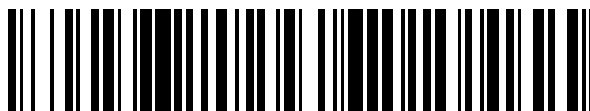


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 749**

51 Int. Cl.:

D21C 5/00 (2006.01)

D21C 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2014 PCT/EP2014/067020**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15018908**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2014 E 14750352 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 3030710**

54 Título: **Reducción del contenido de ácidos hexenurónicos en pulpa celulósica**

30 Prioridad:

09.08.2013 EP 13179933

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

22.01.2018

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)

Krogshoejvej 36

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

LUND, HENRIK;

LASSEN, KLAUS SKAALUM;

CASSLAND, BJOERN LENNART PIERRE

ALEXANDER y

LOUREIRO, PEDRO EMANUEL GARCIA

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 650 749 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

Reducción del contenido de ácidos hexenurónicos en pulpa celulósica.

5 Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato legible por ordenador. El formato legible por ordenador se incorpora en este documento como referencia.

10 CAMPO DE LA INVENCION

[0002] Esta invención se refiere en general a la reducción enzimática de ácidos hexenurónicos a partir de una pulpa celulósica química y/o a la mejora del brillo de la pulpa celulósica. Un segundo aspecto se refiere a un método enzimático para mejorar el brillo de la pulpa celulósica sin reducir el contenido de ácidos hexenurónicos en ella.

ANTECEDENTES

[0003] La madera comprende varios componentes diferentes: celulosa; hemicelulosas tales como xilano; lignina y extractivos. Durante la fabricación química de pulpa de papel, por ejemplo, en un kraft, es decir, sulfato, en la fábrica de pulpa, la cadena de xilano forma grupos laterales llamados ácidos hexenurónicos (HexAs) que son azúcares insaturados. La cantidad de HexAs varía de pulpa a pulpa, ya que las diferentes especies de madera contienen diferentes cantidades de xilano, que pueden transformarse en HexAs durante el proceso de cocción. Además, los parámetros de cocción contribuyen a diferentes cantidades de HexAs.

[0004] El proceso de fabricación de pulpa kraft comprende la cocción alcalina y el blanqueo, y comienza la manipulación de la madera donde esta se descortiza y se transforma en astillas. Las virutas se tamizan para eliminar el material fino y las virutas demasiado grandes. Las virutas se introducen luego a un digestor donde primero se tratan con vapor y luego con líquido de cocción, mientras la temperatura de cocción se eleva hasta el valor deseado. Cuando se alcanza la velocidad deseada de deslignificación, se interrumpe la cocción y el contenido en el digestor se mueve a un tanque de soplado y luego a un filtro. Después de filtrar la pulpa, se lava varias veces y se bombea a la siguiente etapa de deslignificación, es decir, el blanqueo inicial. Los productos químicos de cocción se recuperan en la planta de recuperación de productos químicos.

[0005] El objetivo principal del proceso químico de fabricación de pulpa es la deslignificación para liberar las fibras sin dañarlas. La deslignificación alcalina que se produce durante la cocción es una hidrólisis alcalina de enlaces de éter fenólico que hacen que la lignina sea soluble. Los fenoles son ácidos débiles que se disocian en un ambiente alcalino (pH > 10). La lignina será parcialmente desmetilada por ataque nucleofílico de iones sulfuro en grupos metoxilo en lignina. El blanqueo de la pulpa obtenida comprende típicamente una cantidad de pasos o etapas discretos. En la deslignificación con oxígeno, que puede ocurrir como etapa de blanqueo o preblanqueo, se disuelve más lignina y se elimina por lavado. Este es también el caso en las diferentes etapas siguientes de blanqueo; blanqueo con peróxido, blanqueo con ozono y blanqueo con dióxido de cloro. Finalmente, la pulpa se traslada al proceso de fabricación de papel en fábricas integradas de pulpa y papel o se comercializa como pulpa de mercado después de pasar por la secadora, donde se seca, corta y empaqueta para su posterior transporte a las fábricas de papel.

[0006] La deslignificación con oxígeno que se produce en la etapa de blanqueo o preblanqueo puede comprender solo una etapa, pero habitualmente el proceso se lleva a cabo en un sistema de dos etapas con o sin lavado entre las etapas. En un sistema típico de deslignificación de oxígeno de una etapa, la pulpa sin blanquear se lava en el filtrado de la lavadora posterior al oxígeno antes de que se cargue con NaOH o licor blanco oxidado. La pulpa se precalienta en un mezclador de vapor de baja presión antes de ser transferida por una bomba de consistencia media al mezclador de consistencia media de alta cizalladura. Se agrega oxígeno al mezclador y comienza el proceso de deslignificación con oxígeno.

[0007] La primera etapa después de la deslignificación con oxígeno puede ser una etapa de deslignificación que utiliza dióxido de cloro para disolver la lignina. La siguiente etapa típica de extracción alcalina (EOP) es una etapa de extracción alcalina mejorada con los agentes oxidantes: oxígeno y peróxido.

[0008] Las etapas alcalinas de blanqueo con oxígeno y peróxido no afectan el contenido de HexA en la pulpa. Por otro lado, el dióxido de cloro y el ozono tienen un gran impacto en el contenido de HexA y reaccionarán con los grupos HexA en la pulpa. Los HexA se consumen en la etapa de dióxido de cloro formando ácidos dicarboxílicos clorados y no clorados. Los HexA consumen productos químicos de blanqueo (agentes blanqueadores electrofílicos) y también aumentan la inversión del brillo de las pulpas totalmente blanqueadas.

[0009] Además, los HexA también unen iones de metales pesados y aumentan los problemas con elementos no procesados (NPE) que conducirán a un aumento de depósitos en las etapas de blanqueo. Es por esto que

5 interesa eliminar estos componentes de la pulpa antes de las etapas de blanqueo. En ese caso, se puede usar un lote químico inferior en cada etapa de deslignificación o blanqueo y se puede lograr una mayor estabilidad de brillo. El número kappa, que es una medida del contenido de lignina en la pulpa, también se ve afectado por los HexA. Los HexA consumen permanganato de potasio que es uno de los reactivos utilizados en el análisis del número kappa. El permanganato reacciona con enlaces dobles carbono-carbono en la estructura de la lignina, pero los HexA también contribuyen al consumo debido a su doble enlace carbono-carbono.

10 [0010] La etapa de ácido caliente (etapa A, a pH 3, temperaturas de 50-90 ° C y tiempo de retención de 1-3 horas), que se describe en EE. UU. 6.776.876 y el blanqueo con dióxido de cloro caliente (a temperaturas de 60-90 ° C) descrito en WO 2008/044988 son dos métodos que se usan hoy en día para eliminar los HexA. Ambos métodos dejan HexA residuales en la pulpa, aumentan el tiempo de retención en las líneas de blanqueo, aumentan los costes del tratamiento del efluente, reducen la cantidad de grupos cargados en la superficie de la fibra y reducen las propiedades de resistencia de la fibra. WO 2012/022840 aconseja llevar a cabo la etapa de tratamiento con oxígeno en presencia de al menos un ácido perbenzoico, para disminuir la cantidad de ácido hexenurónico.

20 [0011] Un objetivo de la presente invención es reducir o eliminar los ácidos hexenurónicos (HexA) de las pulpas lignocelulósicas y/o mejorar/aumentar el brillo de la pulpa. Otro objetivo es aumentar el brillo de la pulpa, p. ej., sin reducir el contenido de ácidos hexenurónicos en la pulpa.

RESUMEN

25 [0012] En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir el contenido de ácidos hexenurónicos en una pulpa celulósica química y/o mejorar el brillo de la pulpa celulósica, que comprende poner en contacto la pulpa celulósica con una composición acuosa que contiene 1) haloperoxidasa, 2) peróxido de hidrógeno y 3) iones haluro/iones seleccionados del grupo que consiste en iones cloruro, bromuro, yoduro y tiocianato, y opcionalmente con 4) una o más aminas terciarias. Un segundo aspecto se refiere a un método para mejorar el brillo de la pulpa celulósica sin reducir significativamente el contenido de ácidos hexenurónicos en ella. El segundo aspecto se puede realizar sin poner en contacto la pulpa celulósica con una o más aminas terciarias. Otros aspectos y realizaciones de la invención son evidentes a partir de la descripción y los ejemplos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Pulpa celulósica

35 [0013] La pulpa celulósica se puede usar para la producción de materiales de papel, como papel, papel de cartón, cartón corrugado, papel tisú, toallas, materiales de embalaje, contenedores de cartón corrugado o cajas.

40 [0014] La pulpa celulósica es un material fibroso preparado por separación química o mecánica de fibras de celulosa de la madera, cultivos de fibra o residuos de papel. Por ejemplo, la pulpa se puede suministrar como pulpa virgen, o se puede derivar de una fuente reciclada. La pulpa puede ser una pulpa de madera, una pulpa que no es de madera o una pulpa hecha de residuos de papel. Una pulpa de madera puede estar hecha de madera blanda como pino, secuoya, abeto, píceas, cedro y cicuta o de madera dura como arce, aliso, abedul, nogal, haya, álamo, acacia y eucalipto. Se puede fabricar una pulpa que no sea de madera, por ejemplo, de lino, cáñamo, bagazo, bambú, algodón o kenaf. Se puede fabricar una pulpa de residuo de papel volviendo a procesar papel usado tal como periódicos, desechos de oficina mezclados, impresiones de ordenador, libros de cuentas en blanco, revistas, cartones de leche, vasos de papel, etc.

50 [0015] En una realización particular, la pulpa que se va a tratar comprende tanto pulpa de madera dura como pulpa de madera blanda.

[0016] La pulpa de madera que se va a tratar es una pulpa química (tal como pulpa Kraft o pulpa de sulfito), pulpa semiquímica (PSQ), pulpa quimiotermomecánica (PQTM) o pulpa quimiomecánica blanqueada (PQMB).

55 [0017] La pulpa química se fabrica mediante cocción alcalina o ácida, por lo que se eliminan la mayoría de los componentes de lignina y hemicelulosa. En la fabricación de Kraft o la cocción de sulfato, se utilizan sulfuro de sodio e hidróxido de sodio como principales productos químicos de cocción.

