

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA VEGETAL**



**TRATAMIENTO DE PULPAS KRAFT DE EUCALIPTO CON ENDOCELULASAS
COMERCIALES EN LA FORMA DE MONOCOMPONENTE Y DE COMPLEJO
MULTIENZIMÁTICO (CELLIC CTEC3)**

**MEMORIA DE TÍTULO PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.**

KATHERINE VALESKA INOSTROZA LOYOLA

LOS ÁNGELES-CHILE

2023

**TRATAMIENTO DE PULPAS KRAFT DE EUCALIPTO CON ENDOCELULASAS
COMERCIALES EN LA FORMA DE MONOCOMPONENTE Y DE COMPLEJO
MULTIENZIMÁTICO (CELLIC CTEC3)**

Alumna

***Katherine Inostroza Loyola
Ingeniera en Biotecnología Vegetal***

Profesora Guía

***Dra. Ángela Machuca Herrera
Profesora Asociada
Bioquímico***

Jefe de Carrera

***Ing. Pedro Quiroz Hernández
Profesor Instructor
Ingeniero de Ejecución Forestal***

Directora de Departamento

***Dra. Marely Cuba Díaz
Profesora Titular
Bióloga***





En memoria de Rolando Inostroza Loyola

Agradecimientos

Hay tantas personas a las cuales agradecer por su apoyo, amor, comprensión y ayuda.

Primero a mis padres y hermana por siempre apoyarme, motivarme, cuidarme y por ser la luz al final de este túnel de sufrimiento.

A mi cuñada Valentina por su apoyo y motivación.

A mis sobrinos Victoria, Salvador y Elena por ser mi motivación de vida.

A la familia que ya no se encuentra conmigo.

A la profesora Ángela Machuca por el infinito apoyo, paciencia, comprensión y cariño.

A mi alma gemela Polette por existir.

A mis amigos Diego, Colomba, Yoselin, Ayleen, Camila, Natasha, Gladys, Fernanda, Jonathan, Gabriela y Bárbara.

A mis compañeros de carrera.

A Camila y Christian por toda su ayuda y apoyo en el laboratorio y en la vida.

A la profesora Yudith Guillen, por su apoyo, tiempo y dedicación.

A Claudia y su madre Ximena por acogerme en su hogar y tratarme como una más de ellos, siempre les estaré agradecida.

Al laboratorio de Recursos Renovables, al profesor Regis e Isabel y a Isidora y Sebastián.

A los profesores que marcaron esta etapa haciéndola más grata y entretenida, al profesor Bolívar Alarcón por el cual reprobaría nuevamente física solo para estar en su clase, a la profesora Daniela Muñoz por ser un amor, a la profesora Carol Peña por siempre escuchar nuestras tonteras, tenernos paciencia y no llevarnos al comité disciplinario por enviarle un piolín, al profesor Eduardo Navarrete por su simpatía y apoyo, al profesor Pablo Novoa por hacer los terrenos más entretenidos y llevarnos a la nieve y a la profesora Paula Urzúa por su comprensión y por acompañarnos a celebrar nuestros cumpleaños.

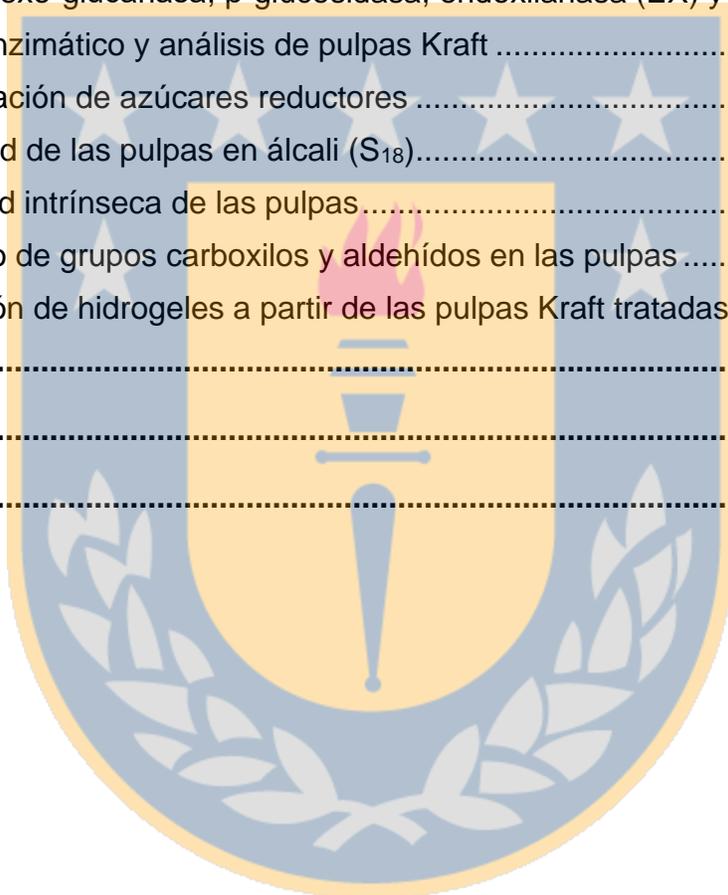
Y por último agradecer el financiamiento del proyecto FONDECYT N° 1200504, el cual hizo posible esta investigación.

Tesis Financiada a través del proyecto Fondecyt N° 1200504

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Marco teórico	4
Enzimas involucradas en la descomposición de la pared celular vegetal	4
Celulasas y hemicelulasas	5
Monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs)	7
Cocteles enzimáticos comerciales	7
Tratamiento de materiales lignocelulósicos.....	8
3. Hipótesis	11
4. Objetivos	11
4.1. Objetivo general	11
4.2. Objetivos específicos	11
5. Materiales y Métodos	12
5.1 Sustrato celulósico	12
5.2. Enzimas comerciales	12
5.3. Caracterización de los preparados comerciales.....	12
5.3.1 Determinación de actividad endoglucanasa (EG).....	12
5.3.2 Determinación de exo-glucanasas.....	13
5.3.3 Determinación de β -glucosidasa.....	13
5.3.4 Determinación de actividad endoxilanasas (EX)	14
5.3.5 Determinación de actividad LPMO	14
5.3.6 Determinación de la concentración de proteínas.....	14
5.4 Tratamientos enzimáticos de las pulpas Kraft de eucalipto.....	15
5.5 Análisis de las pulpas Kraft de eucalipto post-tratamientos enzimáticos.....	16
5.5.1. Determinación de azúcares reductores	16
5.5.2. Solubilidad de las pulpas en álcali (S_{18}).....	16
5.5.3. Viscosidad intrínseca.....	17
5.5.4. Contenido de grupos carboxilos	18

5.5.5. Contenido de grupos aldehídos.....	19
5.5.6. Preparación de hidrogeles a partir de las pulpas Kraft tratadas	19
5.5.7. Determinación de la capacidad de adsorción de los hidrogeles	19
5.6. Análisis estadísticos	20
6. Resultados	21
6.1 Caracterización enzimática de los preparados comerciales.....	21
6.1.1 Actividad endoglucanasa (EG)	21
6.1.2. Actividad exo-glucanasa, β -glucosidasa, endoxilanasas (EX) y LPMO.....	23
6.2 Tratamiento enzimático y análisis de pulpas Kraft	24
6.2.1. Determinación de azúcares reductores	24
6.2.2. Solubilidad de las pulpas en álcali (S_{18}).....	26
6.2.3. Viscosidad intrínseca de las pulpas.....	28
6.2.4. Contenido de grupos carboxilos y aldehídos en las pulpas	30
6.2.5 Preparación de hidrogeles a partir de las pulpas Kraft tratadas enzimáticamente .	32
7. Discusión	35
8. Conclusiones	42
Bibliografía	43



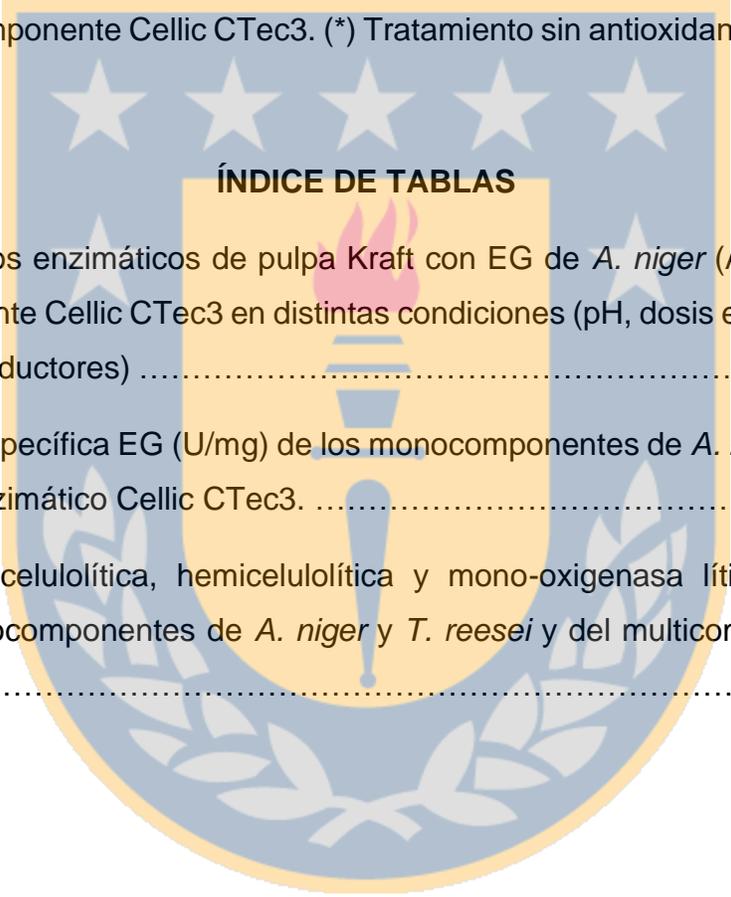
ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Actividad EG de las enzimas monocomponentes de *T. reesei* (A) y *A. niger* (B) y del multicomponente enzimático Cellic CTec3 (C) a los 30 y 120 min de reacción a distintos valores de pH y 50 °C de incubación.....22
- Figura 2.** Azúcares reductores (g/L) liberados después del tratamiento enzimático de las pulpas Kraft a 3 % de consistencia, con los monocomponentes de *T. reesei* (Tr) y *A. niger* (An) y el multicomponente Cellic CTec3, a pH 6, durante 2 h a 50 °C y 70 rpm.....25
- Figura 3.** Azúcares reductores (g/L) liberados después del tratamiento enzimático de las pulpas Kraft a 3% de consistencia, con el complejo multicomponente Cellic CTec3, a diferentes valores de pH, durante 2 h a 50 °C y 70 rpm.....26
- Figura 4.** Contenido de oligosacáridos (%) liberados después del tratamiento enzimático de las pulpas Kraft a 3% de consistencia, con los monocomponentes de *T. reesei* (Tr) y de *A. niger* (An) y el multicomponente Cellic CTec3, a pH 6 (2 h/50 °C/70 rpm)27
- Figura 5.** Contenido de oligosacáridos (%) liberados después del tratamiento enzimático de las pulpas Kraft a 3% de consistencia, con el complejo multicomponente Cellic CTec3, a diferentes valores de pH (2 h/50 °C/70 rpm)28
- Figura 6.** Viscosidad intrínseca (mL/g) después del tratamiento enzimático de las pulpas Kraft a 3% de consistencia, con los monocomponentes de *T. reesei* (Tr) y de *A. niger* (An) y el multicomponente Cellic CTec3, a pH 6 (2 h/50 °C/70 rpm)29
- Figura 7.** Viscosidad intrínseca (mL/g) después del tratamiento enzimático de las pulpas Kraft a 3% de consistencia, con el complejo multicomponente Cellic CTec3, a diferentes valores de pH (2 h/50 °C/70 rpm)30
- Figura 8.** Contenido de grupos carboxilos (mmol/g) después del tratamiento enzimático de las pulpas Kraft a 3% de consistencia, con el monocomponente de *T. reesei* (Tr) y el multicomponente Cellic CTec3, a diferentes valores de pH (2 h/50 °C/70 rpm), en presencia y ausencia de H₂O₂ y agentes reductores (AA y AG)31
- Figura 9.** Contenido de grupos aldehídos (mmol/g) después del tratamiento de las pulpas Kraft a 3% de consistencia, con el monocomponente de *T. reesei* (Tr) y el multicomponente Cellic

CTec3, a diferentes valores de pH (2 h/50 °C/70 rpm), en presencia y ausencia de H₂O₂ y agentes reductores (AA y AG)32

Figura 10. Hidrogeles de pulpa Kraft tratada enzimáticamente, donde (A) corresponde a la pulpa Kraft tratada, (B) disolución de las fibras de celulosa en NMMO y (C) aspecto del hidrogel obtenido después del tratamiento.33

Figura 11. Capacidad de adsorción de azul de metileno de los hidrogeles de celulosa obtenidos a partir de pulpa Kraft tratada enzimáticamente, con el monocomponente de *T. reesei* (Tr) y multicomponente Cellic CTec3. (*) Tratamiento sin antioxidante.....34



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos enzimáticos de pulpa Kraft con EG de *A. niger* (An) y *T. reesei* (Tr) y con el multicomponente Cellic CTec3 en distintas condiciones (pH, dosis enzimática, presencia de H₂O₂ y agentes reductores)15

Tabla 2. Actividad específica EG (U/mg) de los monocomponentes de *A. niger* y *T. reesei* y del multicomponente enzimático Cellic CTec3.23

Tabla 3. Actividad celulolítica, hemicelulolítica y mono-oxigenasa lítica de polisacáridos (LPMO) de los monocomponentes de *A. niger* y *T. reesei* y del multicomponente enzimático Cellic CTec3.....24

Abreviaciones

GH: Glicohidrolasas

EG: Endoglucanasa

LPMOs: Enzimas monooxigenasas líticas de polisacáridos

EX: Endoxilanasas

CD: Dominio catalítico

CBD: Dominio de unión a celulosa

DMP: 2,6-dimetoxifenol

An: *Aspergillus niger*

Tr: *Trichoderma reesei*

CMC: Carboximetilcelulosa

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

pNPG: p-nitrofenil glucopiranosido

O₂: Oxígeno

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

AA: Ácido ascórbico

AG: Ácido gálico

U: Unidad

UEG: Unidad endoglucanasa.



