 horas. Un examen de la actividad enzimática al final del experimento mostró que la enzima había

perdido su actividad. Sin embargo, también a 25 °C, es decir, con actividad presente de la enzima, se redujo la velocidad de la reacción después de un día y volvió a ascender después del tercer día. Según el actual conocimiento, el motivo de esto radica en que la autooxidación es una reacción en cadena por radicales y que el sistema de mediador de lacasa muy probablemente es responsable únicamente de los procesos de oxidación

5

La Figura 3 muestra, al igual que las Figuras 1 y 2, el recorrido en el tiempo de la degradación de materias de extracto de madera con lacasa-HBT, habiéndose secado sin embargo las muestras después de los tiempos de tratamiento indicados en la Figura 3 todavía durante 15 minutos a 200 °C para simular el secado en una secadora industrial. Además, adicionalmente a la actividad enzimática convencional de 5 U por gramo de madera (cifra 2.1) se empleó también una actividad enzimática (20 U/g) mayor correspondiente al estado de la técnica así como una actividad enzimática muy reducida (0,5 U/g). De la Figura 3 se obtiene que la etapa de secado a 200 °C causó un aumento considerable de la eficacia de degradación, lo que, tal como ya se ha mencionado, deja deducir un mecanismo de reacción autocatalítico, ya que las lacasas habitualmente se inactivan rápidamente incluso a temperaturas por encima de 70 °C. Los ácidos grasos insaturados pertinentes para VOC se retiraron prácticamente por completo incluso después de pocas horas, con la actividad enzimática correspondiente al estado de la técnica incluso después de 1 hora. Es notable que incluso con una actividad enzimática muy reducida (0,5 U/g) se pudo conseguir una velocidad de degradación considerable. Una ligera reducción de los ácidos grasos se puede observar posiblemente a causa de procesos de descomposición térmicos durante el secado incluso sin enzima.

10

15

20

Las Figuras 4 y 5 muestran cromatogramas de CG de compuestos volátiles que se han liberado por:

- A madera no tratada secada y
- B madera secada, después de tratamiento durante 24 horas con lacasa-HBT.

25

Las muestras de madera se almacenaron en un frasco de vidrio cerrado durante una semana a 25 °C y a continuación se llevaron a cabo SPME y CG.

Después de una etapa de secado en la que se simula el secado en una secadora industrial se examinaron mediante SPME los compuestos volátiles que se habían formado a lo largo una semana a 25 °C. La Figura 2 muestra inequívocamente que la degradación de materia de extracto de madera con lacasa-HBT conduce a una reducción de la cantidad de compuestos volátiles. La cantidad reducida de aldehídos de cadena corta puede asignarse a la cantidad remanente de aproximadamente el 40 % de ácido linoleico. Los monoterpenos son las sustancias volátiles que habitualmente aparecen con mayor frecuencia en maderas blandas. Los mismos se retiraron prácticamente por completo durante el secado.

30

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la producción de madera y/o de una materia derivada de la madera con un contenido reducido de materia de extracto de madera y/o VOC, **caracterizado por que** la madera o la materia derivada de la madera se tratan con al menos una enzima como catalizador de oxidación para iniciar una reacción de oxidación autocatalítica.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el catalizador de oxidación se emplea en una cantidad del 1×10^{-7} al 1 % en peso con respecto a la sustancia seca de la madera o de la materia derivada de la madera.
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** la madera o la materia derivada de la madera se tratan con enzima en una cantidad total de 0,001 a 20 unidades de enzima (U), con respecto a 1 g de sustancia seca de la madera o de la materia derivada de la madera.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** como catalizador de oxidación se emplea al menos un sistema de mediador de lacasa y/o al menos una lipoxidasa.
- 25 5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** como mediador se emplea ácido violurónico, ácido ferúlico (ácido trans-4-hidroxi-3-metoxicinámico), ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético), alcohol vanílico (alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencílico), TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo) y/o ABTS [ácido 2,2-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)].
- 30 6. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, **caracterizado por que** la cantidad total de mediador es del 0,001 al 1 % en peso, con respecto a la sustancia seca de la madera o de la materia derivada de la madera.
- 35 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** el tratamiento de la madera o de la materia derivada de la madera se lleva a cabo con el catalizador de oxidación en un medio acuoso.
- 40 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** el medio acuoso presenta un valor de pH de 4 a 10.
- 45 9. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizado por que** la humedad de partida de la madera o de la materia derivada de la madera se ajusta a un valor del 10 al 300 % en peso, con respecto a la sustancia seca de la madera o de la materia derivada de la madera.
- 50 10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado por que** el medio acuoso contiene de 0,001 a 200 U ml⁻¹ de enzima.
11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado por que** la oxidación autocatalítica se lleva a cabo a una temperatura de más de 60 °C.
12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado por que** como madera o materia derivada de la madera se emplean virutas de madera.
13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado por que** con el catalizador de oxidación se trata solamente una parte de la superficie de la madera o de la materia derivada de la madera.
14. Madera o materia derivada de la madera, obtenible mediante un procedimiento acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 13.
15. Uso de un sistema de mediador de enzima para la producción de madera o de una materia derivada de la madera con un contenido reducido de materia de extracto de madera y/o VOC.