60 [0018] La pulpa Kraft que se va a tratar puede ser una pulpa Kraft no blanqueada, parcialmente blanqueada o totalmente blanqueada, que puede consistir en madera blanda blanqueada Kraft (SWBK, también llamada NBKP (pulpa Kraft blanqueada Nadel Holz)), madera dura blanqueada Kraft (HWBK, también llamada LBKP (pulpa Kraft blanqueada Laub Holz)) o una mezcla de estas. Opcionalmente se puede realizar la deslignificación con oxígeno.

65 [0019] La pulpa que se va a usar en el proceso de la invención es una suspensión de pulpa mecánica o química o una combinación de las mismas. Por ejemplo, la pulpa que se va a usar en el proceso de la invención puede comprender un 0 %, 10-20 %, 20-30 %, 30-40 %, 40-50 %, 50-60 %, 60-70 %, 70 -80 %, 80-90 % o 90-100 % de

pulpa química. En una realización particular, una pulpa química forma parte de la pulpa que se usa para fabricar el material de papel. En el presente contexto, la expresión "forma parte de" significa que en la pulpa que se utilizará en el proceso de la invención, el porcentaje de pulpa química se encuentra dentro del intervalo del 1-99 %. En realizaciones particulares, el porcentaje de pulpa química se encuentra dentro del intervalo del 2-98 %, 3-97 %, 4-96 %, 5-95 %, 6-94 %, 7-93 %, 8-92 %, 9 -91 %, 10-90 %, 15-85 %, 20-80 %, 25-75 %, 30-70 %, 40-60 % o 45-55 %.

[0020] En una realización particular del uso y el procedimiento de la invención, la pulpa química es una pulpa Kraft, una pulpa de sulfito, una pulpa semiquímica (SCP), una pulpa termomecánica (PTM), una pulpa quimiotermomecánica (PQTM), una pulpa quimiotermomecánica blanqueada (PQTMB). En realizaciones particulares, la pulpa Kraft es pulpa Kraft no blanqueada, parcialmente blanqueada o completamente blanqueada, por ejemplo, Kraft blanqueada de madera blanda (SWBK, también llamada NBKP (pulpa Kraft blanqueada Nadel Holz)), Kraft blanqueada de madera dura (HWBK, también llamada LBKP (pulpa Kraft blanqueada Laub Holz)) o una mezcla de las mismas.

Haloperoxidasa

[0021] Las haloperoxidasas adecuadas para ser incorporadas en el método de la invención incluyen cloroperoxidasas, bromoperoxidasas y compuestos que exhiben actividad de cloroperoxidasa o bromoperoxidasa. Las haloperoxidasas forman una clase de enzimas que son capaces de oxidar haluros (Cl⁻, Br⁻, YO⁻) y tiocianato (SCN⁻) en presencia de peróxido de hidrógeno o un sistema de generación de peróxido de hidrógeno a los correspondientes ácidos hipohalós o hipohalitos; o en el caso de tiocianato, a ácido hipotiocianoso o hipotiocianita.

[0022] Las haloperoxidasas se clasifican de acuerdo con su especificidad por los iones haluro. Las cloroperoxidasas (E.C. 1.11.1.10) catalizan la formación de hipoclorito a partir de iones cloruro, hipobromito de iones bromuro e hipoyodito a partir de iones yoduro; y las bromoperoxidasas catalizan la formación de hipobromito a partir de iones de bromuro e hipoyodito a partir de iones yoduro. El hipoyodito, sin embargo, con yoduro se desproporciona para formar yodo elemental y, por lo tanto, yodo es el producto observado. Los compuestos de hipohalito pueden reaccionar posteriormente con otros compuestos formando compuestos halogenados.

[0023] En una realización preferida, la haloperoxidasa de la invención es una cloroperoxidasa.

[0024] Las haloperoxidasas se han aislado de diversos organismos: mamíferos, animales marinos, plantas, algas, líquenes, hongos y bacterias. En general, se acepta que las haloperoxidasas son las enzimas responsables de la formación de compuestos halogenados en la naturaleza, aunque pueden estar implicadas otras enzimas.

[0025] Las haloperoxidasas se han aislado de muchos hongos diferentes, en particular del grupo de hongos hifomicetos dematiáceos, como *Caldariomyces*, p.ej., *C. fumago*, *Alternaria*, *Curvularia*, p.ej., *C. verruculosa* y *C. inaequalis*, *Drechslera*, *Ulocladium* y *Botrytis*.

[0026] Las haloperoxidasas también se han aislado de bacterias tales como *Pseudomonas*, p. ej., *P. pirrocinia* y *Streptomyces*, p.ej., *S. aureofaciens*.

[0027] En una realización preferida, la haloperoxidasa es una vanadio haloperoxidasa, es decir, una haloperoxidasa que contiene vanadato.

[0028] En una realización más preferida, la haloperoxidasa se puede obtener de *Curvularia* sp., en particular *Curvularia verruculosa* o *Curvularia inaequalis*, como *C. inaequalis* CBS 102.42 tal como se describe en WO 95/27046, p.ej., una vanadio haloperoxidasa codificada por la secuencia de ADN de WO 95/27046, figura 2, todos incorporados mediante referencia; o *C. verruculosa* CBS 147.63 o *C. verruculosa* CBS 444.70 tal como se describe en WO 97/04102.

[0029] En una realización, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa tiene al menos un 60 % de identidad, preferiblemente al menos un 65 %, más preferiblemente al menos un 70 %, más preferiblemente al menos un 75 %, más preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 %, y lo más preferible un 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de una haloperoxidasa de *Curvularia verruculosa* (ver p. ej., SEQ ID NO: 2 en WO 97/04102; también se muestra como SEQ ID NO: 1 en la presente solicitud/lista de secuencias) o *Curvularia inaequalis* (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos madura codificada por la secuencia de ADN de la figura 2 de WO 95/27046; también se muestra como SEQ ID NO: 2 en la presente solicitud/lista de secuencias).

[0030] En una realización, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa tiene una o varias sustituciones y/o una o varias deleciones y/o una o varias inserciones en comparación con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

[0031] La vanadio cloroperoxidasa también puede obtenerse de *Drechslera hartlebii* tal como se describe en WO 01/79459, *Dendryphiella salina* tal como se describe en WO 01/79458, *Phaeotrichoconis crotalarie* tal como se describe en WO 01/79461 o *Geniculosporium* sp. tal como se describe en WO 01/79460.

[0032] La relación entre dos secuencias de aminoácidos se describe mediante el parámetro "identidad de secuencia". Para los propósitos de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453) tal como se implementó en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16:276-277), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros utilizados son la penalización de abertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (EMBOSS versión de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenida mediante la opción -nobrief) se utiliza como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

$$(\text{Residuos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud del alineamiento} - \text{Número total de gaps en alineamiento})$$

[0033] La concentración de la haloperoxidasa en la composición acuosa típicamente está en el intervalo de 0,01-100 ppm de proteína enzimática, preferiblemente de 0,05-50 ppm de proteína enzimática, más preferiblemente de 0,1-50 ppm de proteína enzimática, más preferiblemente de 0,1-30 ppm de proteína enzimática, más preferiblemente 0,5-20 ppm de proteína enzimática y lo más preferible 0,5-10 ppm de proteína enzimática.

[0034] En una realización, la concentración de haloperoxidasa está típicamente en el intervalo de 1-60 ppm de proteína enzimática, preferiblemente 1-20 ppm de proteína enzimática, más preferiblemente 1-10 ppm de proteína enzimática.

[0035] En una realización, la haloperoxidasa se inmoviliza en un soporte sólido o semisólido.

Determinación de actividad Haloperoxidasa

[0036] Puede realizarse un ensayo para determinar la actividad haloperoxidasa mezclando 100 μl de muestra de haloperoxidasa (que contiene aproximadamente 0,2 μg de proteína enzimática/ml) y 100 μl de un tampón de fosfato de sodio 0,3 M pH 7 que contiene bromuro potásico 0,5 M y fenol rojo del 0,008 %. agregando la solución a 10 μL de H_2O_2 del 0,3 % y midiendo la absorción a 595 nm como función del tiempo.

[0037] Se puede llevar a cabo otro ensayo que usa monoclorodimedona (Sigma M4632, $\epsilon = 20000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 290 nm) como sustrato midiendo la disminución de la absorción a 290 nm en función del tiempo. El ensayo se realiza en una solución acuosa de fosfato de sodio 0,1 M o acetato de sodio 0,1 M, monoclorodimedona 50 μM , KBr/KCl 10 mM, H_2O_2 1 mM y aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de haloperoxidasa.

Peróxido de hidrógeno

[0038] El peróxido de hidrógeno requerido por la haloperoxidasa se puede proporcionar como una solución acuosa de peróxido de hidrógeno o un precursor de peróxido de hidrógeno para la producción in situ de peróxido de hidrógeno. Cualquier entidad sólida que libere un peróxido tras la disolución, que pueda ser utilizada por la haloperoxidasa, puede servir como fuente de peróxido de hidrógeno. Los compuestos que producen peróxido de hidrógeno tras la disolución en agua o un medio acuoso apropiado incluyen, pero no se limitan a, peróxidos metálicos, percarbonatos, persulfatos, perfosfatos, peroxiácidos, alcóxidos, peróxidos de acilo, peroxiésteres, peróxido de urea, perboratos y ácidos peroxicarboxílicos o sales de los mismos.

[0039] Otra fuente de peróxido de hidrógeno es un sistema enzimático generador de peróxido de hidrógeno, tal como una oxidasa junto con un sustrato para la oxidasa. Los ejemplos de combinaciones de oxidasa y sustrato comprenden, pero no se limitan a, aminoácido oxidasa (véase, p. ej., EE. UU. 6.248.575) y un aminoácido adecuado, glucosa oxidasa (véase, p. ej., WO 95/29996) y glucosa, lactato oxidasa y lactato, galactosa oxidasa (véase, p. ej., WO 00/50606) y galactosa, y aldosa oxidasa (véase, p. ej., WO 99/31990) y una aldosa adecuada.

[0040] Estudiando EC 1.1.3., EC 1.2.3., EC 1.4.3., y EC 1.5.3. o clases similares (bajo la Unión Internacional de Bioquímica), otros ejemplos de tales combinaciones de oxidasas y sustratos son fácilmente reconocidos por un experto en la técnica.