Resumen

Las pulpas de celulosa del proceso Kraft pueden ser utilizadas para la obtención de productos diferentes a papeles y cartones, pero para ello deben ser sometidas a tratamientos que provoquen cambios en su reactividad, los que generalmente son químicos. En busca de alternativas más amigables con el medio ambiente, surge la posibilidad de aplicar tratamientos enzimáticos. En este trabajo se evaluó el efecto de preparados enzimáticos comerciales con actividad de endoglucanasa, en la forma de monocomponente de origen fúngico (*Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*) y de un multicomponente enzimático (Cellic CTec3), en el tratamiento de pulpas Kraft de eucalipto y en la posterior obtención de hidrogeles. Inicialmente, se realizó una caracterización de las actividades enzimáticas presentes en los preparados, encontrándose como actividad principal endoglucanasa (EG), y como actividades acompañantes exo-glucanasa, β -glucosidasa y endoxilanasas, las cuales eran esperables en el cóctel Cellic CTec3, pero no en los preparados monocomponente. En el cóctel Cellic CTec3 también fue posible detectar actividad de la enzima auxiliar monooxigenasa lítica de polisacáridos (LPMO por sus siglas en inglés). La actividad catalítica de estas enzimas fue afectada por el pH y el tiempo de reacción, observándose las mayores actividades de EG a pH entre 4 y 6, y de LPMO a pH 7,5, a los 30 min de reacción. Los tratamientos enzimáticos de las pulpas Kraft se realizaron modificando la dosis enzimática (10 y 100 UEG) y el pH (para el multicomponente). Diferencias significativas ($P \leq 0,05$) fueron observadas en la liberación de azúcares reductores a partir de las pulpas con los preparados enzimáticos (100 U) que siguieron la tendencia Cellic CTec 3 > *A. niger* > *T. reesei*. Los tratamientos enzimáticos con el multicomponente Cellic CTec3 (10 y 100 U) y el monocomponente de *T. reesei* (100 U) fueron métodos eficaces para disminuir la viscosidad intrínseca y aumentar el contenido de oligosacáridos de las pulpas, principalmente a pH 4 y 6, y en presencia de H₂O₂ y agentes reductores en el caso del cóctel Cellic CTec3. Los hidrogeles de celulosa se obtuvieron de forma exitosa a partir de las pulpas tratadas enzimáticamente, y todos los hidrogeles presentaron similar capacidad de adsorción de azul de metileno (MB). Los tratamientos enzimáticos fueron capaces de generar modificaciones en las propiedades de las pulpas Kraft de eucalipto siguiendo la tendencia multicomponente Cellic CTec3 > monocomponente de *T. reesei* > monocomponente de *A. niger*.

Abstract

The cellulose pulps Kraft can be used to obtain different paper and cardboard products, but for this they must be submitted to treatments generally chemical, which causes changes in their reactivity. In search of more environmentally friendly alternatives, the possibility of applying enzymatic treatments emerges. In this work, the effect of commercial enzyme preparations with endoglucanase activity was evaluated, in the form of a monocomponent of fungal origin (*Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*) and of a cocktail enzymatic multicomponent (Cellic CTec3), in the treatment of eucalyptus Kraft pulps and in the subsequent obtaining of hydrogels. Initially, the enzymatic activities present in the preparations were characterized, with endoglucanase (EG) being the main activity, and exoglucanase, β -glucosidase and endoxylanase being accompanying activities, which were expected in the Cellic CTec3 cocktail, but not in the monocomponent preparations. Activity from the auxiliary enzyme lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) was also detected in the Cellic CTec3 cocktail. The catalytic activity of these enzymes was affected by the pH and the reaction time, being the highest activities of EG obtaining at pH between 4 and 6, and of LPMO at pH 7.5, after 30 min of reaction. The enzymatic treatments of the Kraft pulps were carried out modifying the enzymatic dose (10 and 100 UEG) and the pH (for the multicomponent). Significant differences ($P \leq 0.05$) were observed in the release of reducing sugars from the pulps with the enzymatic preparations (100 U) which followed the trend Cellic CTec 3 > *A. niger* > *T. reesei* tendency. The enzymatic treatments with the multicomponent Cellic CTec3 (10 and 100 U) and the monocomponent of *T. reesei* (100 U) were effective methods to decrease the intrinsic viscosity and increase the oligosaccharide content of the pulps, mainly at pH 4 and 6, and in the presence of H₂O₂ and reducing agents in the case of Cellic CTec3. Cellulose hydrogels were successfully obtained from the enzymatically treated pulps, and all hydrogels showed similar capacity of methylene blue (MB) adsorption. The enzymatic treatments were able to generate modifications in the properties of the Kraft eucalyptus pulps following the trend multicomponent Cellic CTec3 > monocomponent of *T. reesei* > monocomponent of *A. niger*

1. Introducción

La biomasa lignocelulósica es posiblemente la materia prima renovable más abundante para la producción de energía, celulosa y papel, derivados de la celulosa, combustibles y materiales textiles. La biomasa vegetal contiene principalmente los polisacáridos celulosa y hemicelulosas, junto con una cantidad sustancial de lignina que juntos conforman la matriz lignocelulósica (Singhvi y Gokhale., 2019). La conversión de la biomasa vegetal en pulpa celulósica con fines diversos se logra tradicionalmente a través de métodos físicos y/o químicos, pero en la actualidad se investigan rutas alternativas bioquímicas/enzimáticas, ya que son ambientalmente beneficiosas, reducen el uso de energía y materias primas y los costos de operación (Kubicek., 2013; Fei et al., 2019).

Las enzimas que participan en la desconstrucción de la biomasa lignocelulósica son principalmente producidas por hongos y bacterias, y entre ellas se encuentran las enzimas hidrolíticas (celulasas y hemicelulasas), y oxidativas (lignina-peroxidasa, manganoso-peroxidasa y lacasa) las cuales son responsables de la ruptura de enlaces glucosídicos y de la oxidación de la lignina, respectivamente (Wan y Li., 2012).

Recientemente, se ha descrito que además de la acción de estas enzimas, la compleja estructura de las paredes celulares requiere la ayuda de otras enzimas con actividad auxiliadora como son las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO, por sus siglas en inglés), las que actúan sobre los polisacáridos por un mecanismo oxidativo y degradan parcialmente las regiones cristalinas, facilitando la posterior descomposición de la celulosa por las celulasas (Singhania et al., 2021).

Las enzimas hidrolíticas y LPMOs han sido utilizadas en combinación para el tratamiento de la biomasa lignocelulósica, donde las LPMOs actúan en sinergia con las hidrolasas de polisacáridos y, por lo tanto, aceleran la descomposición o transformación de los sustratos (Barbosa et al., 2020). La acción combinada de las LPMOs, celulasas y hemicelulasas ha sido bien investigada y utilizada comercialmente para aumentar los rendimientos de glucosa en la hidrólisis de lignocelulosa para producción de biocombustibles (Johansen., 2016; Adsul et al., 2020). Sin embargo, este efecto combinado entre las enzimas ha sido poco explorado en el tratamiento de la biomasa lignocelulósica con otros fines. Cabe destacar que el éxito de los tratamientos utilizando cócteles de enzimas celulolíticas y LPMOs

dependerá del mecanismo de acción particular de cada una de las enzimas participantes, del sustrato o tipo de material sometido a tratamiento (Tokin et al., 2020), y posiblemente de otros factores que aún no se conocen completamente.

2. Marco teórico

Enzimas involucradas en la descomposición de la pared celular vegetal

Las enzimas que participan en la descomposición de la biomasa lignocelulósica son producidas por microorganismos, principalmente hongos, y entre ellas se encuentran las enzimas hidrolíticas y oxidativas, las que están encargadas de la ruptura de enlaces glucosídicos y de la oxidación de la lignina y otros compuestos similares a ésta, respectivamente (Wan y Li., 2012).

Entre las enzimas hidrolíticas se encuentran las celulasas y hemicelulasas, las primeras catalizan la hidrólisis de enlaces β -1,4- glucosídicos en la celulosa y las segundas la hidrólisis de diferentes tipos de enlaces glucosídicos dependiendo de la naturaleza de la hemicelulosa atacada. Las hemicelulasas más abundantes son las xilanasas las cuales catalizan la hidrólisis de enlaces internos β -1,4 entre moléculas de xilosa del polímero de xilano (Sindhu et al., 2016). Las enzimas oxidativas como la lignina-peroxidasa (EC 1.11.1.7), manganeso-peroxidasa (EC 1.11.1.7) y lacasa (EC 1.10.3.2) son los componentes principales del sistema enzimático ligninolítico. La lignina-peroxidasa degrada las unidades de lignina no fenólica y, la manganeso-peroxidasa actúa sobre unidades de lignina fenólicas y no fenólicas utilizando peróxido de hidrogeno como oxidante, en tanto las lacasas actúan sobre unidades de lignina fenólicas utilizando oxígeno molecular (Binod et al., 2011).

Además del papel que se ha demostrado que desempeñan estas enzimas, trabajos recientes han demostrado la importante participación de enzimas/proteínas accesorias con actividad auxiliar. Entre tales enzimas destacan las recientemente descubiertas monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs), las cuales pueden aumentar el rendimiento hidrolítico de los cócteles de celulasas, principalmente al mejorar la accesibilidad de las enzimas al componente celulósico (Hu et al., 2013). Aunque estas enzimas auxiliares no hidrolizan directamente la celulosa, se ha demostrado que tienen una

alta especificidad en la modificación selectiva de la red de carbohidratos a través de reacciones de oxidación de una manera relativamente rápida (Hu et al., 2014).

Celulasas y hemicelulasas

Las celulasas son enzimas con arquitectura simple, con un dominio catalítico (CD) y un dominio de unión a celulosa (CBD), conectados ambos por medio de un péptido enlazador (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol., 2013). El CBD se ancla al sustrato de celulosa permitiendo que el CD realice su función catalítica y aunque el CBD no participa en la hidrólisis, su eliminación reduce significativamente la actividad enzimática hacia el sustrato (Juturu y Wu., 2014).

Las celulasas son un complejo enzimático constituido por tres enzimas principales, todas ellas pertenecientes a la familia de las glicohidrolasas (GH): endoglucanasas (familia GH9), también conocidas como 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasa o carboximetilcelulasa (EC 3.2.1.4); exoglucanasas (familia GH7), del tipo celodextrinasa o 1,4- β -D-glucano glucanohidrolasa (EC 3.2.1.176) y celobiohidrolasa o 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), y β -glucosidasas (familia GH1), también conocidas como celobiasas (EC 3.2.1.21) (Zhou et al., 2010; Hasunuma et al., 2013). El mecanismo de catálisis de estas enzimas es ácido-base (Gutiérrez-Rojas et al., 2015).

La clasificación de las celulasas se basa en la forma de despolimerización del sustrato que atacan y entre ellas actúan sinérgicamente. Las endoglucanasas hidrolizan al azar enlaces β -1,4-glicosídicos en las regiones amorfas de la celulosa, tienen sitios activos abiertos en forma de hendidura que producen incisiones en el polímero de celulosa, exponiendo los extremos reductores y no reductores, produciendo oligómeros con varios grados de polimerización. Las exoglucanasas en cambio tienen sus sitios activos dentro de una especie de "túnel" e hidrolizan los enlaces β -1,4-glicosídicos de los oligómeros en los extremos reductores (EC 3.2.1.176) y no reductores (EC 3.2.1.91), liberando celooligosacáridos y unidades de celobiosa. Los productos de las celobiohidrolasas y endoglucanasas son inhibidores de las actividades de sus enzimas, por lo que finalmente se requiere la acción de la β -glucosidasa que actúa sobre la celobiosa para liberar glucosa (Binod et al., 2011; Juturu y Wu., 2014; Bhattacharya et al., 2015).

Todo el proceso de bioconversión de celulosa a glucosa se produce en dos pasos, las exoglucanasas y endoglucanasas son las responsables del primer paso, que conduce a la reducción del grado de polimerización de la celulosa en la etapa de licuefacción, liberando celobiosa; el segundo paso lo catalizan las β -glucosidasas que escinden la celobiosa en glucosa (Maeda et al., 2013). Previamente, se ha documentado la sinergia entre enzimas celulolíticas ya sea de tipo exo-exo, endo-endo procesivo, endo-exo, y sinergia intramolecular entre los dominios CD y CBD, pero este sinergismo no se presenta en todo el complejo celulolítico (Thoresen et al., 2021).

Las enzimas xilanolíticas pertenecientes también a la familia GH tienen una masa molar aproximada de 30 kDa, son producidas por una variedad de microorganismos, incluidas bacterias, hongos y levaduras (Kumar et al., 2016). Estas enzimas son clave para la degradación de xilanos, actuando sobre el esqueleto de xilano y escindiendo al azar en sitios internos los enlaces β -1,4-glucosídicos entre residuos de xilopiranosido. Dado que las xilanasas escinden aleatoriamente el sustrato, sus productos de acción son diversos y pueden incluir xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa, y, xilo-oligómeros (Malgas et al., 2019).

El complejo xilanolítico consta de varias subclases de enzimas entre las que destacan: endo-1,4- β -xilanasas (EC 3.2.1.8), endo-1,3- β -xilanasas (EC 3.2.1.8), β -xilosidasas (EC 3.2.1.37), α -arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), α -glucuronidasas (EC 3.2.1.139) y acetilxilanasas (EC 3.1.1.72) (Kaushal et al., 2021). Todas con diferentes mecanismos de acción (Collins et al., 2005; Cuevas., 2021).