Figura 1

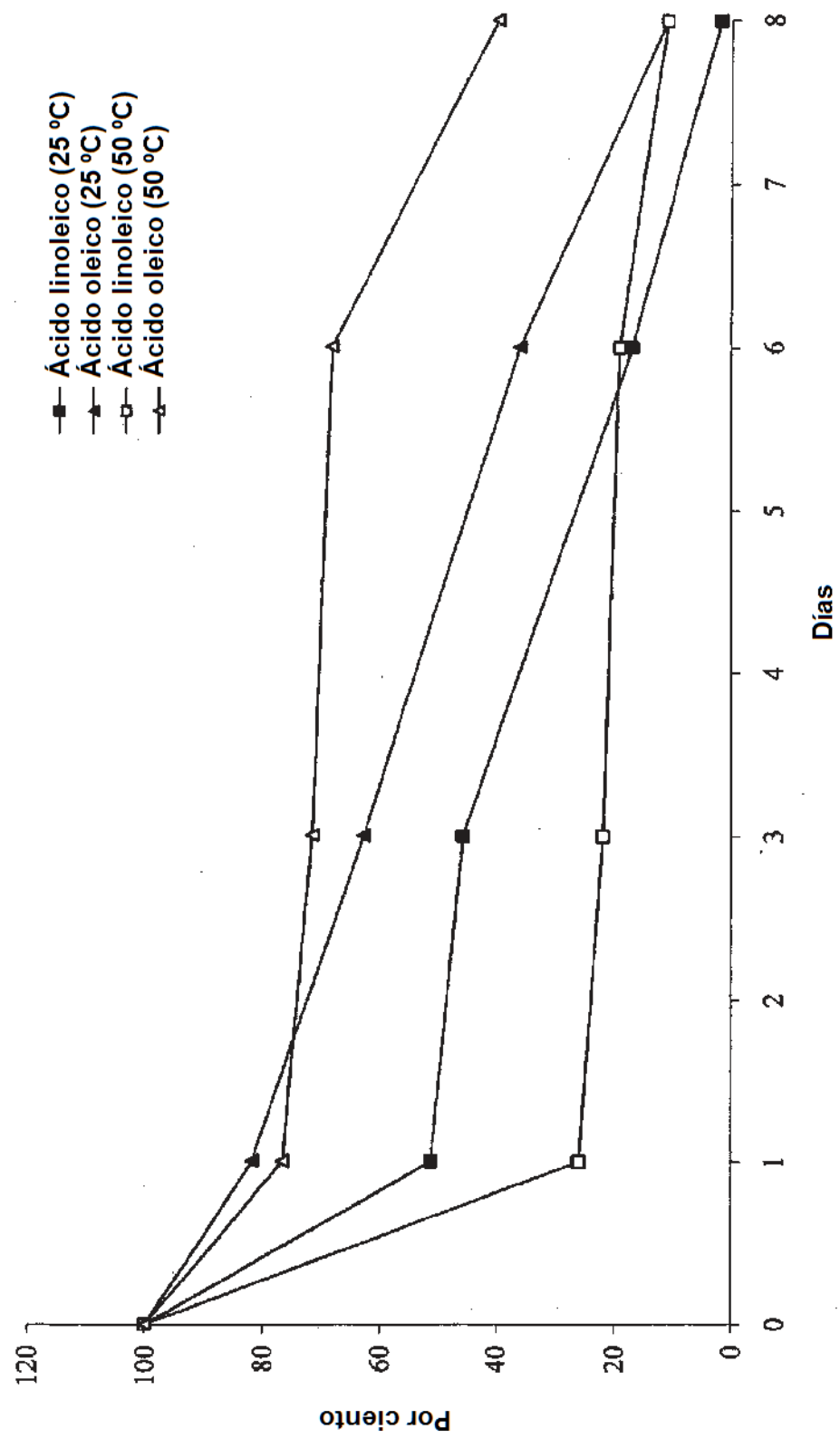