[0041] Los oxidantes alternativos que se pueden aplicar para haloperoxidasas pueden ser oxígeno combinado con un donador de hidrógeno adecuado como ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, ácido dihidroxifumárico o cisteína. Un ejemplo de dicho sistema donador de hidrógeno y oxígeno se describe en Pasta et al., Biotechnology & Bioengineering, (1999) vol. 62, número 4, págs. 489-493.

[0042] Se puede añadir peróxido de hidrógeno o una fuente de peróxido de hidrógeno al comienzo o durante el

método de la invención, p. ej., como una o más adiciones separadas de peróxido de hidrógeno; o continuamente como una adición de lote alimentado. Las cantidades típicas de peróxido de hidrógeno corresponden a niveles de 0,001 mM a 25 mM, preferiblemente a niveles de 0,005 mM a 5 mM, y particularmente a niveles de 0,01 a 1 mM o de 0,02 a 2 mM de peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno también puede usarse en una cantidad correspondiente a niveles de 0,1 mM a 25 mM, preferiblemente a niveles de 0,5 mM a 15 mM, más preferiblemente a niveles de 1 mM a 10 mM, y lo más preferible a niveles de Peróxido de hidrógeno 2 mM a 8 mM.

Iones cloruro, bromuro, yoduro y/o tiocianato

[0043] Los iones cloruro (Cl^-), iones bromuro (Br^-), iones yoduro (I^-) y/o iones tiocianato (SCN^-) para la reacción con haloperoxidasa se pueden proporcionar de muchas maneras diferentes, tales como añadiendo sal(es) de cloruro, sal(es) de bromuro, sal(es) de yoduro y/o sales de tiocianato a una solución acuosa. Preferiblemente, los iones cloruro se usan para la reacción con haloperoxidasa.

[0044] En una realización preferida, la(s) sal(es) de cloruro son cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de amonio (NH_4Cl) o cloruro de magnesio (MgCl_2), o mezclas de las mismas.

[0045] En otra realización preferida, la(s) sal(es) de bromuro son bromuro de sodio (NaBr), bromuro de potasio (KBr) o bromuro de magnesio (MgBr_2), o mezclas de las mismas.

[0046] En otra realización preferida, la(s) sal(es) de yoduro son yoduro de sodio (NaI), yoduro de potasio (KI) o yoduro de magnesio (MgI_2), o mezclas de las mismas.

[0047] En otra realización preferida, la(s) sal(es) de tiocianato son tiocianato de sodio (NaSCN), tiocianato de potasio (KSCN) o tiocianato de magnesio ($\text{Mg}(\text{SCN})_2$), o mezclas de las mismas.

[0048] La concentración de iones cloruro, iones bromuro, iones yoduro y/o iones tiocianato en la composición acuosa según la invención puede estar colectiva o individualmente en el intervalo de 0,01 mM a 1000 mM, preferiblemente en el intervalo de 0,05 mM a 500 mM, más preferiblemente en el intervalo de 0,1 mM a 100 mM, lo más preferible en el intervalo de 0,1 mM a 50 mM, y en particular en el intervalo de 1 mM a 25 mM.

[0049] En una realización, los iones cloruro no son NH_4Cl .

Amina terciaria

[0050] En una realización preferida, se incluyen una o más aminas terciarias en el método según la invención o en la composición acuosa según la invención. La adición de una o más aminas terciarias puede potenciar/aumentar aún más el brillo en comparación con el método de la invención en el que una o más aminas terciarias no están incluidas en el método o la composición acuosa de la invención. La adición de una o más aminas terciarias puede potenciar/aumentar la eliminación de HexA en comparación con el método de la invención en el que una o más aminas terciarias no están incluidas en el método o la composición acuosa de la invención. Además, la adición de una o más aminas terciarias puede potenciar/aumentar el brillo y potenciar/aumentar la eliminación de HexA en comparación con el método de la invención en el que una o más aminas terciarias no están incluidas en el método o la composición acuosa de la invención.

[0051] Una amina terciaria es un compuesto derivado de amoniaco en el que los tres átomos de hidrógeno son reemplazados por sustituyentes (R) que tiene la estructura general R_3N . Cualquier amina terciaria capaz de catalizar la reacción de ácido hipocloroso (HOCl) u otras especies reactivas generadas en la etapa de HAP con HexA y cromóforos de pulpa es adecuada para la presente invención. Este tipo de efecto catalítico de varias aminas terciarias en la reacción de HOCl con diferentes sustratos fue descrito por Prütz en Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 357, n.º 2, 15 de septiembre, págs. 265-273, 1998.

[0052] La amina o aminas terciarias pueden ser aminas terciarias orgánicas y/o inorgánicas. La amina o aminas terciarias pueden ser aminas terciarias cíclicas y/o no cíclicas.

[0053] La amina terciaria es preferiblemente 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano (DABCO, también conocida como trietilendiamina) con número CAS 280-57-9 suministrado por Sigma-Aldrich (número de producto: D27802).

[0054] La amina o aminas terciarias pueden ser una amina terciaria bicíclica tal como la quinuclidina. La amina o aminas terciarias también pueden ser un tampón de morfolina MES, los tampones de piperazina Hepes, RGT, DMNA, Pipes, 1- [Bis [3- (dimetilamino) propil] amino] -2-propanol, ácido 1,6-diaminohexano-*N, N, N'*, *N'*-tetraacético, 2- [2- (dimetilamino) etoxi] etanol, *N, N, N'*, *N''*, *N'''*-Pentametildietilentriamina, *N, N, N'*, *N''*-Tetraetil-1,3-propanodiamina, *N, N, N'*, *N''*-Tetrametil-1,4-butanodiamina, *N, N, N'*, *N''*-Tetrametil-2-buteno-1,4-diamina, *N, N, N'*, *N''*-Tetrametil-1,6-hexanodiamina, 1,4,8,11-tetrametil-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano, 1,3,5-trimetilhexahidro-1,3,5-triazina y/o trimetilolpropano tris (2-metil-1-aziridinapropionato). En una realización, las

aminas terciarias adecuadas pueden ser una o más de las seleccionadas del grupo que consiste en trimetilamina, trietilamina, N,N-dimetilciclohexilamina, N,N-dietilciclohexilamina, N,N-dimetilanilina, N,N-dietil anilina, piridina, picolina, metilpiridina, quinolina o sales de las mismas. Los ejemplos de aminas terciarias útiles incluyen las N-alkil morfolinas en las que el sustituyente alquilo tiene de 1 a 18 átomos de carbono, de las cuales es típica la N-metilmorfolina, trietilamina, trietanolamina, dimetiletanolamina, N,N-dietilciclohexilamina y 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano. Las aminas terciarias pueden seleccionarse asimismo del grupo que consiste en di- y poliaminas, di- y poliaminas alcoxiladas, 3-alkiloxipropilaminas, 3-alkiloxipropilaminas alcoxiladas, N- (3-alcóxipropil) -1,3-propanodiaminas, N- (3-alcóxipropil) -1,3-propanodiaminas alcoxiladas, amidoaminas y aminoácidos. En otra realización, las aminas terciarias pueden seleccionarse del grupo que consiste en metilendiamina; imidazoles sustituidos tales como 1 - 2 - dimetilimidazol, 1 - metil - 2 - hidroxietilimidazol; N, N 'dimetilpiperazina o piperazinas sustituidas tales como aminoetilpiperazina o bis(N-metilpiperazina) etilurea o N, N', N' trimetil aminoetilpiperazina; N-metilpirrolidinas y metilpirrolidinas sustituidas tales como 2-aminoetil-N, metilpirrolidinas o bis(N-metilpirrolidina) etilurea; u otras aminoalquilureas terciarias o bis(aminoalquil) urea terciaria tal como N, N- (3-dimetilaminopropil) urea; 3-dimetilaminopropilamina; N, N, N "N" tetrametildipropilentriamina; N, N-bis (3-dimetilaminopropil) 1-3 propanodiamina; N, N-dimetilamino-N ', N' bis(hidroxil- (2) -propilpropileno (1, 3) diamina; tetrametilguanidina; dimetilaminopropilamina, 1, 2 bis-diisopropanol (3-dimetilaminopropilamina), piperidinas sustituidas y aminotriazinas como N, N dimetilaminopropil-S-triazina; N-alkilmorfolinas tales como N-metilmorfolina, N-etilmorfolina, N-butilmorfolina y dimorfolinodietiléter; N, N dimetilaminoetanol; N₅N-dimetilaminoetoxietanol; bis(dimetilaminopropil) -amino-2-propanol; bis(dimetilamino) -2-propanol; bis (N, N-dimetilamino) etiléter; N, N, N'-Trimetil-N'-hidroxietil-bis- (aminoetil) éter; N₅N dimetilaminoetil-N'-metilaminoetanol; tetrametiliminobispropilamina, y mezclas de las mismas.

Xilanasa

[0055] Una xilanasa, como la que se puede usar opcionalmente en la presente invención, es una enzima clasificada como EC 3.2.1.8. El nombre oficial es endo-1,4-beta-xilanasa. El nombre sistemático es 1,4-beta-D-xilan xilanohidrolasa. Se pueden usar otros nombres, como endo- (1-4) -beta-xilanasa; (1-4) -beta-xilan 4-xilanohidrolasa; endo-1,4-xilanasa; xilanasa; beta-1,4-xilanasa; endo-1,4-xilanasa; endo-beta-1,4-xilanasa; endo-1,4-beta-D-xilanasa; 1,4-beta-xilan xilanohidrolasa; beta-xilanasa; beta-1,4-xilan xilanohidrolasa; endo-1,4-beta-xilanasa; beta-D-xilanasa. La reacción catalizada es la endohidrólisis de los enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en xilanos.

[0056] De acuerdo con CAZy (ModO), las xilanasas se clasifican actualmente en cualquiera de las siguientes familias de glucósido hidrolasas: 10, 11, 43, 5 u 8.

[0057] En una realización, la xilanasa se obtiene de una xilanasa bacteriana, p. ej., una xilanasa de *Bacillus*, por ejemplo, de una cepa de *Bacillus halodurans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus agaradhaerens*, *Bacillus circulans*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus sp.*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*, incluyendo cada una de las secuencias de xilanasa de *Bacillus* introducidas en el sitio de CAZy (ModO).

[0058] En una realización particular adicional, la glucósido hidrolasa de la familia 11 es una xilanasa fúngica. Las xilanasas fúngicas incluyen levadura y polipéptidos fúngicos filamentosos como se ha definido anteriormente, con la condición de que estos polipéptidos tengan actividad de xilanasa.