Las xilanasas se clasifican dentro de las familias GH 5, 7, 8, 10, 11 y 43, aunque las familias GH10 y GH11 albergan la mayoría de estas enzimas, que difieren en su especificidad por el sustrato y mecanismo de acción (**retención o inversión**) (Motta et al., 2013). Las xilanasas GH11 hidrolizan las regiones no sustituidas de arabinoxilano, mientras que las xilanasas GH10 escinden los enlaces de xilosa más cerca de los residuos de arabinosa de la cadena lateral. Entre las otras familias, las xilanasas GH8 actúan únicamente sobre el xilano mientras que las xilanasas GH5, GH7 y GH43 actúan como endoglucanasas, liqueninasas o arabinofuranosidasas (Kumar et al., 2016).

Monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs)

Las LPMOs son enzimas monocúpricas ampliamente distribuidas en la naturaleza, presentes en bacterias, hongos, plantas, animales y virus (Forsberg et al., 2020), que descomponen oxidativamente los polisacáridos y tienen un sitio de unión sin restricciones que permite que los sustratos voluminosos e insolubles, como los polisacáridos cristalinos, se unan al sitio activo (Laurent et al., 2019).

Existen 7 familias de LPMOs descritas actualmente (AA9-11 y AA13-16) las cuales se clasifican como actividades auxiliares (AA) en la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org>), según las similitudes de secuencia. La gran mayoría de las LPMOs estudiadas en detalle pertenecen a las familias AA9 y AA10 (Forsberg et al., 2020). El mecanismo catalítico exacto de las LPMOs es objeto de debate científico, pero se acepta que comienza con el ión Cu^{+2} reduciendo al oxígeno molecular (O_2), en presencia de un donante de electrones externo. Luego el dioxígeno reducido extrae un solo hidrógeno del sustrato, lo que conduce a la escisión oxidativa de los enlaces β -1,4- glicosídicos de los polisacáridos. El ácido ascórbico, el glutatión reducido, el ácido ferúlico, la cisteína, la lignina y el galato son una fuente externa de electrones o agentes reductores de bajo peso molecular de la enzima (Kracher et al., 2020). En general se requiere O_2 o H_2O_2 , así como un agente reductor que pueda entregar dos electrones por cada ciclo catalítico. (Singhania et al., 2021). Bissaro et al. (2017) demostraron que el H_2O_2 es el co-sustrato preferido de las LPMOs en lugar del O_2 . Las LPMOs oxidan el C de la glucosa en las cadenas de celulosa en la posición C1 o C4, lo que da como resultado la formación de monómeros reducidos y oxidados al final de la catálisis (Singhania et al., 2021). En un enfoque alternativo, se han desarrollado ensayos para cuantificar la actividad intrínseca tipo peroxidasa de las LPMOs, utilizando 2,6-dimetoxifenol (DMP) o su forma oxidada (hidrocoerulignona), como sustratos (Brander et al., 2021).

Cocteles enzimáticos comerciales

Los cócteles enzimáticos son una buena opción para hidrolizar las paredes celulares de las plantas debido a la acción combinada de un grupo de enzimas con diferentes especificidades, que incluyen celulasas, hemicelulasas y otras enzimas accesorias que atacan y degradan constituyentes específicos de la pared celular lo que permite que una enzima actúe sobre el producto de otra enzima (Mohanram et al., 2013).

Las composiciones de los cocteles varían según las enzimas utilizadas, el tipo de biomasa y el tipo de tratamiento, lo que destaca la importancia de personalizar las mezclas de enzimas para procesos individuales (Chylenski et al., 2017). Actualmente, la mayoría de las enzimas comerciales se derivan de hongos aeróbicos (por ejemplo, *Trichoderma* spp y *Aspergillus* spp.) debido a la relativa facilidad de producción y alto rendimiento en entornos industriales (Morrison et al., 2016). Diversas compañías de enzimas han logrado un progreso considerable en el desarrollo de mezclas de enzimas hidrolíticas que permiten usar cargas de enzima más bajas mientras se logra una deconstrucción de biomasa efectiva. Esto incluye la búsqueda de organismos productores de hipercelulasas, que son el desarrollo de celulasas superiores con características mejoradas utilizando biotecnologías avanzadas, como mayor eficiencia, mayor estabilidad a temperaturas elevadas y mayor tolerancia a la inhibición por producto final y también a la inhibición por subproductos del tratamiento (Mohanram et al., 2013). Si bien la composición de los cócteles de enzimas comerciales está protegida por patentes, se ha informado que todas estas preparaciones contienen una amplia gama de enzimas centrales (es decir, dirigidas a la columna vertebral de un polímero específico), así como también enzimas accesorias desramificantes (que eliminan cadenas laterales), además de varias proteínas no catalíticas o componentes químicos y surfactantes (Morrison et al., 2016). Se ha informado la presencia de 80 a 200 componentes diferentes dentro de una mezcla de cóctel enzimático (Van Dyk y Pletschke., 2012). Se sabe por ejemplo que los cocteles enzimáticos como el Cellic CTec3 contiene endoglucanasas como enzima central y varias enzimas accesorias, como xilanasas, LPMOs y β -glucosidasas (Hu et al., 2011) La introducción en los cócteles comerciales de enzimas no hidrolíticas, como las LPMOs, ayuda a aumentar la eficiencia de la descomposición de la biomasa lignocelulósica. Experimentos con esta enzima han demostrado que puede mejorar el rendimiento de conversión de celulosa y reducir las cantidades de otras enzimas necesarias para degradar la biomasa (Lopes et al., 2018).

Tratamiento de materiales lignocelulósicos

La biotransformación de la biomasa lignocelulósica, particularmente a partir de residuos agrícolas y forestales, es un área activa de investigación tanto en el sector académico como en el industrial porque estos materiales de partida son abundantes, de bajo costo, fácilmente disponibles y renovables (Intasian et al., 2021). Los residuos de biomasa lignocelulósica

tienen un gran potencial para ser utilizados como productos químicos para conversión adicional en compuestos de valor agregado. La lignocelulosa se compone de polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) y macromoléculas aromáticas (ligninas) donde los contenidos de cada componente en un tipo de biomasa dependen de la edad de la planta, el medio ambiente y la temporada de cosecha (Roy et al., 2020).

Se han desarrollado varios métodos tradicionales de fraccionamiento de la biomasa lignocelulósica, como métodos físicos, químicos, fisicoquímicos y combinados. El tratamiento fisicoquímico aumenta la propiedad aromática de la lignocelulosa al eliminar los grupos hidroxilo presentes. Los métodos químicos, como la hidrólisis ácida o básica, se consideran deseables debido a su potencial para eliminar la lignina y la hemicelulosa en buena medida. También pueden aumentar el área superficial al disminuir la cristalinidad de la celulosa (Roy et al., 2020). Pero estos métodos necesitan instrumentación costosa, alta temperatura y presión, y productos químicos corrosivos. Por lo tanto, es importante desarrollar métodos ecológicos y rentables para el fraccionamiento de lignocelulosa (Sindhu et al., 2016).

El tema del procesamiento de materiales de origen biológico ha pasado a la vanguardia de la investigación de ingeniería sostenible y, en los últimos años, se han publicado varias revisiones de investigación críticas que abordan los temas del pretratamiento de biomasa lignocelulósica, hidrólisis, conversión enzimática y microbiana, así como enfoques de procesamiento de biomasa y perspectivas futuras de biorrefinación (Wu et al., 2022). En los últimos años se han realizado diversos estudios donde se procesa biomasa mediante hidrólisis enzimática. Sin embargo, se han reportado dificultades para escalar el paso de pretratamiento (Da Silva et al., 2020). Como producto del procesamiento enzimático, recientemente, los hidrogeles basados en biopolímeros han llamado mucho la atención como potenciales adsorbentes, debido a su facilidad de aplicación, simplicidad de síntesis y especialmente la presencia de grupos funcionales ($-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3^{2-}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, etc.), que les permite interactuar fácilmente con metales pesados y colorantes (Teow et al., 2018). Los hidrogeles se definen como redes poliméricas hidrófilas tridimensionales capaces de retener una gran cantidad de agua (Ayouch et al., 2021). Su capacidad de adsorción, así como sus propiedades reológicas y alta permeabilidad, les dan la posibilidad de ser utilizados en diferentes procesos y campos, incluyendo aplicaciones agrícolas, farmacéuticas y

biomédicas (Hu et al., 2020). Además, sus propiedades inherentes, la estabilidad en medios acuosos y la presencia de grupos funcionales iónicos en su estructura hacen de los hidrogeles un candidato potencial para descontaminar eficazmente las aguas residuales (Hu et al., 2020).

El uso combinado de enzimas (cocteles) ha estado mayormente orientado al tratamiento de biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustibles, existiendo limitada información acerca de su uso para otros fines, como por ejemplo para el tratamiento de pulpas de disolución y todos los derivados que se puedan obtener de éstas (Usmani et al., 2021). Dentro de este contexto, en este trabajo se propone evaluar el efecto de enzimas hidrolíticas en la forma de monocomponentes y de multicomponentes (cóctel) en el tratamiento de pulpas Kraft, y la obtención de productos del tipo hidrogeles de celulosa a partir del material tratado enzimáticamente.



3. Hipótesis

El tratamiento de pulpas Kraft de eucalipto con endoglucanasas comerciales en la forma de multicomponente enzimático (Cellic CTec3) provocará mayores cambios en las propiedades de las pulpas que cuando se aplican en la forma de monocomponente enzimático, lo que se reflejará positivamente en las características de los hidrogeles obtenidos a partir de las pulpas tratadas enzimáticamente, aumentando su eficiencia.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de preparados enzimáticos comerciales con actividad de endoglucanasa, en la forma de monocomponentes y multicomponente enzimático (Cellic CTec3), en el tratamiento de pulpas Kraft de eucalipto y en la posterior obtención de hidrogeles.

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1 Caracterizar las actividades hidrolíticas predominantes en los preparados enzimáticos comerciales, mono- y multicomponente.
- 4.2.2 Determinar el efecto de la dosis enzimática, pH de reacción y adición de agentes reductores en el tratamiento de pulpas Kraft de eucalipto con los preparados enzimáticos comerciales, mono- y multicomponentes.
- 4.2.3 Evaluar la capacidad de adsorción de los hidrogeles de celulosa obtenidos a partir de la pulpa Kraft tratada enzimáticamente.

5. Materiales y Métodos

5.1 Sustrato celulósico

Se utilizó pulpa Kraft grado papel blanqueada de *Eucalyptus nitens* donada por la empresa CMPC, Planta Santa Fe, Nacimiento. Esta pulpa tenía un contenido de $90,2 \pm 1\%$ de celulosa, $9,8 \pm 0,2\%$ de hemicelulosa y $0,080 \pm 0,002$ mmol/g de grupos carboxilos, con una viscosidad intrínseca de 729 ± 27 mL/g. Esta información fue proporcionada por el Laboratorio de Recursos Renovables, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, donde fue realizada la caracterización.

5.2. Enzimas comerciales

Las celulasas del tipo endoglucanasas (EG) o 1,4- β -glucanohidrolasa (EC 3.2.1.4) en la forma de monocomponentes de *Aspergillus niger* (An; 22178) y de *Trichoderma reesei* ATCC (Tr; C8546) fueron obtenidas desde Sigma-Aldrich (Merck), en forma sólida. El multicomponente enzimático Cellic CTec3, en la forma de un preparado líquido denso, corresponde a una combinación de celulasas, como enzimas principales, más hemicelulasas, proteínas de la familia AA9 y β -glucosidasas, según información proporcionada por el fabricante (Novozymes).

5.3. Caracterización de los preparados comerciales

La caracterización enzimática de los preparados comerciales fue realizada a través de la determinación de la actividad EG, exo-glucanasa, endoxilanasas (EX) y β -glucosidasa para el caso de los monocomponentes de *A. niger* y *T. reesei*. Para el caso del multicomponente Cellic CTec3, además de las actividades ya señaladas, se determinó la actividad de monooxigenasa lítica de polisacáridos (LPMO). Las enzimas fueron utilizadas en concentración de 20 mg/mL para el caso del monocomponente de *A. niger* y de 1 mg/mL para el de *T. reesei*. Para el caso del multicomponente Cellic CTec3 se utilizó una solución diluida 40 veces a partir del concentrado comercial. Adicionalmente, en las soluciones de los monocomponentes y del multicomponente fue determinada la concentración de proteínas. Todos los ensayos enzimáticos fueron realizados en triplicado.

5.3.1 Determinación de actividad endoglucanasa (EG)

La actividad de endoglucanasas (EC 3.2.1.4) fue determinada según la metodología de Tanaka et al. (1981), utilizando carboximetilcelulosa (CMC) al 0,44 % (m/v) como sustrato

enzimático. Para la determinación de la actividad se utilizó 5 μL de la solución de enzima (mono o multicomponente) y 900 μL del sustrato CMC, completando el volumen a 1 mL con solución tampón 0,1 M con diferentes valores de pH: 4 y 6 (tampón citrato) y 7,5 (tampón fosfato). La mezcla se incubó en baño de agua a 50 °C, durante 30 min y 2 h. Al finalizar la incubación los azúcares reductores liberados fueron determinados adicionando 1,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), y llevando los tubos a un baño de agua a 100 °C por 5 min. Finalmente, los tubos se enfriaron y la absorbancia a 540 nm fue determinada en un espectrofotómetro TU-1810 Split Beam UV/Vis. Los valores de absorbancia fueron transformados a concentración de glucosa usando una curva de calibración y la actividad EG fue expresada en UI/mL.