Figura 2

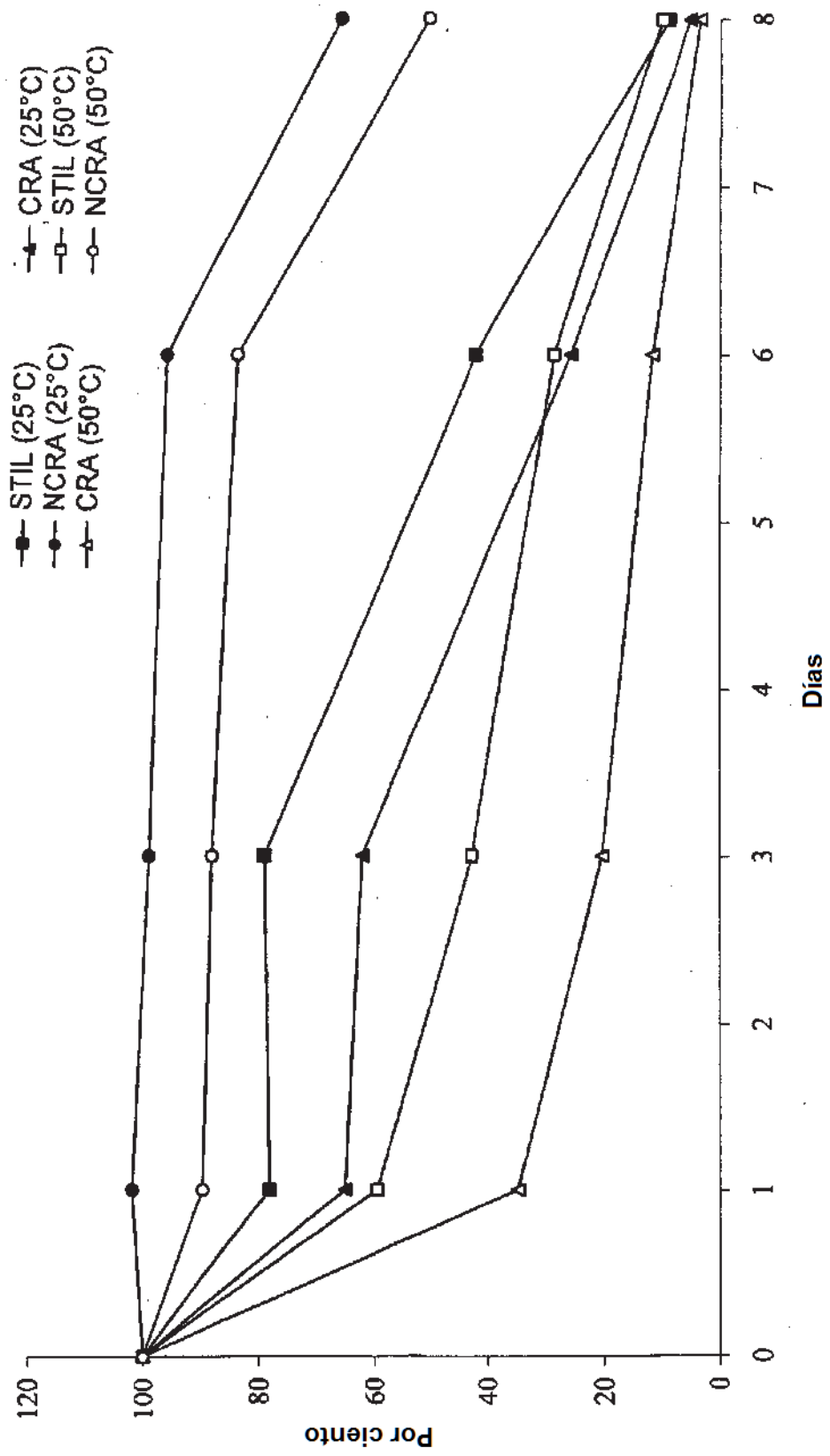