[0059] Los ejemplos de xilanasas fúngicas de la familia 11 de glucósido hidrolasas son los que pueden obtenerse de los siguientes géneros fúngicos: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Emericella*, *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Humicola*, *Lentinula*, *Magnaporthe*, *Neocallimastix*, *Nocardiosis*, *Orpinomyces*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pichia*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermomyces*, *Trichoderma*.

[0060] Los ejemplos de especies de estos géneros se enumeran a continuación en la sección general de polipéptidos. Las secuencias de polipéptidos de xilanasa que se obtienen de varios de estos organismos se han enviado a las bases de datos GenBank / GenPept y SwissProt con números de acceso que son evidentes desde el sitio CAZy (ModO).

[0061] Una xilanasa fúngica preferida de la familia 11 de glucósido hidrolasas es una xilanasa obtenida de

- (i) *Aspergillus*, tales como SwissProt P48824, SwissProt P33557, SwissProt P55329, SwissProt P55330, SwissProt Q12557, SwissProt Q12550, SwissProt Q12549, SwissProt P55328, SwissProt Q12534, SwissProt P87037, SwissProt P55331, SwissProt Q12568, GenPept BAB20794.1, GenPept CAB69366.1;
- (ii) *Trichoderma*, tales como SwissProt P48793, SwissProt P36218, SwissProt P36217, GenPeptAAG01167.1, GenPept CAB60757.1;
- (iii) *Thermomyces* o *Humicola*, como SwissProt Q43097; o
- (iv) una xilanasa que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos un 75 % de identidad con una secuencia de aminoácidos (madura) de cualquiera de las xilanasas de (i) - (iii); o
- (v) una xilanasa codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de baja astringencia con una parte que codifica xilanasa madura de un gen correspondiente a cualquiera de las

xilanasas de (i) - (iii);

(vi) una variante de cualquiera de las xilanasas de (i) - (iii) que comprende una sustitución, delección y/o inserción de uno o más aminoácidos;

(vii) una variante alélica de (i) - (iv);

5 (viii) un fragmento de (i), (ii), (iii), (iv) o (vi) que tiene actividad de xilanasas; o

(ix) un polipéptido sintético diseñado sobre la base de (i) - (iii) y que tiene actividad de xilanasas.

[0062] Una xilanasas preferida es la xilanasas de *Thermomyces* descrita en WO 96/23062.

10 [0063] Se describen también varias xilanasas de *Aspergillus* en EP 695349, EP 600865, EP 628080 y EP 532533. EP 579672 describe una xilanasas de *Humicola*

15 [0064] Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de la xilanasas tiene al menos un 60 % de identidad, preferiblemente al menos un 65 % de identidad, más preferiblemente al menos un 70 % de identidad, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad y lo más preferible un 97 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de una xilanasas de *Bacillus agaradhaerens* (SEQ ID NO: 3).

20 [0065] En una realización, la secuencia de aminoácidos de la xilanasas tiene una o varias sustituciones, delecciones o inserciones en comparación con la SEQ ID NO: 3. En particular, la secuencia de aminoácidos de la xilanasas es idéntica a SEQ ID NO: 3.

Determinación de la actividad de xilanasas

25 [0066] La actividad de xilanasas puede medirse usando cualquier ensayo, en el que se emplee un sustrato, que incluye endoenlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en xilanos. El pH y la temperatura del ensayo se adaptarán a la xilanasas en cuestión.

30 [0067] Diferentes tipos de sustratos están disponibles para la determinación de la actividad de xilanasas, p. ej., comprimidos de arabinoxilano reticulado Xylazyme (de MegaZyme), o dispersiones de polvo insolubles y soluciones de arabinoxilano teñido de azo.

Ácido Hexenurónico (HexA)

35 [0068] El número Kappa es una indicación del contenido de lignina residual o blanqueabilidad de la pulpa mediante un método de análisis estandarizado. El número Kappa se determina mediante la ISO 302, que es aplicable a todo tipo de pulpas químicas y semiquímicas, y da un número Kappa en el rango de 1-100. La medición está inflada por la presencia de ácidos hexenurónicos en la pulpa.

40 [0069] Los ácidos hexenurónicos son azúcares insaturados formados por la eliminación del metanol catalizada por bases a partir de 4-O-metil-D-glucuronoxilanos de las hemicelulosas, durante el proceso de fabricación química de la pulpa .

45 [0070] En el contexto de la presente invención, la medición de HexA en la pulpa se puede basar en un procedimiento descrito en Vuorinen et al., "Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps", Journal of Pulp and Paper Science, 1999, 25 (5), págs.155-162.; donde el contenido de HexA en la pulpa se hidroliza selectivamente y se convierte en derivados de furano que se cuantifican en el hidrolizado mediante espectroscopía UV (como se muestra en el Ejemplo 1).

50 [0071] El número Kappa es una indicación del contenido de lignina residual o blanqueabilidad de la pulpa mediante un método de análisis estandarizado. El número Kappa se determina mediante la ISO 302, que es aplicable a todo tipo de pulpas químicas y semiquímicas, y da un número Kappa en el rango de 1-100. La medición está inflada por la presencia de ácidos hexenurónicos en la pulpa.

Determinación del brillo y la viscosidad intrínseca

60 [0072] Las hojas de ensayo para mediciones de brillo pueden prepararse de acuerdo con el procedimiento estándar TAPPI T205 usando un formador de hojas semiautomatizado Formax, y prensarse, p. ej., con una prensa automática de hojas de Labtech. Los valores de brillo de las hojas de ensayo se pueden determinar usando, p. ej., un espectrofotómetro Macbeth Color-Eye 7000 Remissions, midiendo 3 veces en cada lado de la hoja de ensayo a 460 nm, por ejemplo. En cuanto a la medición de "brillo ISO" (factor de reflectancia azul difusa), las hojas de ensayo se pueden preparar de acuerdo con ISO 3688 usando, p. ej., un embudo Büchner, y prensarse con, por ejemplo, una prensa automática de hojas de Labtech. Las mediciones pueden, p. ej., hacerse con un espectrofotómetro Color Touch para PC de Technidyne.

65

[0073] La viscosidad intrínseca de la pulpa se puede medir de acuerdo con ISO 5351.

Métodos y usos

5 [0074] En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir el contenido de ácidos hexenurónicos en una pulpa celulósica química y/o mejorar el brillo de la pulpa celulósica, que comprende poner en contacto la pulpa celulósica con una haloperoxidasa, peróxido de hidrógeno e iones haluro/iones seleccionados del grupo que se compone de iones cloruro, bromuro, yoduro y tiocianato, y opcionalmente con una o más aminas terciarias. La haloperoxidasa, el peróxido de hidrógeno y los iones haluro/iones seleccionados del grupo que se compone de iones cloruro, bromuro, yoduro y tiocianato, y opcionalmente una o más aminas terciarias pueden estar en una composición acuosa. En una realización, el ion haluro no es NH₄Cl y la pulpa celulósica no entra en contacto con aminas terciarias.

15 [0075] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para mejorar el brillo de la pulpa celulósica química sin una reducción significativa del contenido de ácidos hexenurónicos en una pulpa celulósica química, que comprende poner en contacto la pulpa celulósica con una haloperoxidasa, peróxido de hidrógeno y NH₄Cl sin poner en contacto la pulpa celulósica con una o más aminas terciarias.

20 [0076] En una realización, la haloperoxidasa es una cloroperoxidasa de la clase enzimática EC 1.11.1.10. Preferiblemente, la haloperoxidasa es una vanadio haloperoxidasa; más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa tiene al menos un 80 % de identidad, preferiblemente al menos un 85 % de identidad, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, incluso más preferiblemente al menos un 95 % de identidad y lo más preferible al menos un 97 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de una haloperoxidasa de *Curvularia verruculosa* (SEQ ID NO: 1) o una haloperoxidasa de *Curvularia inequalis* (SEQ ID NO: 2).

30 [0077] En una realización, la pulpa celulósica química/composición acuosa también se pone en contacto con una xilanasa antes, después o simultáneamente a la aplicación del método de la invención. Preferiblemente, la xilanasa es una endo-1,4-beta-xilanasa de la clase enzimática EC 3.2.1.8. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de la xilanasa tiene al menos un 60 % de identidad, preferiblemente al menos un 65 % de identidad, más preferiblemente al menos un 70 % de identidad, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad y lo más preferible un 97 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de una xilanasa de *Bacillus agaradhaerens* (SEQ ID NO: 3). En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa se muestra como SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la xilanasa se muestra como SEQ ID NO: 3.

40 [0078] En una realización, la pulpa celulósica química se prepara mediante cocción alcalina. La pulpa celulósica química puede ser una pulpa kraft.

45 [0079] En una realización, el método de la invención incluye una etapa de extracción alcalina posterior (etapa E). Preferiblemente, la etapa de extracción alcalina se refuerza con peróxido de hidrógeno y/u oxígeno, y se denominan etapa E o E_P o E_{OP}, respectivamente. Más preferiblemente, incluye otros productos químicos de blanqueo combinados con la extracción, como etapas de dióxido de cloro (etapas D), ozono (etapas Z) y peróxido de hidrógeno (etapas P).

50 [0080] En otro aspecto, la invención proporciona una composición acuosa que comprende una haloperoxidasa; iones cloruro, bromuro, yoduro o tiocianato; peróxido de hidrógeno y una pulpa celulósica química que comprende ácidos hexenurónicos y opcionalmente una o más aminas terciarias.

55 [0081] En una realización, la haloperoxidasa es una cloroperoxidasa de la clase enzimática EC 1.11.1.10. Preferiblemente, la haloperoxidasa es una vanadio haloperoxidasa; más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa tiene al menos un 80 % de identidad, preferiblemente al menos un 85 % de identidad, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, incluso más preferiblemente al menos un 95 % de identidad y lo más preferible al menos un 97 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de una haloperoxidasa de *Curvularia verruculosa* (SEQ ID NO: 1) o una haloperoxidasa de *Curvularia inequalis* (SEQ ID NO: 2).