5.3.2 Determinación de exo-glucanasas

La actividad de exo-glucanasas, celobiohidrolasa o avicelasa (EC 3.2.1.91) fue determinada utilizando celulosa microcristalina o Avicel al 1 % (m/v) como sustrato enzimático (Mihajlovski et al., 2015, modificado). Los volúmenes utilizados en la mezcla reaccional fueron 500 μL de Avicel, 100 μL de la solución de enzima (mono y multicomponente) y 400 μL de tampón citrato pH 6. La mezcla se incubó en baño de agua a 50 °C durante 30 min y los azúcares reductores se determinaron siguiendo la metodología del DNS descrita anteriormente (5.3.2). Los valores de absorbancia fueron transformados a concentración de glucosa usando una curva de calibración y la actividad avicelasa fue expresada en UI/mL.

5.3.3 Determinación de β -glucosidasa

Para la actividad de β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) se utilizó como sustrato enzimático p-nitrofenil glucopiranosido (pNPG) al 0,2% (Dixit et al., 2019). La mezcla reaccional se preparó con 450 μL de pNPG, 100 μL de la solución de enzima (mono y multicomponente) y 450 μL de tampón citrato pH 6. La mezcla se incubó en baño de agua a 50 °C durante 30 min y la reacción se detuvo agregando 2 mL de carbonato de calcio (Na_2CO_3) al 2%. Los tubos se enfriaron y la absorbancia a 410 nm fue determinada en un espectrofotómetro TU-1810 Split Beam UV/Vis. Los valores de absorbancia fueron transformados a concentración de p-nitrofenol usando una curva de calibración y la actividad β -glucosidasa fue expresada en UI/mL.

5.3.4 Determinación de actividad endoxilanasas (EX)

La actividad de endoxilanasas (EX) (EC 3.2.1.8) fue determinada utilizando xilano de birchwood 1 % (m/v) como sustrato enzimático (Tanaka et al., 1981). Los volúmenes utilizados en la mezcla reaccional fueron 900 μL de xilano, 5 y 50 μL de la solución de enzima de los monocómpoentes y 50 μL para el multicómpoente y 50 μL de tampón citrato pH 6 para el monocómpoente, y tampón citrato pH 4 y 6 y tampón fosfato pH 7,5 para el multicómpoente. La mezcla se incubó en baño de agua a 50 °C durante 30 min. Para la determinación de azúcares reductores se siguió la metodología del DNS descrita anteriormente (5.3.2). Los valores de absorbancia fueron transformados a concentración de xilosa usando una curva de calibración y la actividad EX fue expresada en UI/mL.

5.3.5 Determinación de actividad LPMO

La actividad LPMO fue determinada como peroxidasa siguiendo la metodología de Breslmayr et al. (2018), utilizando 2,6-dimetoxifenol (DMP) como sustrato enzimático y, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como co-sustrato. La mezcla reaccional fue preparada adicionando a una cubeta de vidrio, 750 μL de tampón fosfato 100 mM pH 7,5, 100 μL de 2,6-DMP 1 mM, 100 μL de H_2O_2 5 mM y la preparación enzimática (multicómpoente) hasta completar un volumen final de 1000 μL . La cinética de oxidación del 2,6-DMP se evaluó a 469 nm durante 5 min a temperatura ambiente en un espectrofotómetro TU-1810 Split Beam UV/Vis. La actividad de LPMO también fue determinada en tampón citrato pH 6 y 4, en ausencia y presencia de H_2O_2 , y en presencia de los agentes reductores ácido ascórbico (AA) y ácido gálico (AG), en concentración 1 mM, luego de una preincubación de 15 min a 30 °C. Los valores de absorbancia fueron transformados en actividad (UI/mL) utilizando el coeficiente de extinción molar del producto de oxidación del 2,6-DMP ($\epsilon_{469\text{nm}} = 53.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

5.3.6 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada en las soluciones de las enzimas mono y multicómpoente por el método Bradford (1976), añadiendo 1 mL del reactivo Bradford a tubos de ensayo y 100 μL de los preparados enzimáticos, y luego de un reposo de 5 min a temperatura ambiente se leyó la absorbancia a 595 nm. Los valores de absorbancia fueron transformados a concentración de proteínas usando una curva de calibración y fue expresada en mg/mL.

5.4 Tratamientos enzimáticos de las pulpas Kraft de eucalipto

Los tratamientos enzimáticos se realizaron utilizando 15 g (peso seco) de pulpa Kraft al 3% de consistencia en buffer citrato 0,1 M (pH 4 y 6) y en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,5), y el volumen apropiado de enzimas (mono y multicomponente), correspondiente a una dosis de 10 y 100 U de actividad como EG (Tabla 1). El efecto de la adición de H₂O₂ 20 μM y de los agentes reductores AA y AG, en concentración 2 mM, en el tratamiento de las pulpas utilizando el complejo multicomponente (10 U) también fue evaluado. Los tratamientos se llevaron a cabo en bolsas de plástico, las cuales se incubaron a 50 °C durante 2 h a 70 rpm (Valls et al., 2019, modificado). Tratamientos control utilizando pulpas Kraft en las mismas condiciones, pero sin la adición de las enzimas, también fueron llevados a cabo. Todos los ensayos fueron realizados en duplicado.

Tabla 1. Tratamientos enzimáticos de pulpa Kraft con EG de *A. niger* (An) y *T. reesei* (Tr) y con el multicomponente Cellic CTec3 en distintas condiciones (pH, dosis enzimática, presencia de H₂O₂ y agentes reductores).

Tratamientos	Tampón citrato pH 4	Tampón citrato pH 6	Tampón fosfato pH 7,5
		Control	
		Tr 10U	
		Tr 100U	
		An 10U	
		An 100U	
	Cóctel 10U	Cóctel 10U	Cóctel 10U
		Cóctel 100U	
	Control+H ₂ O ₂ +AA	Control+H ₂ O ₂ +AA	Control+H ₂ O ₂ +AA
	Cóctel 10U+H ₂ O ₂ +AA	Cóctel 10U+H ₂ O ₂ +AA	Cóctel 10U+H ₂ O ₂ +AA
		Control+H ₂ O ₂ +AG	
	Cóctel 10U+H ₂ O ₂ +AG	Cóctel 10U+H ₂ O ₂ +AG	Cóctel 10U+H ₂ O ₂ +AG

En todos los casos las unidades de actividad (U) están definidas en función de la actividad de endoglucanasa (EG). Tr: *T. reesei*; An: *A. niger*; AA: ácido ascórbico; AG: ácido gálico.

Al finalizar el periodo de incubación, las bolsas se llevaron a un baño de agua a 90°C por 15 min para la inactivación de las enzimas. Luego, el contenido de cada bolsa se filtró a través de un filtro de tela para recuperar las pulpas tratadas. Los filtrados fueron almacenados en el refrigerador para la determinación de azúcares reductores por DNS. Las pulpas se lavaron con agua destilada a 90 °C, se filtraron nuevamente, se almacenaron en bolsas de plástico y se congelaron hasta su uso en los análisis posteriores (Valenzuela et al., 2018, con modificaciones).

5.5 Análisis de las pulpas Kraft de eucalipto post-tratamientos enzimáticos

5.5.1. Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores fueron evaluados en los filtrados de las pulpas tratadas (5.4), mediante el método del DNS (Miller, 1959, modificado). Para ello, se agregó 1 mL de filtrado y 1.5 mL del reactivo DNS. La mezcla se hirvió durante 5 min, se enfrió y se midió la absorbancia a 540 nm. Los valores de absorbancia fueron transformados a concentración de glucosa usando una curva de calibración y fue expresada en g/L. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

5.5.2. Solubilidad de las pulpas en álcali (S₁₈)

El contenido de oligosacáridos de las pulpas se midió utilizando una solución de NaOH al 18% (S₁₈) de acuerdo con el método estándar TAPPI T 235 cm-09. Previo a la preparación de las muestras, se acondicionó NaOH 18% a 25 °C en baño de agua. Luego, se pesó 1,5 g de pulpa secada en estufa de cada muestra, se agregaron 75 mL del NaOH ya acondicionado en vaso precipitado de 250 mL y se dejó en baño de agua a 25 °C. Se agregó la pulpa al vaso precipitado y se cronometró el tiempo una vez que la pulpa entró en contacto con el NaOH. La solución se llevó a un agitador de hélice por 10-15 min hasta total disgregación de la pulpa, y una vez terminado el tiempo, se agregó 25 mL de NaOH y se usó una bagueta para remover la pulpa de la hélice. La solución fue agitada y se dejó en baño de agua hasta concluir los 60 min. Se agitó y filtró la solución usando un filtro Gooch 2. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Posteriormente, para la oxidación de la muestra, se utilizaron 10 mL del filtrado de la pulpa a los cuales se agregaron 10 mL de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) 0,5 N, y 30 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄ 97%), en un matraz de 250 mL, se dejó a temperatura

ambiente por 15 min. Se agregaron 50 mL de agua destilada y se introdujo en baño de agua y hielo hasta enfriar. Luego se adicionaron 3 gotas de indicador de ferroína en el matraz y se realizó la valoración con sulfato de amonio ferroso (FAS) 0,1 N hasta que se observó el viraje de color a café-rojizo.

Cálculo del contenido de oligosacáridos

$$S\% = \frac{(V_2 - V_1) \cdot N \cdot 6,85 \cdot 10}{A \cdot W}$$

Donde V2 es el volumen de titulación del blanco (mL), V1 es el volumen de titulación del filtrado (mL), N es la Normalidad de la solución FAS (Eq/L), A es el volumen utilizado del filtrado (mL), W la masa seca de la pulpa (g) y 6,85 es el factor empírico en mg indicando la cantidad de celulosa equivalente a 1/6 mmol de dicromato de potasio.

5.5.3. Viscosidad intrínseca

La viscosidad intrínseca de todas las muestras se midió de acuerdo con el método estándar TAPPI T 230 om-08, utilizando una solución de cuprietilendiamina (CED) 0,5 M como disolvente. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Se pesaron 0,3 g de pulpa secada en estufa en un frasco plástico, se agregaron 25 mL de agua destilada y 25 mL de CED y se llevó a agitación por 3 h hasta disolver la pulpa. Luego de la disolución de la pulpa, se acondicionó el viscosímetro CANNON Routine 300 en un baño de agua a 25 °C y se cebó con un poco de muestra, se agregaron 10 mL de ésta y se acondicionó por 5 min. Se utilizó una propipeta para succionar la muestra hasta sobrepasar la segunda marca del viscosímetro y se midió el tiempo que tardó la solución desde la segunda a la primera marca.

Para la viscosidad del blanco se preparó una solución con 10 mL de agua destilada y 10 mL de CED en un frasco, luego se cebó el viscosímetro y se repitió el procedimiento antes descrito.

Cálculos de viscosimetría:

Cálculo el η_{ratio} :

$$\eta_{ratio} = \frac{\eta}{\eta_0} = h \times t$$

Donde h es la constante del viscosímetro y t el tiempo medido.

$$\eta_{\text{ratio}} = \frac{\text{constante visc} \times \text{tiempo (muestra)}}{\text{constante visc} \times \text{tiempo (blanco)}}$$

Usando el η_{ratio} calculado, se obtuvo el valor correspondiente a la viscosidad intrínseca con la ecuación de Martin (1951):

$$\log [\eta] = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 \times \rho} - k [\eta] \rho$$

Dónde $\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 \times \rho}$ es el número de viscosidad en mL/g, k es una constante empírica (pulpa/CED, $k = 0.13$) y ρ es la concentración de masa (calculado como pulpa seca), en g/mL de la pulpa en el disolvente diluido (solución 0,5 mol/CED).

5.5.4. Contenido de grupos carboxilos

El contenido de grupos carboxilos se determinó mediante el método de valoración conductimétrica (Saito e Isogai, 2004). A una muestra seca de pulpa (0,3 g) se le añadieron 55 mL de agua destilada y 5 mL de NaCl 0,01M y la mezcla se agitó lo suficiente para preparar una suspensión bien dispersa. Luego, se añadió HCl 0,1 M a la mezcla para establecer el valor de pH en el intervalo de 2,5-3,0 y se tituló con una solución de NaOH 0,01 M a una velocidad de 1 mL/min hasta pH 11, usando un medidor de pH CLEAN PH500 y un conductímetro CLEAN CON500. El contenido de carboxilos de la muestra se determinó a partir de la conductividad y el valor de pH.

Las curvas de valoración mostraron dos puntos de cambio, donde uno de ellos (punto A) indica la neutralización del ácido fuerte (HCl), y el otro (punto B) representa la valoración del ácido débil (grupos carboxilo).

Cálculo del contenido de grupos carboxilos

$$\text{Contenido de carboxilos (mmol/g)} = \frac{[V(\text{NaOH}) \times C(\text{NaOH})]}{g}$$

Donde V es el volumen (mL) de NaOH usado para la valoración entre el punto A y B, C es la concentración de la solución de NaOH (M) y g los gramos de pulpa utilizados.

5.5.5. Contenido de grupos aldehídos

El contenido de aldehídos se midió según el método estándar (Saito e Isogai, 2004). Las muestras se oxidaron con clorito de sodio a pH 4-5 para la conversión selectiva de los grupos aldehído de las muestras en carboxilos, y éste se determinó mediante el método de titulación de conductividad mencionado anteriormente. Para ello, se preparó una suspensión de pulpa con una consistencia del 10%, a esta suspensión (20 g) se añadió a una mezcla que contenía NaClO_2 (1,81 g), CH_3COOH 5 M (20 mL) y agua (57 mL). La oxidación se llevó a cabo agitando la mezcla a temperatura ambiente durante 48 h, seguido de un lavado con agua por filtración. Los grupos carboxilo formados por la oxidación de NaClO_2 se consideraron como grupos aldehído presentes en las muestras.