Figura 3

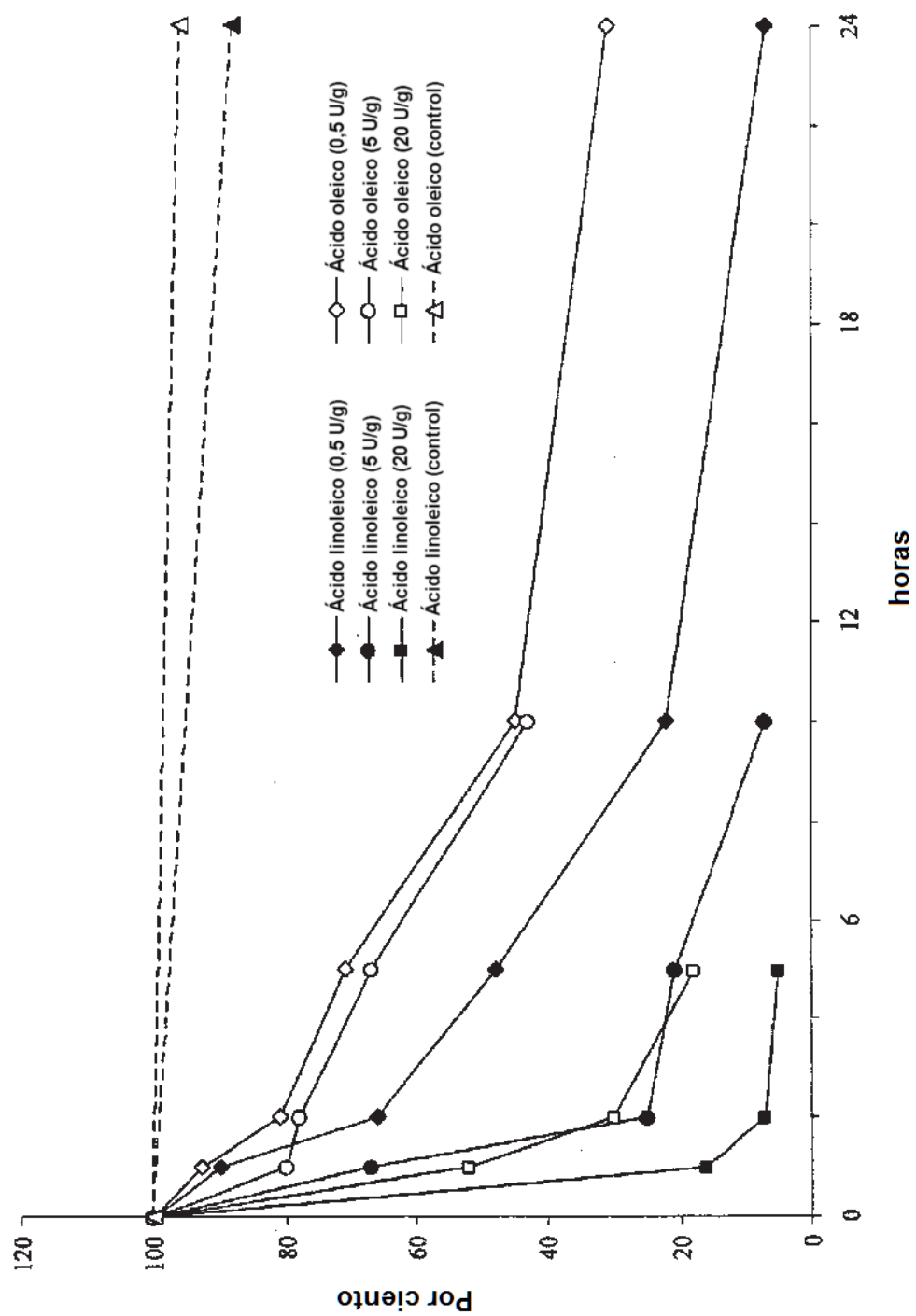


Figura 4