60 [0082] En una realización, la pulpa celulósica química también incluye una xilanasa. Preferiblemente, la xilanasa es una endo-1,4-beta-xilanasa de la clase enzimática EC 3.2.1.8. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de la xilanasa tiene al menos un 60 % de identidad, preferiblemente al menos un 65 % de identidad, más preferiblemente al menos un 70 % de identidad, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad y lo más preferible un 97 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de una xilanasa de *Bacillus agaradhaerens* (SEQ ID NO: 3). En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa se muestra

como SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la xilanasa se muestra como SEQ ID NO: 3.

[0083] En una realización, la pulpa celulósica química es una pulpa kraft.

5 [0084] La invención también proporciona el uso de los métodos y composiciones anteriores para reducir el contenido de ácidos hexenurónicos en la pulpa celulósica química.

10 [0085] Los métodos según la invención pueden llevarse a cabo a una temperatura entre 20 y 90 grados Celsius, preferiblemente entre 20 y 80 grados Celsius, más preferiblemente entre 20 y 70 grados Celsius, incluso más preferiblemente entre 30 y 70 grados Celsius, más preferiblemente entre 30 y 60 grados Celsius, y en particular entre 30 y 50 grados Celsius.

15 [0086] Los métodos de la invención pueden emplear un tiempo de tratamiento de 1 minuto a 120 minutos, preferiblemente de 1 minuto a 90 minutos, más preferiblemente de 10 minutos a 90 minutos, lo más preferible de 10 minutos a 60 minutos, y en particular de 10 minutos a 30 minutos. En otra realización, los métodos de la invención pueden emplear un tiempo de tratamiento de 5 minutos a 4 horas, tal como de 5 minutos a 15 minutos, por ejemplo, de 15 minutos a 30 minutos, tal como de 30 minutos a 1 hora, por ejemplo, de 1 hora a 2 horas, tal como de 2 horas a 3 horas o, por ejemplo, de 3 horas a 4 horas, o cualquier combinación de estos intervalos.

20 [0087] Los métodos de la invención se pueden llevar a cabo a pH 2 hasta pH 11, preferiblemente a pH 3 hasta pH 10, más preferiblemente a pH 3 hasta pH 9. Más preferiblemente, los métodos de la invención se llevan a cabo al pH o a la temperatura óptimos del sistema de haloperoxidasa +/- una unidad de pH.

25 [0088] En una realización, la viscosidad intrínseca de la pulpa se mantiene después de la etapa de HAP, lo que indica que no hay efecto sobre la degradación de la pulpa.

[0089] La presente invención se describe en más detalle en los siguientes puntos.

30 1. Un método para reducir el contenido de ácidos hexenurónicos en una pulpa celulósica química y/o mejorar el brillo de una pulpa celulósica química, que comprende poner en contacto la pulpa celulósica con una haloperoxidasa, peróxido de hidrógeno e iones seleccionados del grupo que se compone de cloruro, bromuro, yoduro y tiocianato, y opcionalmente con una o más aminas terciarias.

35 2. El método del punto 1, en el que la haloperoxidasa es una cloroperoxidasa de la clase enzimática EC 1.11.1.10.

3. El método de los puntos 1 o 2, en el que la haloperoxidasa es una vanadio haloperoxidasa.

40 4. El método de cualquiera de los puntos 1 a 3, donde la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa tiene al menos un 80 % de identidad, preferiblemente al menos un 85 % de identidad, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, incluso más preferiblemente al menos un 95 % de identidad y lo más preferible al menos un 97 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de una haloperoxidasa de *Curvularia verruculosa* (SEQ ID NO: 1) o una haloperoxidasa de *Curvularia inequalis* (SEQ ID NO: 2).

45 5. El método de cualquiera de los puntos 1 a 4, en el que la pulpa celulósica química también se pone en contacto con una xilanasa; preferiblemente una endo-1,4-beta-xilanasa de la clase enzimática EC 3.2.1.8.

50 6. El método del elemento 5, donde la secuencia de aminoácidos de la xilanasa tiene al menos un 60 % de identidad, preferiblemente al menos un 65 % de identidad, más preferiblemente al menos un 70 % de identidad, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad y lo más preferible un 97 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de una xilanasa de *Bacillus agaradhaerens* (SEQ ID NO: 3).

55 7. El método de los puntos 5 o 6, en el que la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa se muestra como SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la xilanasa se muestra como SEQ ID NO: 3.

60 8. El método de cualquiera de los puntos 1 a 7, en donde la pulpa celulósica química es una pulpa hecha por cocción alcalina tal como una pulpa kraft, o una pulpa de sulfito o cualquier otra pulpa que necesita blanqueo.

9. El método de cualquiera de los puntos 1 a 8, que incluye una etapa de extracción alcalina posterior.

65 10. El método del punto 9, en el que la etapa de extracción alcalina se refuerza con peróxido de hidrógeno y/u oxígeno con o sin un agente de blanqueo previo como, por ejemplo, dióxido de cloro.

11. Una composición acuosa que comprende una haloperoxidasa; iones cloruro, bromuro, yoduro o tiocianato; y una pulpa celulósica química que comprende ácidos hexenurónicos y opcionalmente una o más aminas terciarias.

12. La composición del punto 11, en donde la pulpa celulósica química es una pulpa hecha por cocción alcalina tal como una pulpa kraft.

13. La composición de los puntos 11 o 12, que también incluye una xilanasa.

14. El uso de una haloperoxidasa para reducir el contenido de ácidos hexenurónicos en una pulpa celulósica química y/o para mejorar el brillo de una pulpa celulósica química.

15. El uso según la reivindicación 14, que incluye el uso de una xilanasa.

[0090] La presente invención se describe además mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

[0091] Los productos químicos utilizados como tampones y sustratos eran productos comerciales al menos de grado reactivo. La haloperoxidasa (HAP) utilizada en los ejemplos tiene una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 1. La xilanasa utilizada en los ejemplos tiene una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 3.

[0092] Las hojas de ensayo para mediciones de brillo se prepararon de acuerdo con el procedimiento estándar TAPPI T205 usando un formador de hojas semiautomatizado Formax, y se prensaron, p. ej., con una prensa automática de hojas de Labtech. Los valores de brillo de las hojas de ensayo se determinaron usando un espectrofotómetro Macbeth Color-Eye 7000 Remissions, midiendo 3 veces en cada lado de la hoja de ensayo a 460 nm. Se usaron cinco hojas de ensayo por muestra, lo que arrojó un total de 30 medidas por muestra. En cuanto a la medición de "brillo ISO" (factor de reflectancia azul difusa), las hojas de ensayo se prepararon de acuerdo con ISO 3688 usando un embudo Büchner, y se prensaron con una prensa automática de hojas de Labtech. Las mediciones se realizaron utilizando el espectrofotómetro Color Touch PC de Technidyne.

[0093] La viscosidad intrínseca de la pulpa se midió de acuerdo con ISO 5351.

EJEMPLO 1

Medición del contenido de HexA en la pulpa de papel

[0094] La medición de HexA en la pulpa se basó en un procedimiento descrito en Vuorinen et al., "Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps", Journal of Pulp and Paper Science, 1999, 25 (5), págs.155-162.; donde el contenido de HexA en la pulpa se hidroliza selectivamente y se convierte en derivados de furano que se cuantifican en el hidrolizado mediante espectroscopía UV.

[0095] Típicamente, 2,0-2,5 g de psh (pulpa secada al horno) se pesan y se mezclan con 150 ml de tampón de formiato (0,01 M, pH 3,5) en un vaso de precipitados de acero de 200 ml que se introduce en el Labomat BFA-24.

[0096] El Labomat BFA-24 (Werner Mathis AG, Suiza) es un instrumento que permite controlar la temperatura, la agitación mecánica y el tiempo de tratamiento de los sistemas de reacción en los vasos de precipitados. El instrumento está controlado por el software Univision S (Instrucción de programación "BFA" de Univision S, versión 2.0 edición 07/2006 de Werner Mathis AG, Suiza).

[0097] La temperatura del vaso de precipitados se incrementa mediante la transferencia de calor desde una unidad de radiación infrarroja. Los vasos se refrigeran enfriando el aire en un intercambiador de calor con un suministro de agua de refrigeración. El Labomat se puede operar cargando un programa predefinido que define los perfiles de temperatura, la agitación y el tiempo.

[0098] El programa predefinido para la medición de HexA en las muestras de pulpa tenía los siguientes parámetros: tiempo de hidrólisis de 60 minutos; temperatura de hidrólisis de 110 min y velocidad de rotación de 5 rpm con 30 s en sentido horario y 30 s en sentido antihorario.

[0099] Después del tiempo de hidrólisis predefinido (60 min), los recipientes calientes se enfriaron en un baño de

hielo. Una vez enfriado, se mezcló usando una varilla y se extrajo una muestra de suspensión de pulpa de cada recipiente y luego se filtró usando una jeringa de luer-loc de 10 ml acoplada a un filtro de 0,45 mm. El filtrado/hidrolizado recogido se analizó mediante espectroscopía UV y se midió la absorbancia a 245 y 285 nm, que corresponde a los máximos de absorción de ácido 2-furoico y 5-carboxi-2-furaldehído, respectivamente (Vuorinen *et al.* 1996).

[0100] El contenido de HexA en la pulpa se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$HexA (mmol/kg psh) = \frac{A V}{\epsilon l w}$$

w - peso de la muestra de pulpa secada al horno (kg);

V = 0,15 L;

A - absorbancia a 245 nm (ácido 2-furoico) con corrección de fondo a 480 nm;

$\epsilon = 8700 M^{-1}cm^{-1}$ - coeficiente de absorción molar de ácido 2-furoico a 245 nm con respecto a HexA en hexenuronoxilo-oligosacáridos;

l - longitud del camino óptico celular.

EJEMPLO 2

Dosificación de haloperoxidasa

[0101] Se usó pulpa kraft de eucalipto deslignificada con oxígeno (típicamente 10 g de fibra secada al horno; número kappa < 10) con una cantidad de HexAs de aprox. 55 mmol/kg psh en los tratamientos enzimáticos con haloperoxidasa. La pulpa se trató con haloperoxidasa al 10 % de consistencia, a una temperatura de 45 °C, pH 4,5 (tampón de acetato) y durante 60 min. La concentración inicial de peróxido de hidrógeno y cloruro de sodio (NaCl) fue de 0,6, 1,2, 2,0, 4,0 y 6,0 mM mientras que se usaron 6, 12, 20, 40 y 60 mg EP/kg psh de haloperoxidasa, respectivamente. La suspensión de pulpa se incubó en bolsas de plástico de polietileno selladas sumergidas en un baño de agua a temperatura controlada.