5.5.6. Preparación de hidrogeles a partir de las pulpas Kraft tratadas

A partir de las pulpas tratadas enzimáticamente se prepararon hidrogeles utilizando el solvente N-metilmorfolina- N-óxido (NMMO) según Carrillo et al. (2022), modificado. Se preparó una mezcla que contiene pulpa al 3% de consistencia, 0,5% de antioxidante propilgalato y NMMO al 50% en un vaso precipitado y se mantuvo a una temperatura de 95 °C por 2 h para obtener las fibras celulósicas regeneradas, ya que a altas temperaturas este disolvente es capaz de disolver directamente la celulosa. La mezcla se dejó solidificar a temperatura ambiente y se lavó con agua destilada cada 8 h en agitación durante 4 días para eliminar el NMMO. Finalmente, los hidrogeles obtenidos de aproximadamente 10 mm de grosor y 30 mm de diámetro fueron mantenidos en agua destilada y etanol para posteriores análisis.

5.5.7. Determinación de la capacidad de adsorción de los hidrogeles

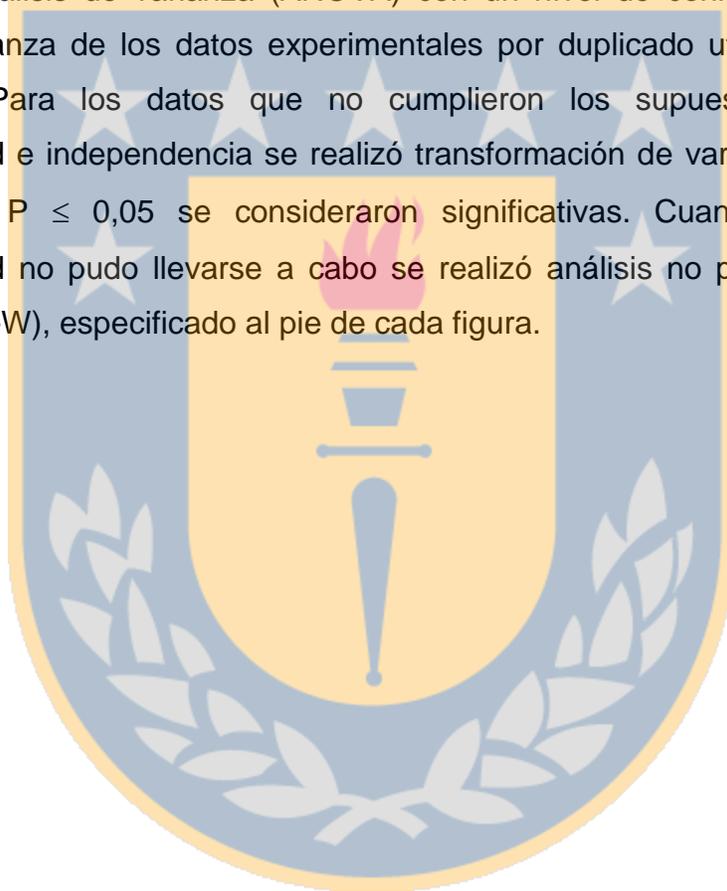
La capacidad de adsorción de tinte de cada hidrogel preparado se investigó comparando las cantidades de azul de metileno (MB) adsorbidas en los hidrogeles según Carrillo et al. (2022). Cada hidrogel (25 mg, peso seco) se añadió a 50 mL de una solución de 200 mg/L de MB a pH 9, y se incubaron a 25 °C durante 24 h a 100 rpm. La absorbancia de las soluciones se midió a 664 nm (peak de máxima absorbancia de la solución del MB) utilizando un espectrofotómetro TU-1810 Split Beam UV/Vis. Los valores de absorbancia fueron transformados a concentración de MB usando una curva de calibración y la capacidad de adsorción de MB por los hidrogeles se calculó utilizando la ecuación:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) V}{m}$$

Donde C_0 y C_e son las concentraciones iniciales y de equilibrio de MB (mg/L), respectivamente, V es el volumen de la solución de MB (L) y m es la masa seca del hidrogel en el horno (g).

5.6. Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 % para comparar la varianza de los datos experimentales por duplicado utilizando el programa Statistica v10. Para los datos que no cumplieron los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia se realizó transformación de variable. Las diferencias con valores de $P \leq 0,05$ se consideraron significativas. Cuando la normalidad y homocedasticidad no pudo llevarse a cabo se realizó análisis no paramétrico utilizando Kruskal-Wallis (K-W), especificado al pie de cada figura.



6. Resultados

6.1 Caracterización enzimática de los preparados comerciales

6.1.1 Actividad endoglucanasa (EG)

Se evaluó la actividad enzimática de endoglucanasa (EG) de las preparaciones comerciales monocomponentes de *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei* y del complejo multicomponente Cellic CTec3 cuyos resultados se muestran en la Figura 1. Tanto para los monocomponentes de ambos orígenes fúngicos como para el multicomponente enzimático, la actividad EG fue significativamente afectada ($P \leq 0,05$) por el aumento de pH (de 4 para 7,5) y del tiempo de reacción (de 30 para 120 min), con reducciones de entre 60-90% en la actividad. Para el caso del preparado de *T. reesei* las mayores actividades EG se detectaron entre los pH 4 (18,6 U/mL) y 6 (16,7 U/mL) a los 30 min de reacción, y al aumentar el pH (7,5) y el tiempo de reacción (120 min) se pudo constatar una reducción significativa en la actividad de entre 80-90%. Las mínimas actividades de la EG de *T. reesei* se detectaron a pH 7,5 (0,24 - 1,26 U/mL) (Figura 1 A). De la misma forma, la EG de *A. niger* presentó la máxima actividad a pH 4 a los 30 min de reacción, y una reducción significativa de la actividad se observó con el aumento de pH, alcanzando un 65% de reducción a pH 7,5. Al igual que para *T. reesei*, al aumentar el tiempo de reacción, la actividad EG de *A. niger* se redujo en alrededor de 70% (Figura 1 B).

Al analizar la actividad EG del multicomponente Cellic CTec3 se observó una tendencia similar a la observada con el preparado de *T. reesei*, detectándose las mayores actividades, sin diferencias estadísticas, entre los pHs 4 y 6, a los 30 min de reacción, y aunque a pH 7,5 la actividad disminuyó significativamente, la reducción fue menor (alrededor de 50%) que la observada con los monocomponentes de ambos hongos. Al aumentar el tiempo de incubación para 120 min la actividad EG del multicomponente disminuyó en alrededor de un 75%, en todos los valores de pH (Figura 1 C).

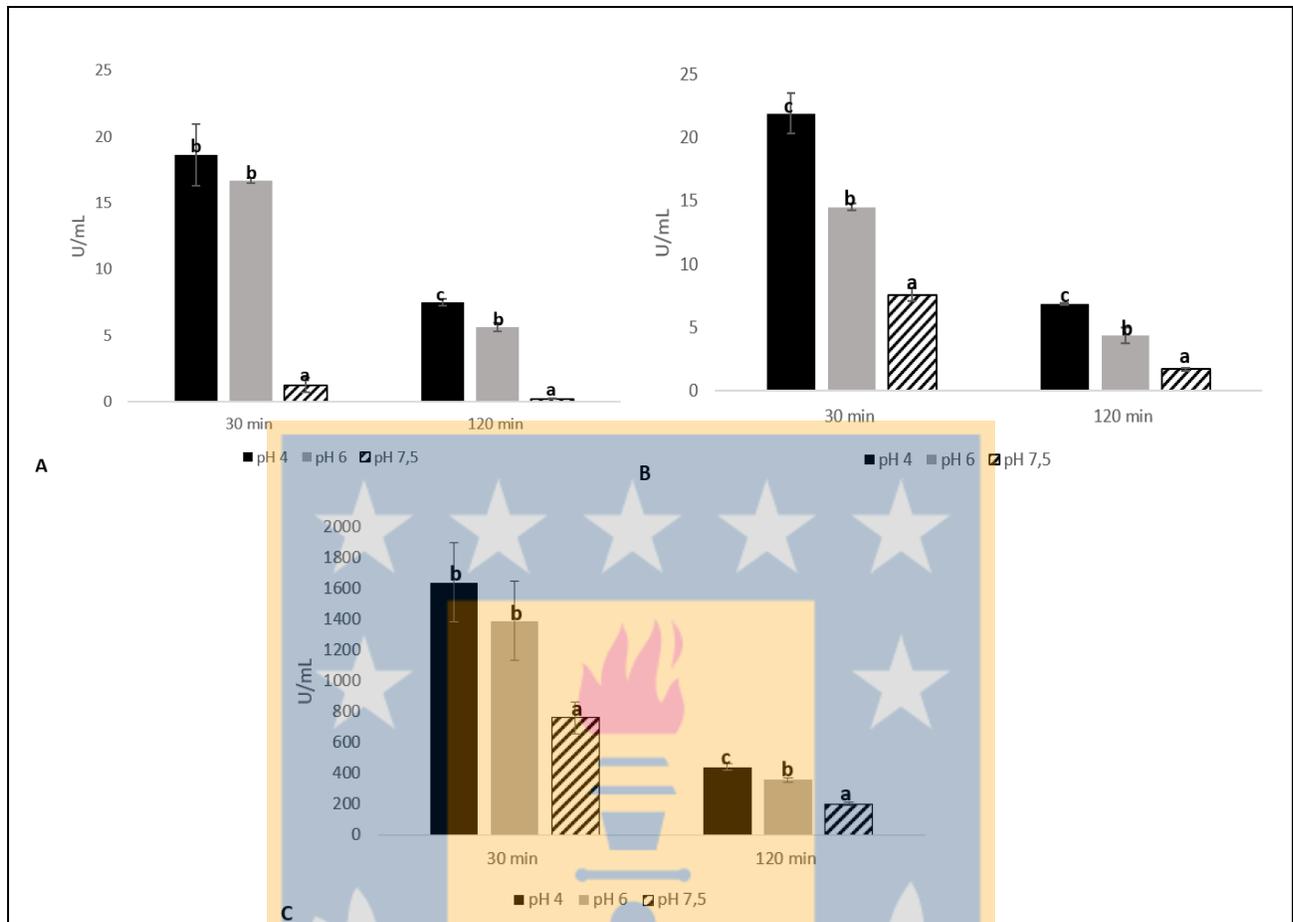


Figura 1. Actividad EG de las enzimas monocomponentes de *T. reesei* (A) y *A. niger* (B) y del multicomponente enzimático Cellic CTec3 (C) a los 30 y 120 min de reacción a distintos valores de pH y 50 °C de incubación. Todos los valores son el resultado del promedio de tres réplicas. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas para cada tiempo de incubación ($P \leq 0,05$).

Al determinar la actividad de EG en función de la concentración de proteínas (actividad específica) para los monocomponentes y el multicomponente se observó que *T. reesei* presentó la mayor actividad específica de EG entre pH 4 y 6, seguida de la actividad específica de EG de *A. niger*. Las actividades específicas de los monocomponentes fueron significativamente superiores a las del complejo multicomponente (Tabla 2), excepto en pH 7,5.

Tabla 2. Actividad específica EG (U/mg) de los monocomponentes de *A. niger* y *T. reesei* y del multicomponente enzimático Cellic CTec3.

Preparación enzimática	pH 4	pH 6	pH 7,5
<i>T. reesei</i>	21±3 e	18,98±0,24 de	1,43±0,62 a
<i>A. niger</i>	16±1 d	10,98±0,23 c	5,73±0,37 b
Cóctel Cellic CTec3	4,90±0,76 b	4,14±0,77 b	2,27±0,30 a

Actividad medida en 30 min de reacción a 50°C, en diferentes valores de pH. Todos los valores son el resultado del promedio de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro una misma fila ($P \leq 0,05$).

6.1.2. Actividad exo-glucanasa, β -glucosidasa, endoxilanasas (EX) y LPMO.

En los monocomponentes de ambos hongos y en el complejo multicomponente fue posible detectar la presencia de otras actividades enzimáticas del tipo celulolíticas tales como exo-glucanasa o avicelasa y β -glucosidasa, además de la actividad hemicelulolítica endoxilanasas (EX) (Tabla 3). La actividad de exo-glucanasas mostró la tendencia *A. niger* > Cellic CTec3 >> *T. reesei*, con diferencias significativas entre ellas, mientras que para el caso de β -glucosidasa y EX las mayores actividades fueron detectadas en el complejo multicomponente respecto a los monocomponentes (Tabla 3).

Al igual que la actividad EG, la actividad de EX del complejo multicomponente fue medida a diferentes valores de pH (4, 6 y 7,5), detectándose la mayor actividad a pH 4 (968,30 UI/mL) con una leve reducción de entre 12-27% al aumentar el valor de pH.

La actividad de la enzima LPMO también fue analizada, pero solo en el complejo multicomponente (Tabla 3). Cuando se determinó la actividad de LPMO en presencia de H₂O₂ (tipo peroxidasa) y a diferentes valores de pH, se detectó la mayor actividad a pH 7,5 (0,035 UI/mL). A pH 4 no se detectó actividad y a pH 6 la actividad fue menor a la detectada a pH 7,5 (Tabla 3).

En la Tabla 3 se muestra la determinación de la concentración de proteínas en los preparados enzimáticos monocomponente y multicomponente, con una tendencia Cellic CTec3 >>> *T. reesei* ≈ *A. niger*.

Tabla 3. Actividad celulolítica, hemicelulolítica y mono-oxigenasa lítica de polisacáridos (LPMO) de los monocomponentes de *A. niger* y *T. reesei* y del multicomponente enzimático Cellic CTec3.