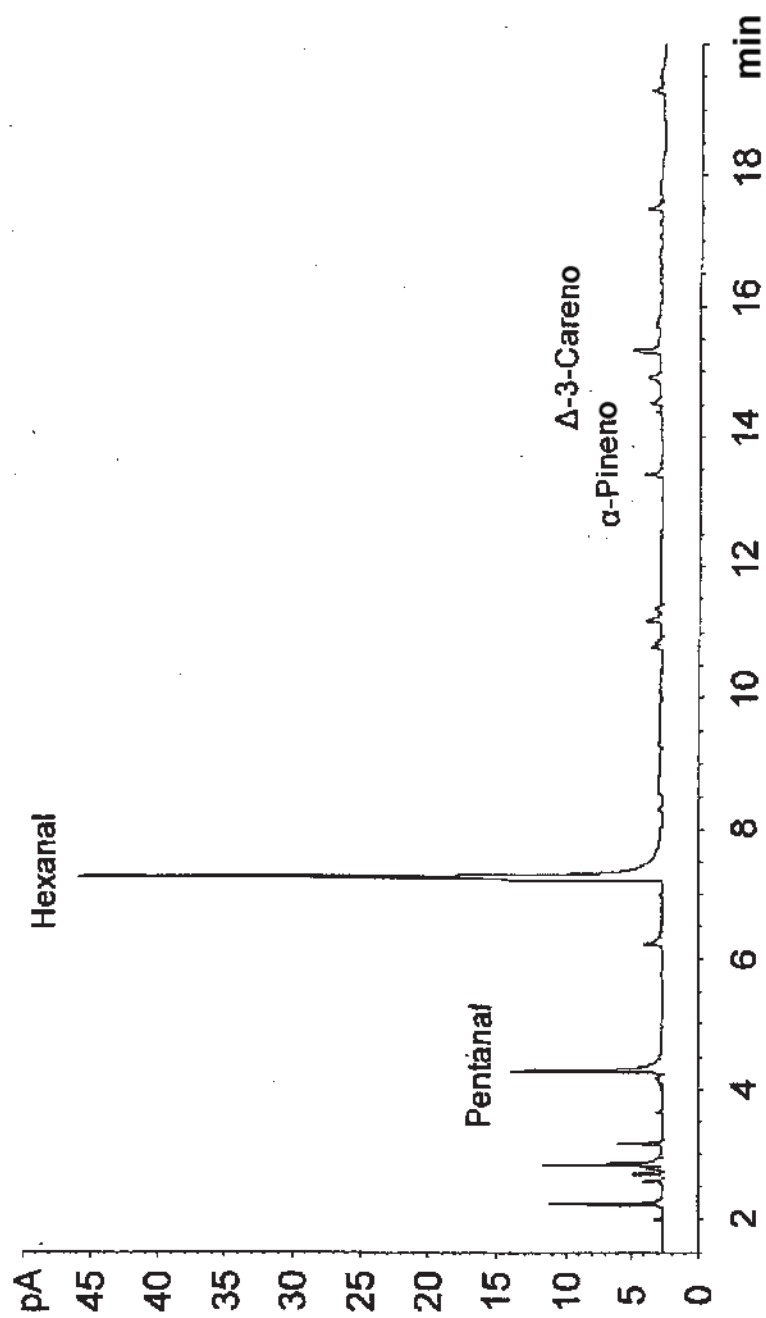


Figura 5