[0102] Después de la incubación, la pulpa se lavó y se filtró con 2 l de agua caliente del grifo dividida en dos etapas y 1 litro de agua desionizada.

[0103] En la Tabla 1, se muestra que hay una mayor eliminación de HexA de hasta aprox. 27 un % para una dosis incrementada de enzima, lo que se traduce en una disminución del número kappa.

Tabla 1.

Concentración de haloperoxidasa (mg EP/kg psh)	Contenido de HexA (mmol/kg psh)	Número Kappa
sin tratamiento	55	10
6	54,5	9,1
12	52,2	8,9
20	44,3	8,3
40	41,6	7,8
60	40,0	-

EJEMPLO 3

Efecto de una etapa de xilanasas antes de la etapa de haloperoxidasa

[0104] De forma similar al Ejemplo 2, se utilizó la misma pulpa kraft de eucalipto deslignificada con oxígeno. Esta pulpa se sometió a un tratamiento con xilanasas (etapa X) a pH 8 (tampón Britton-Robinson), a 55 °C durante 120 min (consistencia del 10 %). Después de la etapa X, la pulpa se lavó como se ha descrito previamente y se trató adicionalmente con haloperoxidasa en las mismas condiciones de temperatura, pH y tiempo de incubación que se estudiaron en el Ejemplo 2, pero usando diferentes sales de cloruro (NaCl y MgCl₂). La concentración inicial de sal fue 6 mM (como con H₂O₂), y se usaron 60 mg de haloperoxidasa EP/kg psh en la etapa HAP, y se usaron 6 mg de xilanasas EP/kg psh en la etapa X.

[0105] Los resultados presentados en la Tabla 2 se refieren solo a la haloperoxidasa tratada que no tenía un tratamiento previo con xilanasas, pero que fue tratada en las mismas condiciones que en la etapa X (tampón a pH 8, 55 °C durante 120 min y sin xilanasas)

[0106] Se ve que la adición de MgCl₂ conduce a un grado de eliminación de HexA comparable al de NaCl. El uso de NH₄Cl dio una modesta reducción en el contenido de HexA, pero se observó una disminución en el número kappa lo que indica la degradación de otras estructuras oxidables en la pulpa, tales como estructuras de lignina.

Tabla 2.

sal	Contenido de HexA (mmol/kg psh)	Número Kappa
sin tratamiento	55	10
NaCl	42,1	7,6
MgCl ₂	41,1	7,1
NH ₄ Cl	50,1	8,0

5 [0107] En la Tabla 3 se presentan los resultados de las pulpas que se trataron con xilanas (etapa X) seguido de tratamiento con haloperoxidasa (X-HAP). Hay una mayor eliminación de HexA cuando la etapa X precede al tratamiento con haloperoxidasa (hasta un 41 % de eliminación de HexA).

Tabla 3.

sal	Contenido de HexA (mmol/kg psh)	Número Kappa
sin tratamiento	55	10
NaCl	34,2	6,5
MgCl ₂	32,4	5,8
NH ₄ Cl	40,8	6,9

10 EJEMPLO 4

Efecto de la temperatura y el tiempo de incubación

15 [0108] De forma similar al Ejemplo 2, se utilizó la misma pulpa kraft de eucalipto deslignificada con oxígeno en los tratamientos enzimáticos con haloperoxidasa bajo el mismo pH. La temperatura de 60 °C y el tiempo de incubación de 120 min se estudiaron con NaCl. La concentración inicial de sal era 0,6 y 6 mM (como con H₂O₂) para dosificaciones baja y alta de enzima, respectivamente.

20 [0109] Los resultados de la eliminación de HexA se muestran en la Tabla 4. La cantidad de HexA eliminada se mejora extendiendo el tiempo de incubación a 120 minutos (compárese con la Tabla 1).

Tabla 4.

Experimento	Dosificación enzimática (mg EP/kg psh)	Contenido de HexA (mmol/kg psh)
60° C, 60 min, NaCl	6	51,5
60° C, 60 min, NaCl	60	46,9
45° C, 120 min, NaCl	60	38,0

25 EJEMPLO 5

Efecto de la haloperoxidasa (HAP) en la ganancia de brillo y blanqueabilidad

30 [0110] De forma similar al ejemplo 2, se utilizó la misma pulpa kraft de eucalipto deslignificada con oxígeno en los tratamientos enzimáticos con haloperoxidasa, en las mismas condiciones de temperatura y pH. La dosificación de la enzima fue de 60 mg EP/kg psh durante 120 minutos de tiempo de incubación. Se añadió NaCl o NH₄Cl a una concentración inicial 6 mM, la misma que con H₂O₂.

35 [0111] La pulpa tratada con HAP se blanqueó con una etapa de extracción alcalina reforzada con peróxido de hidrógeno (Ep), o con una etapa de dióxido de cloro (D) seguida de la etapa Ep. Se usó una muestra de control sin añadir enzima (solo con tampón).

40 [0112] Los resultados que se muestran en la Tabla 6 indican que el tratamiento con haloperoxidasa (etapa HAP) también produce una ganancia de brillo. A pesar de que el sistema NH₄Cl ha eliminado menos HexA en las condiciones estudiadas (Ejemplo 3), elimina cromóforos más visibles que el sistema NaCl, como indica la mayor ganancia de brillo obtenida. Esto se puede explicar por la diferente reactividad de las cloraminas cogeneradas cuando se usa NH₄Cl en comparación con la reactividad del ácido hipocloroso (HOCl).

45 [0113] Se estudió el rendimiento de la etapa HAP en una etapa de extracción post-alcalina reforzada con peróxido de hidrógeno (etapa Ep). Las condiciones de la etapa Ep fueron: H₂O₂ al 0,5 % psh, NaOH al 1,0 % psh, a 85 °C, durante 80 min y con una consistencia del 10 % en bolsas de polietileno selladas en un baño de agua. Se alcanzan valores de brillo más altos en comparación con el control (hasta más 4,7 unidades) cuando se utiliza la etapa HAP. El efecto de la eliminación de HexA cuando se usa el sistema NaCl se observa en el menor número kappa obtenido. Por otro lado, con el uso de NH₄Cl es posible alcanzar un brillo más alto con baja eliminación de HexA.

50 [0114] También se estudió el uso de una etapa de dióxido de cloro (D) seguido de la etapa Ep después de la

haloperoxidasa. Las condiciones de la etapa D fueron ClO₂ 0,8 % psh, pH 3,5, a 80 °C, durante 110 min y con una consistencia del 10 % en bolsas de polietileno selladas en un baño de agua. Si bien hay un menor número kappa cuando se usa la etapa HAP antes del blanqueamiento D-Ep, particularmente cuando se usa el sistema NaCl, el brillo alcanzado es ligeramente inferior al del control. Esto puede indicar que la pulpa tratada con HAP puede necesitar una dosis menor de ClO₂ para el mismo brillo objetivo, y por lo tanto los valores en la Tabla 6 están a un nivel estable.

Tabla 6.

Experimento	Brillo después de HAP (%)	HAP-Ep		HAP-D-Ep	
		Brillo (%)	Número Kappa	Brillo (%)	Número Kappa
Control	63,2	72,1	7,9	88,0	2,8
NaCl	67,3	76,5	6,3	87,8	1,7
NH ₄ Cl	67,9	76,8	7,3	87,6	2,4

10 **EJEMPLO 6**

Efecto de reducir la dosificación de ClO₂ en la etapa D de la secuencia HAP-D-Ep

15 [0115] Las mismas pulpas tratadas con haloperoxidasa del Ejemplo 5 se blanquearon con etapas de blanqueo D-Ep usando las mismas condiciones de operación excepto por diferentes dosificaciones de dióxido de cloro.

20 [0116] Los resultados presentados en la Tabla 7 muestran que hay una disminución en el brillo alcanzado después del blanqueamiento con D-Ep (control sin etapa HAP) mientras se reduce la dosificación de dióxido de cloro. Sin embargo, no se observa lo mismo después del blanqueamiento HAP-D-Ep ya que el brillo final permanece casi al mismo valor. Sin embargo, si la dosificación de dióxido de cloro se ajusta (reduce), la etapa HAP permite ahorrar en dióxido de cloro para un mismo objetivo de brillo. Aunque reduce el límite de brillo que se puede obtener después del blanqueamiento D-Ep, con el tratamiento HAP se necesitará menos carga de dióxido de cloro para un mismo objetivo de brillo. Cuando no se introduce ninguna etapa (ya sea HAP o control), el brillo y el número kappa que se obtienen son casi los mismos que con HAP-D-Ep con una reducción del 50 % de ClO₂.

25 [0117] En cuanto al número kappa, disminuye en ambas secuencias junto con la disminución de la dosificación de dióxido de cloro. Se alcanzan números kappa más bajos cuando se usa una etapa anterior de HAP debido a la reducción previa en el contenido de HexA.

30 Tabla 7.

Experimento	Dosificación ClO ₂ (% psh)	HAP-D-Ep	
		Brillo (%)	Número Kappa
Sin pretratamiento	1,15	88,0	2,8
Control	0,80 (< -30 %)	88,5	2,8
HAP (NaCl)		87,8	1,7
Control	0,57 (< -50%)	86,9	3,7
HAP (NaCl)		87,7	2,7

35 **EJEMPLO 7**

El impacto de la etapa HAP usando una pulpa kraft de aspen parcialmente blanqueada: contenido HexA y brillo ISO

40 [0118] Una pulpa kraft de Aspen previamente blanqueada con dióxido de cloro (D₀) y extracción alcalina (E₁) con un brillo ISO del 76,8 % con una cantidad de HexA de aprox. 26 mmol/kg psh se trató con haloperoxidasa con el mismo procedimiento y condiciones de pH, temperatura, tiempo y consistencia que en el Ejemplo 2. La dosificación de la enzima fue de 60 mg EP/kg psh y se añadieron NaCl o NH₄Cl a una concentración inicial 6 mM, la misma que con H₂O₂. Los experimentos de control se realizaron en paralelo, donde solo se añadieron tampón, sal y peróxido de hidrógeno a la pulpa (sin enzima).