	<i>T. reesei</i>	<i>A. niger</i>	Cellic CTec3
Exo-glucanasa (U/mL)	0,76±0,36 a	6,80±0,22 c	4,02±0,61 b
β-glucosidasa (U/mL)	34,45±0,23 a	37,61±0,04 b	82,94±0,38 c
Endo-xilanasa (U/mL)	1,65±0,02 a	16,77±0,03 a	848±48 b
LPMO (U/mL)	n.d.	n.d.	0,035±0,01
Proteínas (mg/mL)	0,88±0,03 a	1,32±0,01 a	335±4 b

Actividad (U/mL) medida en 30 min de reacción a 50°C y pH 6, excepto LPMO que fue medida a temperatura ambiente y durante 5 min. Todos los valores son el resultado del promedio de los triplicados. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro una misma fila ($P \leq 0,05$). n.d.: No determinada

6.2 Tratamiento enzimático y análisis de pulpas Kraft

6.2.1. Determinación de azúcares reductores

Al analizar los azúcares reductores por el método DNS en la solución residual posterior al tratamiento de las pulpas con los monocomponentes enzimáticos a pH 6, se puede observar que, aunque existen diferencias entre los tratamientos con las EG de *T. reesei* (10 y 100 U) y de *A. niger* (10 U) y de éstas con el control, las diferencias no son significativas (Figura 2). Mientras que al aumentar la dosis de la EG de *A. niger* para 100 U, el contenido de azúcares liberados desde las pulpas fue 5,8 veces mayor (3,52 g/L) que el liberado con la dosis enzimática más baja (10 U), y estadísticamente similar a lo liberado con la menor dosis (10 U) del cóctel enzimático Cellic CTec3. Cuando la dosis del cóctel se aumentó para 100 U la cantidad de azúcares liberados a la solución residual fue 5 veces mayor (15,56 g/L) que la liberada con 10 U (3,1 g/L), con una diferencia altamente significativa respecto a los otros tratamientos (Figura 2).

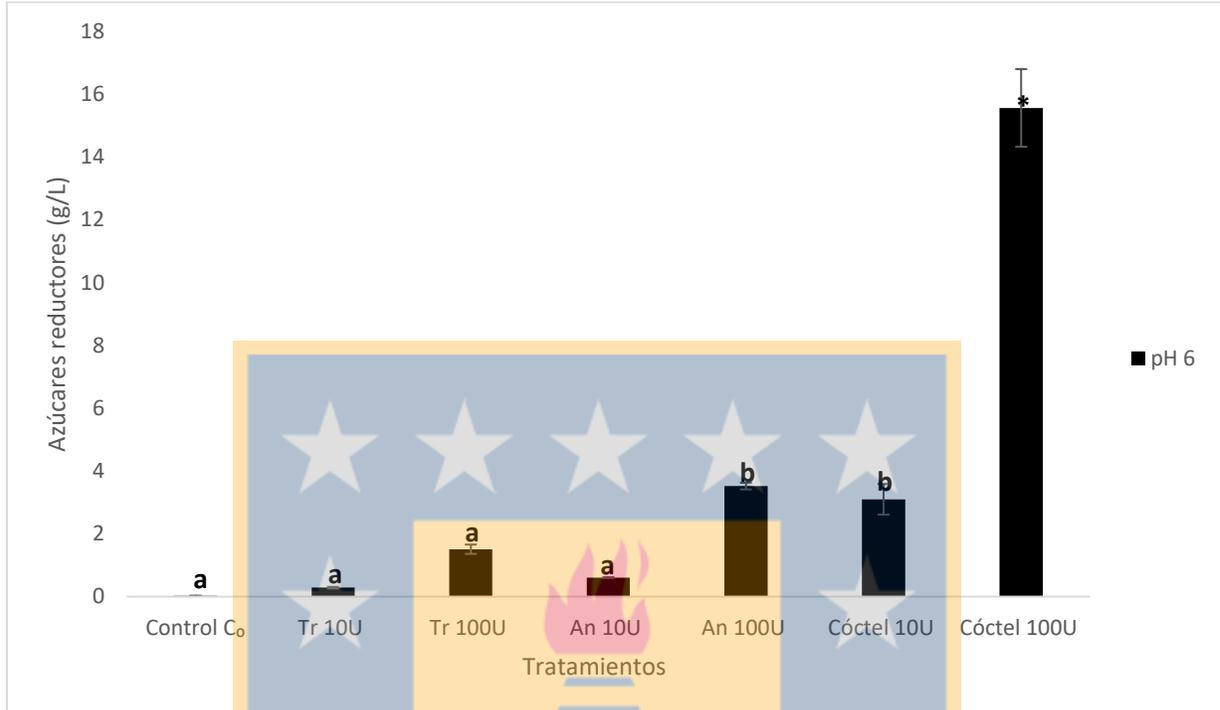


Figura 2. Azúcares reductores (g/L) liberados después del tratamiento enzimático de las pulpas Kraft a 3 % de consistencia, con los monocombientes de *T. reesei* (Tr) y *A. niger* (An) y el multicomponente Cellic CTec3, a pH 6, durante 2 h a 50 °C y 70 rpm. Todos los valores son el resultado del promedio de los duplicados. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$), (*): diferencia altamente significativa.

Al analizar los azúcares reductores liberados luego del tratamiento de las pulpas con el multicomponente Cellic CTec3 bajo diferentes condiciones de pH (Figura 3), se observó que al utilizar la dosis más baja del cóctel (10 U) no hubo diferencias significativas entre los azúcares liberados a pH 4 y 6. Sin embargo, cuando el pH aumentó para 7,5 se produjo una disminución significativa en la liberación de los azúcares. Cuando el cóctel enzimático (10 U) se aplicó en el tratamiento de pulpas en combinación con H_2O_2 y el agente reductor ácido ascórbico (AA), el mayor contenido de azúcares se detectó a pH 4 (3,72 g/L), disminuyendo significativamente a medida que aumentaba el pH hasta una concentración de 1,26 g/L a pH 7,5. Similares resultados, aunque levemente mayores, fueron obtenidos cuando el cóctel se aplicó en combinación con H_2O_2 y el agente reductor ácido gálico (AG), donde el mayor

contenido de azúcares liberados se detectó también a pH 4 (4,05 g/L), disminuyendo significativamente hasta pH 7,5 (1,67 g/L). Cabe destacar que en los tratamientos control no se detectó liberación de azúcares, y al agregar H_2O_2 , y los agentes reductores (AA o AG) existió una liberación mínima (0,15 - 0,23 g/L) (Figura 3).



Figura 3. Azúcares reductores (g/L) liberados después del tratamiento enzimático de las pulpas Kraft a 3% de consistencia, con el complejo multicomponente Cellic CTec3, a diferentes valores de pH, durante 2 h a 50 °C y 70 rpm. Todos los valores son el resultado del promedio de los duplicados. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas dentro de un mismo tratamiento ($P \leq 0,05$).

6.2.2. Solubilidad de las pulpas en álcali (S_{18})

El análisis de solubilidad de las pulpas en álcali S_{18} , luego del tratamiento enzimático, revela el contenido de oligosacáridos presentes en las pulpas. El tratamiento con ambos monocomponentes (Tr y An) a pH 6, mostró una tendencia al incremento significativo en el S_{18} al aumentar la dosis de enzima de 10 a 100 U, pero solo los tratamientos con 100 U de enzima fueron significativamente diferentes del tratamiento control (C_0) (Figura 4). El

contenido de oligosacáridos también mostró un aumento significativo cuando se aumentó la dosis enzimática del multicomponente Cellic CTec3, y cuando se usó la dosis más alta del cóctel (100 UEG) se obtuvo el mayor contenido de oligosacáridos de todos los tratamientos (20,1%), que fue estadísticamente diferente del resto de los tratamientos a pH 6.

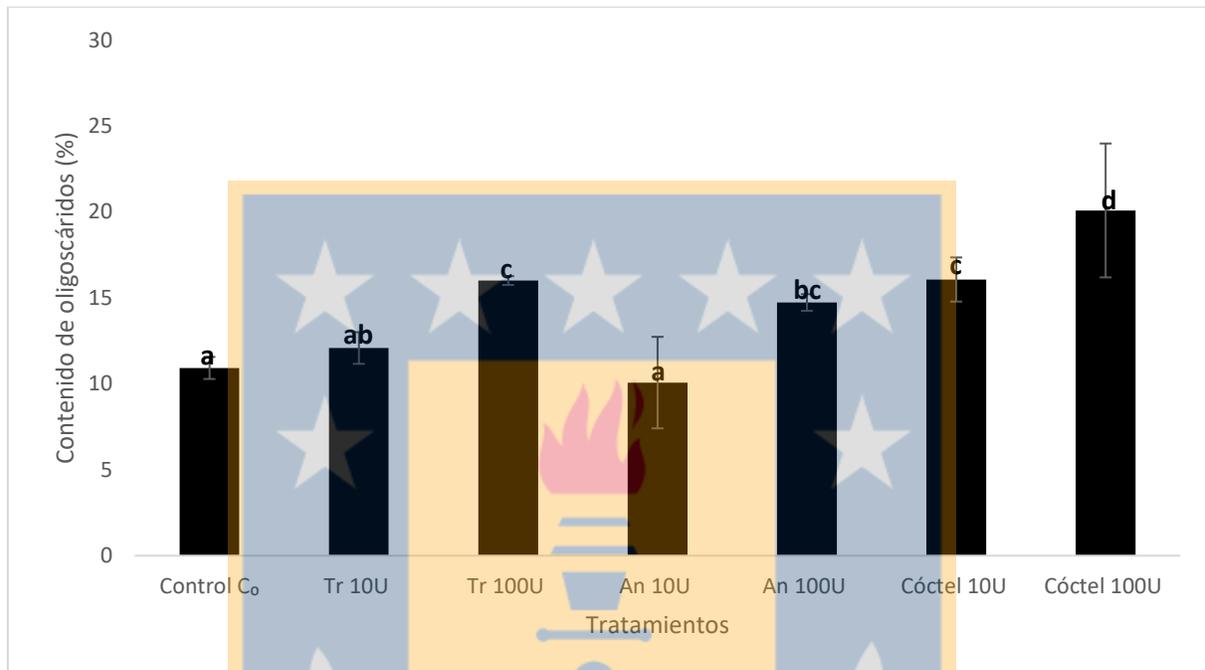


Figura 4. Contenido de oligosacáridos (%) liberados después del tratamiento enzimático de las pulpas Kraft a 3% de consistencia, con los monocomponentes de *T. reesei* (Tr) y de *A. niger* (An) y el multicomponente Cellic CTec3, a pH 6 (2 h/50 °C/70 rpm). Todos los valores son el resultado del promedio de los duplicados. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

El efecto del tratamiento con el multicomponente Cellic CTec3 (dosis 10 UEG) sobre el contenido de oligosacáridos fue analizado en diferentes valores de pH, y en presencia de H_2O_2 y agentes reductores (ácido ascórbico y ácido gálico). Cuando se utilizó la menor dosis del cóctel (10 UEG), los mayores contenidos de oligosacáridos se observaron a pH 4 (15,2%) y pH 6 (16,1%), disminuyendo significativamente a pH 7,5 (12,4%) (Figura 5). En presencia de H_2O_2 y AA, contenidos de oligosacáridos levemente superiores o similares al tratamiento en ausencia de las sustancias adicionales fueron obtenidos a pH 4 (17,7%) disminuyendo significativamente al aumentar el pH hasta 7,5 (13,1%), siendo el contenido de oligosacáridos obtenido a pH 4 el mayor respecto a los otros tratamientos. En presencia

de H₂O₂ y AG, no hay diferencias significativas en los contenidos de oligosacáridos detectados a pH 4 y pH 6, pero sí a pH 7,5 (11,8%), donde se observa una disminución significativa respecto a los otros dos tratamientos.

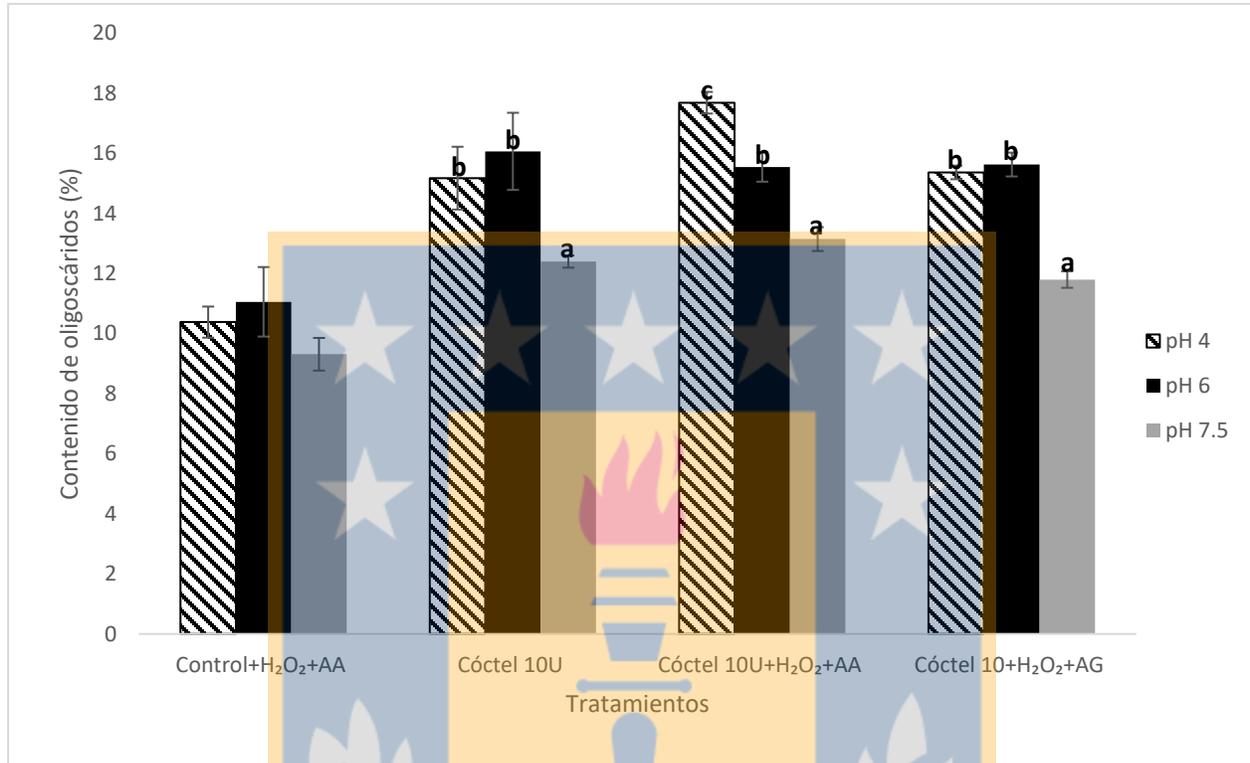


Figura 5. Contenido de oligosacáridos (%) liberados después del tratamiento enzimático de las pulpas Kraft a 3% de consistencia, con el complejo multicomponente Cellic CTec3, a diferentes valores de pH (2 h/50 °C/70 rpm). Todos los valores son el resultado del promedio de los duplicados. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas dentro de un mismo tratamiento ($P \leq 0,05$).