45 [0119] Se observa en la Tabla 8 que la etapa de HAP disminuye el contenido de HexA en un 28 % en comparación con la muestra no tratada cuando se usa NaCl. Cuando se agrega el NH₄Cl en las condiciones estudiadas, la cantidad de HexA no disminuye. Ambas etapas de HAP con NaCl o NH₄Cl mejoran el brillo de la pulpa, siendo ligeramente mayor con la adición de NH₄Cl.

Tabla 8.

Experimento	Contenido de HexA (mmol/kg psh)	Brillo ISO (%)
sin tratamiento	26,3	76,8
Control de NaCl (sin enzima)	24,8	76,1

HAP (NaCl)	18,9	79,5
Control de NH ₄ Cl (sin enzima)	26,8	77,7
HAP (NH ₄ Cl)	26,1	79,8

EJEMPLO 8

El efecto de usar una amina terciaria en la etapa HAP

[0120] De manera similar al Ejemplo 7, se usó la misma pulpa kraft de aspen y se trató bajo las mismas condiciones de operación, excepto por la adición de 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano (DABCO). La dosificación de la enzima fue de 60 mg EP/kg psh y se añadieron NaCl o NH₄Cl a una concentración inicial 6 mM, la misma que con H₂O₂ y DABCO. Los experimentos de control se realizaron en paralelo, donde solo se añadieron tampón, sal, DABCO y peróxido de hidrógeno a la pulpa (sin enzima).

[0121] En la Tabla 9, se observa que la adición de DABCO en la etapa de HAP mejoró el grado de eliminación de HexA usando ambas sales en comparación con el Ejemplo 7, donde no se añadió DABCO. De hecho, usando NH₄Cl se alcanza la eliminación más alta de HexA en aprox. un 54 % del contenido de HexA en la muestra original no tratada. Mientras que sin la adición de DABCO en la etapa de HAP usando la sal de NH₄Cl apenas se elimina HexA, cuando se agrega DABCO hay un aumento significativo en la eliminación de HexA, así como en la ganancia de brillo. La adición de la amina terciaria en la etapa de HAP tuvo un efecto catalítico tanto en la eliminación de HexA como en la eliminación de cromóforos visibles (ganancia de brillo).

Tabla 9.

Experimento	Contenido de HexA (mmol/kg psh)	Brillo ISO (%)
Pulpa no tratada	26,3	76,8
Control NaCl, DABCO (sin enzima)	27,8	77,3
HAP (NaCl, DABCO)	15,3	79,8
Control NH ₄ Cl, DABCO (sin enzima)	27,9	77,4
HAP (NH ₄ Cl, DABCO)	12,1	80,4

EJEMPLO 9

El impacto de la etapa HAP usando una pulpa kraft de madera blanda blanqueada del norte: brillo ISO y viscosidad intrínseca

[0122] Una pulpa de madera blanda completamente blanqueada (mezcla de pino y cicuta) se trató con haloperoxidasa con el mismo procedimiento y las mismas condiciones de pH, temperatura, tiempo y consistencia que en el Ejemplo 2. La dosificación de la enzima fue de 60 mg EP/kg psh y se añadieron NaCl o NH₄Cl a una concentración inicial 6 mM, la misma que con H₂O₂.

[0123] Los resultados del brillo ISO y la viscosidad intrínseca se muestran en la Tabla 9. Se observó una ganancia en el brillo ISO de 1,8-2,0 unidades con todas las sales estudiadas en comparación con los experimentos de control donde no se añadió enzima. Además, la viscosidad intrínseca de la pulpa se mantiene después de la etapa HAP, lo que indica que no hay efecto sobre la degradación de la pulpa.

Tabla 10.

Experimento	Brillo ISO (%)	Viscosidad intrínseca (dm ³ /kg)
Control de NaCl (sin enzima)	84,8	829
HAP (NaCl)	86,6	825
Control MgCl ₂ (sin enzima)	84,8	820
HAP (MgCl ₂)	86,8	827
Control de NH ₄ Cl (sin enzima)	84,6	832
HAP (NH ₄ Cl)	86,4	825

LISTADO DE SECUENCIAS

[0124]

<110> Novozymes A/S

<120> Reducción del contenido de ácidos hexenurónicos en pulpa celulósica

ES 2 650 749 T3

<130> 12524-WO-PCT
 <150> EP13179933.0
 5 <151> 2013-08-09
 <160> 3
 <170> Versión de PatentIn 3.5
 10 <210> 1
 <211> 600
 <212> PRT
 <213> Curvularia verruculosa
 15 <400> 1
 Met Gly Ser Val Thr Pro Ile Pro Leu Pro Thr Ile Asp Glu Pro Glu
 1 5 10 15
 20 Glu Tyr Asn Asn Asn Tyr Ile Leu Phe Trp Asn Asn Val Gly Leu Glu
 20 25 30
 25 Leu Asn Arg Leu Thr His Thr Val Gly Gly Pro Leu Thr Gly Pro Pro
 35 40 45
 30 Leu Ser Ala Arg Ala Leu Gly Met Leu His Leu Ala Ile His Asp Ala
 50 55 60
 35 Tyr Phe Ser Ile Cys Pro Pro Thr Glu Phe Thr Thr Phe Leu Ser Pro
 65 70 75 80
 40 Asp Ala Glu Asn Pro Ala Tyr Arg Leu Pro Ser Pro Asn Gly Ala Asp
 85 90 95
 45 Asp Ala Arg Gln Ala Val Ala Gly Ala Ala Leu Lys Met Leu Ser Ser
 100 105 110
 50 Leu Tyr Met Lys Pro Ala Asp Pro Asn Thr Gly Thr Asn Ile Ser Asp
 115 120 125
 55 Asn Ala Tyr Ala Gln Leu Ala Leu Val Leu Glu Arg Ala Val Val Lys
 130 135 140
 60 Val Pro Gly Gly Val Asp Arg Glu Ser Val Ser Phe Met Phe Gly Glu
 145 150 155 160
 Ala Val Ala Asp Val Phe Phe Ala Leu Leu Asn Asp Pro Arg Gly Ala
 165 170 175

ES 2 650 749 T3

Ser Gln Glu Gly Tyr Gln Pro Thr Pro Gly Arg Tyr Lys Phe Asp Asp
 180 185 190
 5
 Glu Pro Thr His Pro Val Val Leu Val Pro Val Asp Pro Asn Asn Pro
 195 200 205
 10
 Asn Gly Pro Lys Met Pro Phe Arg Gln Tyr His Ala Pro Phe Tyr Gly
 210 215 220
 15
 Met Thr Thr Lys Arg Phe Ala Thr Gln Ser Glu His Ile Leu Ala Asp
 225 230 235 240
 20
 Pro Pro Gly Leu Arg Ser Asn Ala Asp Glu Thr Ala Glu Tyr Asp Asp
 245 250 255
 Ser Ile Arg Val Ala Ile Ala Met Gly Gly Ala Gln Asp Leu Asn Ser
 260 265 270
 25
 Thr Lys Arg Ser Pro Trp Gln Thr Ala Gln Gly Leu Tyr Trp Ala Tyr
 275 280 285
 30
 Asp Gly Ser Asn Leu Val Gly Thr Pro Pro Arg Phe Tyr Asn Gln Ile
 290 295 300
 35
 Val Arg Arg Ile Ala Val Thr Tyr Lys Lys Glu Asp Asp Leu Ala Asn
 305 310 315 320
 Ser Glu Val Asn Asn Ala Asp Phe Ala Arg Leu Phe Ala Leu Val Asn
 325 330 335
 40
 Val Ala Cys Thr Asp Ala Gly Ile Phe Ser Trp Lys Glu Lys Trp Glu
 340 345 350
 45
 Phe Glu Phe Trp Arg Pro Leu Ser Gly Val Arg Asp Asp Gly Arg Pro
 355 360 365
 50
 Asp His Gly Asp Pro Phe Trp Leu Thr Leu Gly Ala Pro Ala Thr Asn
 370 375 380
 55
 Thr Asn Asp Ile Pro Phe Lys Pro Pro Phe Pro Ala Tyr Pro Ser Gly
 385 390 395 400
 60
 His Ala Thr Phe Gly Gly Ala Val Phe Gln Met Val Arg Arg Tyr Tyr
 405 410 415

ES 2 650 749 T3

Asn Gly Arg Val Gly Thr Trp Lys Asp Asp Glu Pro Asp Asn Ile Ala
 420 425 430

5
 Ile Asp Met Met Ile Ser Glu Glu Leu Asn Gly Val Asn Arg Asp Leu
 435 440 445

10
 Arg Gln Pro Tyr Asp Pro Thr Ala Pro Ile Glu Asp Gln Pro Gly Ile
 450 455 460

15
 Val Arg Thr Arg Ile Val Arg His Phe Asp Ser Ala Trp Glu Met Met
 465 470 475 480

20
 Phe Glu Asn Ala Ile Ser Arg Ile Phe Leu Gly Val His Trp Arg Phe
 485 490 495

25
 Asp Ala Ala Ala Ala Arg Asp Ile Leu Ile Pro Thr Asn Thr Lys Asp
 500 505 510

30
 Val Tyr Ala Val Asp Ser Asn Gly Ala Thr Val Phe Gln Asn Val Glu
 515 520 525

35
 Asp Val Arg Tyr Ser Thr Lys Gly Thr Arg Glu Gly Arg Glu Gly Leu
 530 535 540

40
 Phe Pro Ile Gly Gly Val Pro Leu Gly Ile Glu Ile Ala Asp Glu Ile
 545 550 555 560

45
 Phe Asn Asn Gly Leu Arg Pro Thr Pro Pro Glu Leu Gln Pro Met Pro
 565 570 575

50
 Gln Asp Thr Pro Val Gln Lys Pro Val Gln Gly Met Trp Asp Glu Gln
 580 585 590

55
 Val Pro Leu Val Lys Glu Ala Pro
 595 600

60
 <210> 2
 <211> 609
 <212> PRT
 <213> *Curvularia inaequalis*

Met Gly Ser Val Thr Pro Ile Pro Leu Pro Lys Ile Asp Glu Pro Glu
 1 5 10 15

ES 2 650 749 T3

	Glu	Tyr	Asn	Thr	Asn	Tyr	Ile	Leu	Phe	Trp	Asn	His	Val	Gly	Leu	Glu
				20					25					30		
5	Leu	Asn	Arg	Val	Thr	His	Thr	Val	Gly	Gly	Pro	Leu	Thr	Gly	Pro	Pro
			35					40					45			
10	Leu	Ser	Ala	Arg	Ala	Leu	Gly	Met	Leu	His	Leu	Ala	Ile	His	Asp	Ala
		50					55					60				
15	Tyr	Phe	Ser	Ile	Cys	Pro	Pro	Thr	Asp	Phe	Thr	Thr	Phe	Leu	Ser	Pro
	65					70					75					80
20	Asp	Thr	Glu	Asn	Ala	Ala	Tyr	Arg	Leu	Pro	Ser	Pro	Asn	Gly	Ala	Asn
					85					90					95	
25	Asp	Ala	Arg	Gln	Ala	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Lys	Met	Leu	Ser	Ser
				100				105						110		
30	Leu	Tyr	Met	Lys	Pro	Val	Glu	Gln	Pro	Asn	Pro	Asn	Pro	Gly	Ala	Asn
			115				120						125			
35	Ile	Ser	Asp	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Asp	Arg	Ser
		130					135					140				
40	Val	Leu	Glu	Ala	Pro	Gly	Gly	Val	Asp	Arg	Glu	Ser	Ala	Ser	Phe	Met
	145					150					155					160
45	Phe	Gly	Glu	Asp	Val	Ala	Asp	Val	Phe	Phe	Ala	Leu	Leu	Asn	Asp	Pro
					165					170					175	
50	Arg	Gly	Ala	Ser	Gln	Glu	Gly	Tyr	His	Pro	Thr	Pro	Gly	Arg	Tyr	Lys
				180					185					190		
55	Phe	Asp	Asp	Glu	Pro	Thr	His	Pro	Val	Val	Leu	Ile	Pro	Val	Asp	Pro
			195					200					205			
60	Asn	Asn	Pro	Asn	Gly	Pro	Lys	Met	Pro	Phe	Arg	Gln	Tyr	His	Ala	Pro
			210				215					220				
65	Phe	Tyr	Gly	Lys	Thr	Thr	Lys	Arg	Phe	Ala	Thr	Gln	Ser	Glu	His	Phe
	225					230					235					240
70	Leu	Ala	Asp	Pro	Pro	Gly	Leu	Arg	Ser	Asn	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Glu
					245					250					255	

ES 2 650 749 T3

Tyr Asp Asp Ala Val Arg Val Ala Ile Ala Met Gly Gly Ala Gln Ala
 260 265 270
 5 Leu Asn Ser Thr Lys Arg Ser Pro Trp Gln Thr Ala Gln Gly Leu Tyr
 275 280 285
 10 Trp Ala Tyr Asp Gly Ser Asn Leu Ile Gly Thr Pro Pro Arg Phe Tyr
 290 295 300
 15 Asn Gln Ile Val Arg Arg Ile Ala Val Thr Tyr Lys Lys Glu Glu Asp
 305 310 315 320
 20 Leu Ala Asn Ser Glu Val Asn Asn Ala Asp Phe Ala Arg Leu Phe Ala
 325 330 335
 25 Lys Trp Glu Phe Glu Phe Trp Arg Pro Leu Ser Gly Val Arg Asp Asp
 355 360 365
 30 Gly Arg Pro Asp His Gly Asp Pro Phe Trp Leu Thr Leu Gly Ala Pro
 370 375 380
 35 Ala Thr Asn Thr Asn Asp Ile Pro Phe Lys Pro Pro Phe Pro Ala Tyr
 385 390 395 400
 40 Pro Ser Gly His Ala Thr Phe Gly Gly Ala Val Phe Gln Met Val Arg
 405 410 415
 45 Arg Tyr Tyr Asn Gly Arg Val Gly Thr Trp Lys Asp Asp Glu Pro Asp
 420 425 430
 50 Asn Ile Ala Ile Asp Met Met Ile Ser Glu Glu Leu Asn Gly Val Asn
 435 440 445
 55 Arg Asp Leu Arg Gln Pro Tyr Asp Pro Thr Ala Pro Ile Glu Asp Gln
 450 455 460
 60 Pro Gly Ile Val Arg Thr Arg Ile Val Arg His Phe Asp Ser Ala Trp
 465 470 475 480
 Glu Leu Met Phe Glu Asn Ala Ile Ser Arg Ile Phe Leu Gly Val His
 485 490 495

ES 2 650 749 T3

Trp Arg Phe Asp Ala Ala Ala Ala Arg Asp Ile Leu Ile Pro Thr Thr
500 505 510

5 Thr Lys Asp Val Tyr Ala Val Asp Asn Asn Gly Ala Thr Val Phe Gln
515 520 525

10 Asn Val Glu Asp Ile Arg Tyr Thr Thr Arg Gly Thr Arg Glu Asp Pro
530 535 540

15 Glu Gly Leu Phe Pro Ile Gly Gly Val Pro Leu Gly Ile Glu Ile Ala
545 550 555 560

20 Asp Glu Ile Phe Asn Asn Gly Leu Lys Pro Thr Pro Pro Glu Ile Gln
565 570 575

25 Pro Met Pro Gln Glu Thr Pro Val Gln Lys Pro Val Gly Gln Gln Pro
580 585 590

30 Val Lys Gly Met Trp Glu Glu Glu Gln Ala Pro Val Val Lys Glu Ala
595 600 605

30 Pro

35 <210> 3
<211> 221
<212> PRT
<213> Bacillus agaradhaerens

40 <400> 3

40 Gln Ile Val Thr Asp Asn Ser Ile Gly Asn His Asp Gly Tyr Asp Tyr
1 5 10 15

45 Glu Phe Trp Lys Asp Ser Gly Gly Ser Gly Thr Met Ile Leu Asn His
20 25 30

50 Gly Gly Thr Phe Ser Ala Gln Trp Asn Asn Val Asn Asn Ile Leu Phe
35 40 45

55 Arg Lys Gly Lys Lys Phe Asn Glu Thr Gln Thr His Gln Gln Val Gly
50 55 60

60 Asn Met Ser Ile Asn Tyr Gly Ala Asn Phe Gln Pro Asn Gly Asn Ala
65 70 75 80

60 Tyr Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr Val Asp Pro Leu Val Glu Tyr Tyr

ES 2 650 749 T3

					85					90						95
5	Ile	Val	Asp	Ser	Trp	Gly	Asn	Trp	Arg	Pro	Pro	Gly	Ala	Thr	Pro	Lys
				100					105					110		
10	Gly	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Gly	Gly	Thr	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Glu	Thr	Leu
			115					120					125			
15	Arg	Val	Asn	Gln	Pro	Ser	Ile	Lys	Gly	Ile	Ala	Thr	Phe	Lys	Gln	Tyr
		130					135					140				
20	Trp	Ser	Val	Arg	Arg	Ser	Lys	Arg	Thr	Ser	Gly	Thr	Ile	Ser	Val	Ser
	145					150					155					160
25	Asn	His	Phe	Arg	Ala	Trp	Glu	Asn	Leu	Gly	Met	Asn	Met	Gly	Lys	Met
					165					170					175	
30	Tyr	Glu	Val	Ala	Leu	Thr	Val	Glu	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala
				180					185					190		
35	Asn	Val	Tyr	Ser	Asn	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Gly	Asn	Pro	Leu	Ser	Thr
			195					200					205			
40	Ile	Ser	Asn	Asp	Lys	Ser	Ile	Thr	Leu	Asp	Lys	Asn	Asn			
	210						215					220				

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para reducir el contenido de ácidos hexenurónicos en una pulpa celulósica química y/o para mejorar el brillo de una pulpa celulósica química, que comprende poner en contacto la pulpa celulósica con una haloperoxidasa, peróxido de hidrógeno e iones seleccionados del grupo que se compone de cloruro, bromuro, yoduro y tiocianato, y opcionalmente con una o más aminas terciarias.
- 10 2. Método de la reivindicación 1, en el que la haloperoxidasa es una cloroperoxidasa de la clase de enzima EC 1.11.1.10.
3. Método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la haloperoxidasa es una vanadio haloperoxidasa.
- 15 4. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa tiene al menos un 80 % de identidad, preferiblemente al menos un 85 % de identidad, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, incluso más preferiblemente al menos un 95 % de identidad y lo más preferible al menos un 97 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de una haloperoxidasa de *Curvularia verruculosa* (SEQ ID NO: 1) o una haloperoxidasa de *Curvularia inequalis* (SEQ ID NO: 2).
- 20 5. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la pulpa celulósica química también se pone en contacto con una xilanasa; preferiblemente una endo-1,4-beta-xilanasa de la clase enzimática EC 3.2.1.8.
- 25 6. Método de la reivindicación 5, donde la secuencia de aminoácidos de la xilanasa tiene al menos un 60 % de identidad, preferiblemente al menos un 65 % de identidad, más preferiblemente al menos un 70 % de identidad, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad y lo más preferible un 97 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de una xilanasa de *Bacillus agaradhaerens* (SEQ ID NO: 3).
- 30 7. Método de las reivindicaciones 5 o 6, en donde la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa se muestra como SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la xilanasa se muestra como SEQ ID NO: 3.
- 35 8. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la pulpa celulósica química es una pulpa hecha por cocción alcalina tal como una pulpa kraft, o una pulpa de sulfito o cualquier otra pulpa que necesita blanqueo.
9. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que incluye una etapa de extracción alcalina posterior.
- 40 10. Método de la reivindicación 9, en el que la etapa de extracción alcalina se refuerza con peróxido de hidrógeno y/u oxígeno con o sin un agente de blanqueo previo como, por ejemplo, dióxido de cloro.
- 45 11. Composición acuosa que comprende una haloperoxidasa; iones cloruro, bromuro, yoduro o tiocianato; y una pulpa celulósica química que comprende ácidos hexenurónicos y opcionalmente una o más aminas terciarias.
12. Composición de la reivindicación 11, en donde la pulpa celulósica química es una pulpa hecha por cocción alcalina tal como una pulpa kraft.
13. Composición de las reivindicaciones 11 o 12, que también incluye una xilanasa.
- 50 14. Uso de una haloperoxidasa para reducir el contenido de ácidos hexenurónicos en una pulpa celulósica química y/o para mejorar el brillo de una pulpa celulósica química.
- 55 15. Uso según la reivindicación 14, que incluye el uso de una xilanasa.