6.2.3. Viscosidad intrínseca de las pulpas

Los resultados de los ensayos de viscosidad de las pulpas luego de los tratamientos enzimáticos a pH 6 mostraron una disminución, significativa en algunos casos, respecto al tratamiento control C₀ (621 mL/g) (Figura 6), siendo los menores valores obtenidos luego del tratamiento con ambas dosis (10 y 100 UEG) del cóctel Cellic CTec3 (414,0 y 321,9 mL/g, respectivamente) y con la dosis alta del monocomponente de *T. reesei* (423,1 mL/g). El uso del monocomponente de *A. niger* sólo en la dosis alta (100 U) produjo una disminución significativa de la viscosidad (547,3 mL/g), respecto al control (Figura 6).

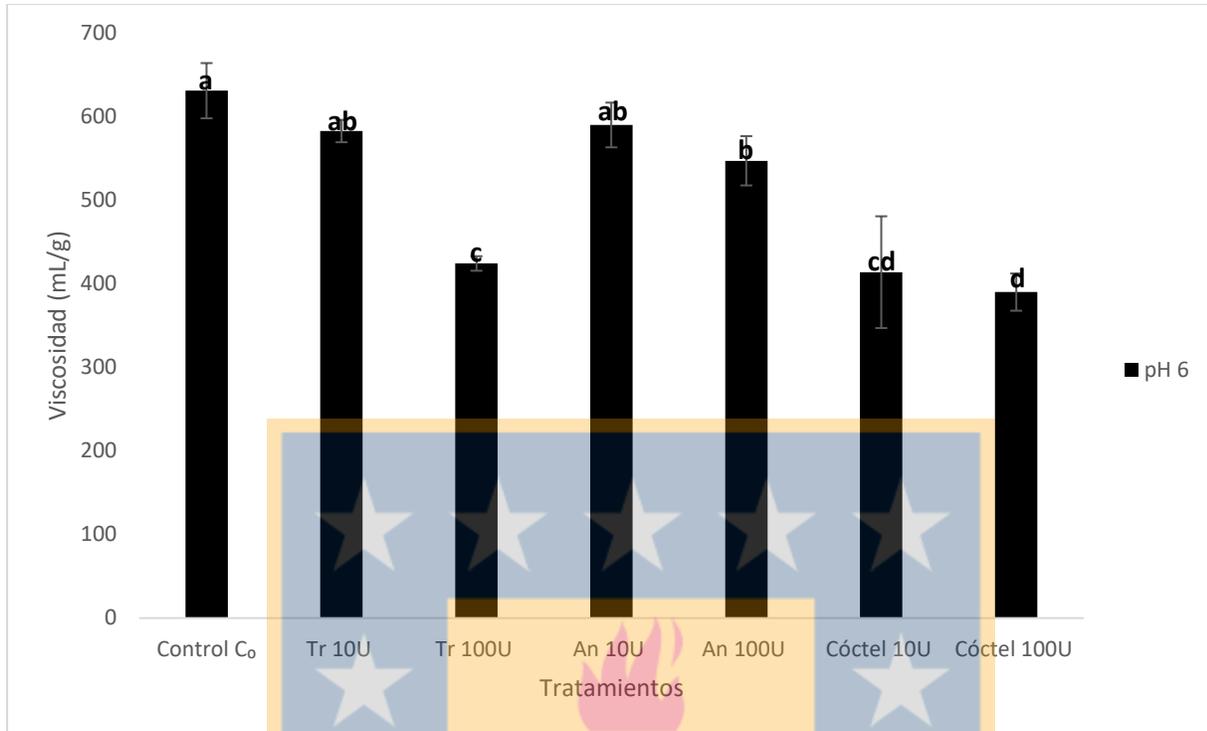


Figura 6. Viscosidad intrínseca (mL/g) después del tratamiento enzimático de las pulpas Kraft a 3% de consistencia, con los monocomponentes de *T. reseei* (Tr) y de *A. niger* (An) y el multicomponente Cellic CTec3, a pH 6 (2 h/50 °C/70 rpm). Todos los valores son el resultado del promedio de los duplicados. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Los tratamientos de las pulpas con el complejo Cellic CTec3 (10 UEG) en diferentes valores de pH y en ausencia y presencia de H_2O_2 y agentes reductores (AA y AG), disminuyeron la viscosidad de las pulpas respecto al control C₀ (647,6 mg/mL promedio), alcanzándose valores en el rango de 347 - 449 mL/g (Figura 7). Cuando el tratamiento de las pulpas se realizó solo con el cóctel Cellic CTec3 no se observaron diferencias significativas en las viscosidades entre los tratamientos a diferentes valores de pH, pero sí fue posible observar diferencias significativas cuando se adicionaron H_2O_2 y agentes reductores en los tratamientos. En el caso de la adición de H_2O_2 y AA los menores valores de viscosidad se presentaron a pH 4 (346,5 mL/g) y 7,5 (347,3 mL/g) siendo significativamente menores que a pH 6 (441,2 mL/g). En presencia de H_2O_2 y AG, la menor viscosidad se observó a pH 6 (374,2 mL/g), con diferencias significativas respecto a los otros valores de pH (Figura 7).

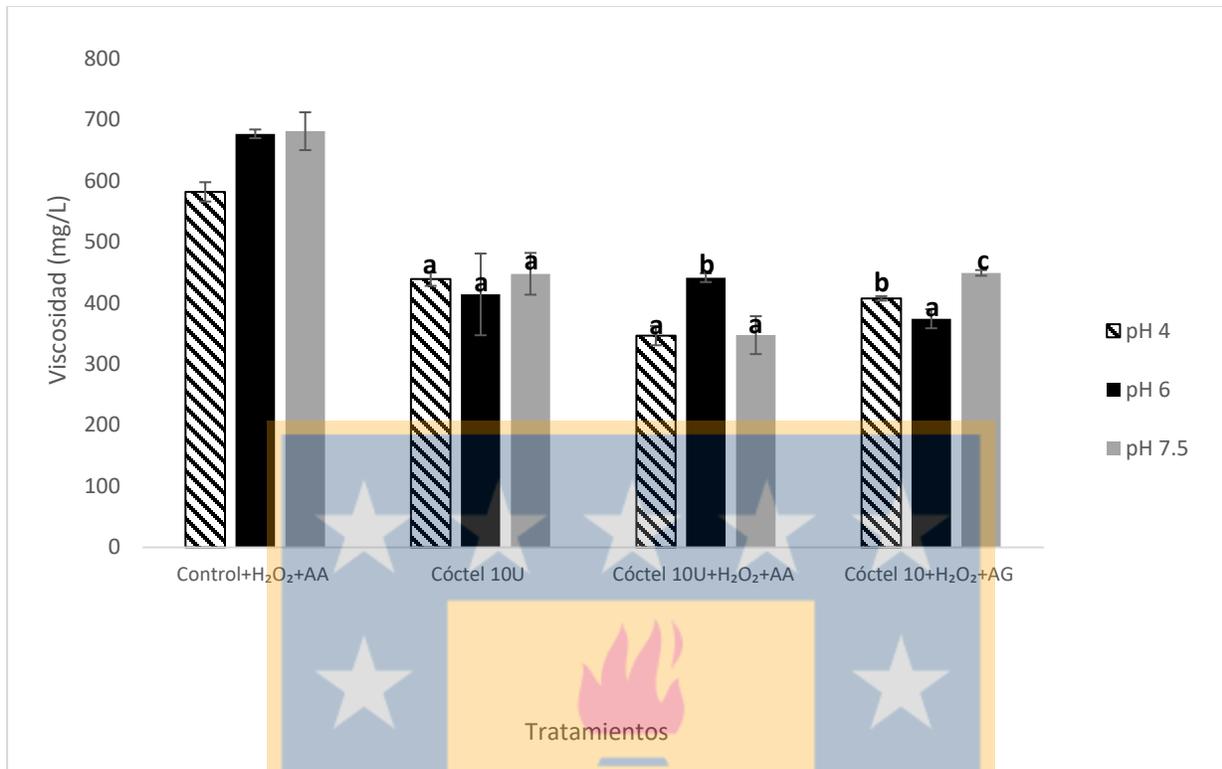


Figura 7. Viscosidad intrínseca (mL/g) después del tratamiento enzimático de las pulpas Kraft a 3% de consistencia, con el complejo multicomponente Cellic CTec3, a diferentes valores de pH (2 h/50 °C/70 rpm). Todos los valores son el resultado del promedio de los duplicados. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas dentro de un mismo tratamiento ($P \leq 0,05$).

6.2.4. Contenido de grupos carboxilos y aldehídos en las pulpas

Para determinar el contenido de grupos carboxilos en las pulpas Kraft se seleccionaron los tratamientos control (C_0 y control en presencia de H_2O_2 y AA), y los tratamientos con el monocomponente de *T. reesei* (tratamiento referencia) y el complejo multicomponente Cellic CTec3 en la dosis menor (10 UEG).

El contenido de grupos carboxilos en las pulpas del tratamiento control C_0 (0,16 mmol/g) fue semejante al determinado en las pulpas tratadas con la EG monocomponente de *T. reesei* en la dosis de 100 U (0,17 mmol/g). Con la utilización del cóctel enzimático en el tratamiento de las pulpas existe un aumento en los grupos carboxilos a pH 6 (0,23 mmol/g) respecto al control C_0 , y con diferencias significativas respecto a los otros valores de pH. En presencia de H_2O_2 y AA, y a pH 4 (0,25 mmol/g) se detectó el mayor contenido de grupos carboxilos en las pulpas, respecto a los otros tratamientos, y respecto al uso de AG como agente

reductor, en la misma condición de pH (Figura 8). En general, en los tratamientos utilizando el cóctel Cellic CTec3 a pH 4 fue donde se observaron los mayores cambios (aumento o disminución) en el contenido de grupos carboxilo, respecto a los controles.

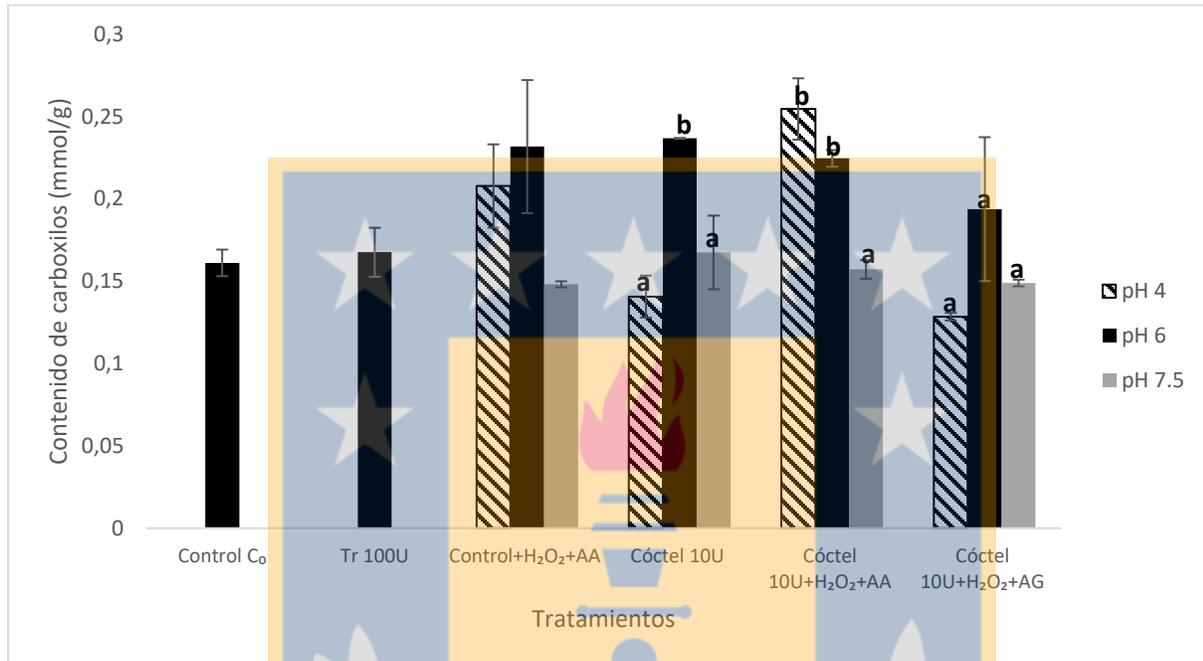


Figura 8. Contenido de grupos carboxilos (mmol/g) después del tratamiento enzimático de las pulpas Kraft a 3% de consistencia, con el monocomponente de *T. reseei* (Tr) y el multicomponente Cellic CTec3, a diferentes valores de pH (2 h/50 °C/70 rpm), en presencia y ausencia de H₂O₂ y agentes reductores (AA y AG). Los valores son el resultado del promedio de los duplicados, excepto Control C₀ y Tr100U. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas dentro de un mismo tratamiento (P≤0,05), con análisis no paramétrico para cóctel (10 U+ H₂O₂+ AA).

Para el análisis del contenido de grupos aldehídos se seleccionaron las pulpas con viscosidades similares y representativas de cada pH y tratamiento, las cuales fueron utilizadas posteriormente para la preparación de los hidrogeles. En la Figura 9 se puede observar que no existieron diferencias significativas en el contenido de grupos aldehídos entre las pulpas control C₀ y aquellas tratadas con las enzimas en la forma de monocomponente de *T. reseei* o de multicomponente Cellic CTec3, excepto el tratamiento

con el multicomponente en presencia de H_2O_2 y AG a pH 7,5, que mostró un valor levemente mayor de grupos aldehídos, con diferencias significativas respecto al control C_0 .

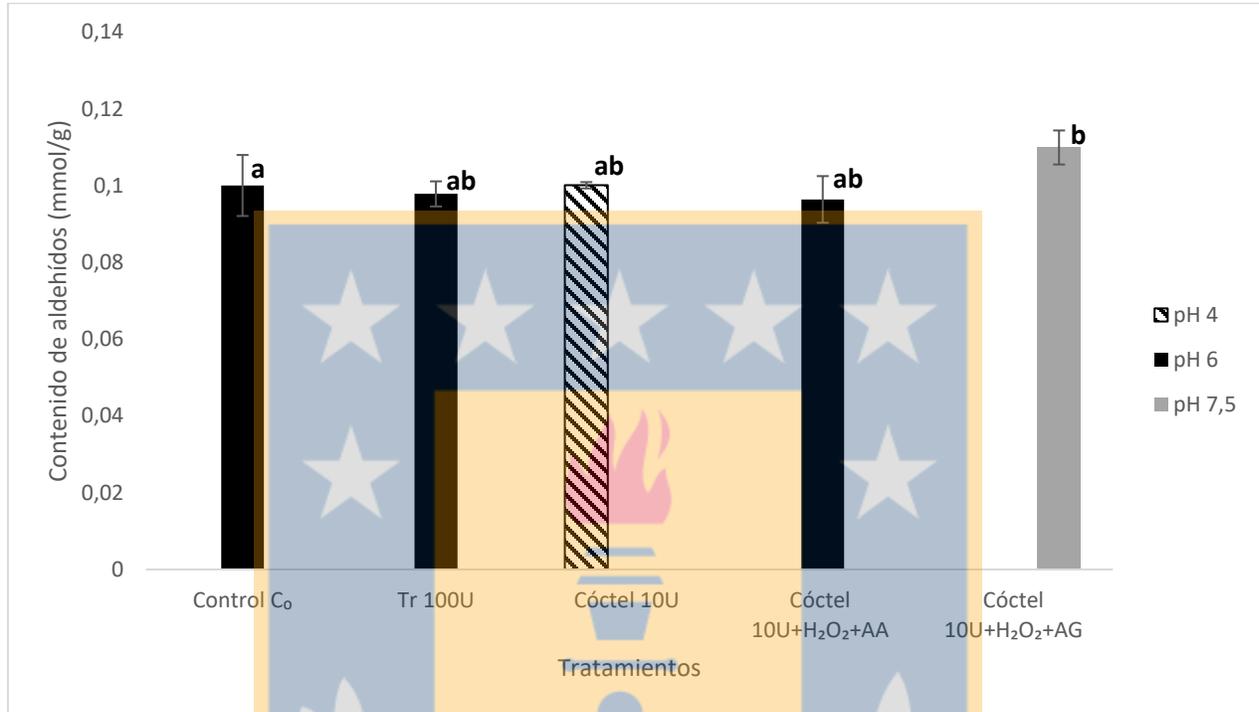


Figura 9. Contenido de grupos aldehídos (mmol/g) después del tratamiento de las pulpas Kraft a 3% de consistencia, con el monocomponente de *T. reseei* (Tr) y el multicomponente Cellic CTec3, a diferentes valores de pH (2 h/50 °C/70 rpm), en presencia y ausencia de H_2O_2 y agentes reductores (AA y AG). Todos los valores son el resultado del promedio de los duplicados. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

6.2.5 Preparación de hidrogeles a partir de las pulpas Kraft tratadas enzimáticamente

Algunas pulpas tratadas enzimáticamente fueron seleccionadas para la obtención de hidrogeles de celulosa (Figura 10), los cuales fueron posteriormente evaluados por su capacidad de adsorción de colorante (Figura 11). La preparación de los hidrogeles se consiguió de forma exitosa con todas las pulpas de los tratamientos seleccionados por presentar viscosidades similares (423,1 - 449,0 mg/mL) y de cada pH. Como se muestra en la Figura 10, A representa la pulpa luego del tratamiento enzimático con el cóctel 10 UEG, B representa la pulpa luego de la completa disolución de las fibras de celulosa en solvente

de N-metilmorfolina- N-óxido (NMMO) y C representa el hidrogel de celulosa formado luego de la eliminación del solvente NMMO.



Figura 10. Hidrogeles de pulpa Kraft tratada enzimáticamente, donde (A) corresponde a la pulpa Kraft tratada, (B) disolución de las fibras de celulosa en NMMO y (C) aspecto del hidrogel obtenido después a partir de la pulpa Kraft.

Para probar la capacidad de adsorción de los hidrogeles recién producidos, éstos se sumergieron en solución con azul de metileno (MB) 200 mg/L, comparando las cantidades de MB absorbidas en los hidrogeles. A pesar de observarse una mayor capacidad de absorción con el hidrogel proveniente del tratamiento con el monocomponente de *T. reseei* (45,3 mg/g), los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos y tampoco respecto al control C₀ (Figura 10).

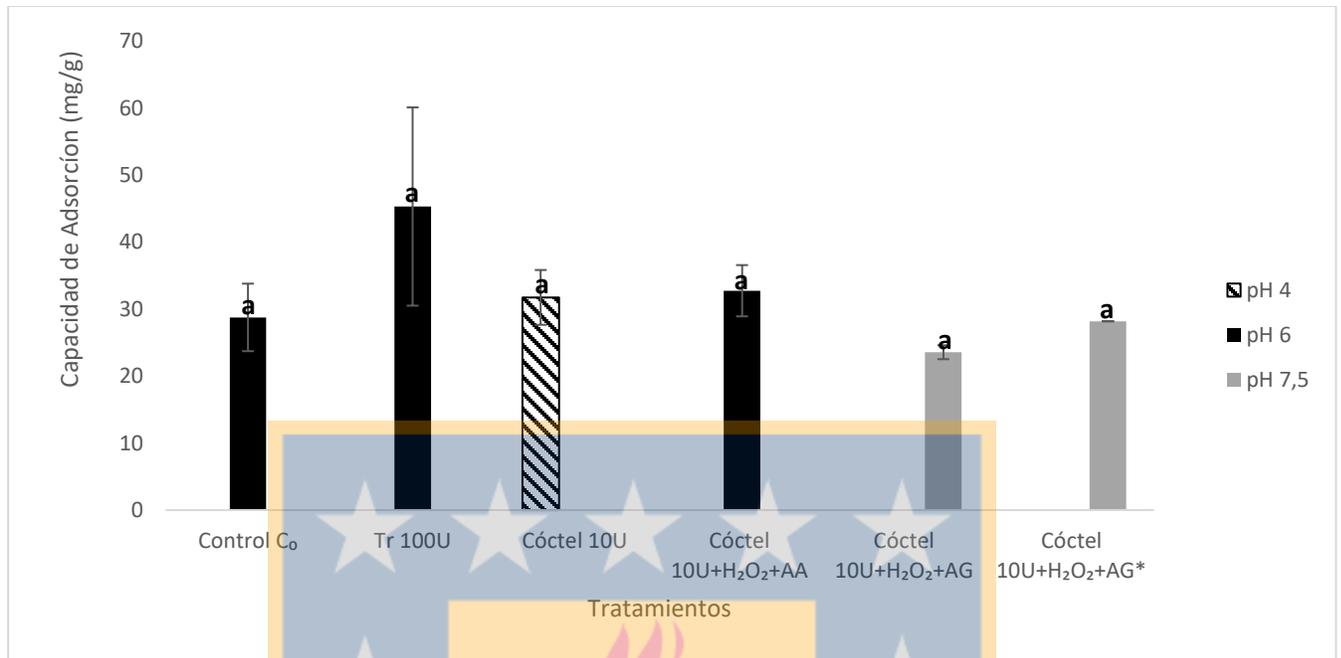


Figura 11. Capacidad de adsorción de azul de metileno de los hidrogeles de celulosa obtenidos a partir de pulpa Kraft tratada enzimáticamente, con el monocomponente de *T. reesei* (Tr) y multicomponente Cellic CTec3. (*) Tratamiento sin antioxidante. Todos los valores son el resultado del promedio del duplicado muestral. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

7. Discusión

En los últimos años, la producción de materiales sostenibles y amigables con el medio ambiente, así como el uso de biocatalizadores han atraído una atención creciente tanto en el área de investigación científica como de investigación aplicada con fines industriales, ya sea en los procesos de producción o en el producto final. La pulpa de celulosa es el material lignocelulósico más abundante, renovable y económico, que se usa ampliamente en las industrias papelera y agrícola (uso de residuos). Sin embargo, la fragilidad y la solubilidad de la pulpa de celulosa restringen su aplicación (Jo et al., 2022). Debido a su estructura parcialmente cristalina y amorfa, el uso de la pulpa de celulosa es limitado (Jo et al., 2022), y se han probado diferentes tratamientos químicos para mejorar su reactividad. Para buscar rutas alternativas al tratamiento químico se han desarrollado cada vez más tratamientos enzimáticos, con enzimas hidrolíticas del tipo celulasas y hemicelulasas, y más recientemente se ha agregado la enzima LPMO (Han et al., 2021). En este estudio se evaluó el uso de celulasas comerciales en el tratamiento de pulpa Kraft, en la forma de monocomponentes (*T. reesei* y *A. niger*), y en la forma del multicomponente, Cellic CTec3, o cóctel enzimático.

Previo al tratamiento de las pulpas se realizó una caracterización de las enzimas presentes en los preparados comerciales, y se evaluó el efecto del tiempo de reacción y el pH en la actividad catalítica. Los monocomponentes de *T. reesei* y *A. niger* presentaron elevada actividad de EG como era esperado, por ser la enzima predominante en estos preparados. Sin embargo, en los monocomponentes también fue posible detectar actividad de exo-glucanasas (avicelasa), endo-xilanasas y β -glucosidasas, siendo las actividades de exo-glucanasas y xilanasas del monocomponente de *A. niger* mayores que las de *T. reesei*. Aunque estas enzimas hidrolíticas han sido encontradas en los caldos extracelulares de ambas especies fúngicas (Winarsih y Siskawardani., 2020), no era esperable encontrarlas en los preparados comerciales, ya que según datos del fabricante debería tratarse de enzimas puras, en este caso solo del tipo EG. Se ha sugerido que las enzimas poseen la capacidad de operar sobre más de un sustrato o de mostrar más de un mecanismo de acción (Risso et al., 2013). Un comportamiento interesante en la EG es mostrar actividad procesiva, es decir, mostrar tanto actividad de endo- como de exo-glucanasa lo cual es típico para las EG de la familia GH9 a la cual pertenecen los preparados monocomponente de ambos

hongos (Barruetaña et al., 2019). En el caso del complejo multicomponente Cellic CTec3, es sabido que la enzima predominante es EG, pero que ésta se encuentra formando parte de una mezcla compleja con una serie de otras enzimas hidrolíticas de diferente naturaleza que sólo son informadas de manera genérica por el fabricante (Novozymes). En concordancia con esto, el multicomponente presentó una elevada actividad de EG, pero también de xilanasas, seguida de una actividad importante de β -glucosidasa, y una actividad muy baja de exo-celulasa. La actividad de la enzima auxiliar no-hidrolítica LPMO, también fue detectada en el cóctel Cellic CTec3 a pH 7,5 y en presencia de H_2O_2 . Esta enzima en la actualidad se adiciona a los cócteles enzimáticos comerciales para potenciar o aumentar la eficiencia de hidrólisis de la biomasa lignocelulósica (Adsul et al., 2020).

Diversos factores influyen en la actividad catalítica de las enzimas, como la concentración de sustrato, la inhibición por producto, el tiempo y la temperatura de reacción y el pH, por eso aquí se evaluaron algunos de estos factores, porque además son variables de interés al momento de aplicar las enzimas en el tratamiento de biomasa lignocelulósica con diferentes fines (Winarsih y Siskawardani., 2020). Se pudo observar que al aumentar el pH de 4 a 7,5 y el tiempo de reacción de 30 a 120 min, se produjo una disminución entre 60-90% de la actividad de EG, tanto de los monocomponentes como del complejo multicomponente, y la sensibilidad a estos factores mostró la tendencia *T. reesei* > *A. niger* > multicomponente. En términos de actividad específica (U/mg proteína) la situación es diferente y la tendencia es *T. reesei* > *A. niger* >> multicomponente. Este es un parámetro bioquímico importante ya que da una medida de la pureza enzimática de la enzima en una mezcla. Para enzimas puras de la misma familia como los monocomponentes y suponiendo masas moleculares similares, la actividad específica también mide la eficiencia de la enzima ya que está directamente relacionada con el número de recambio (Ordaz-Pérez et al., 2022). Normalmente, el precio comercial de una enzima se fija en unidades de enzima; por lo tanto, una enzima con alta actividad específica es deseable para procesos industriales (Ferreira et al., 2020).

El complejo enzimático celulolítico lleva a cabo el proceso de bioconversión de celulosa hasta azúcares reductores, y según lo reportado por Maleki et al. (2020), las enzimas celulolíticas con alta actividad catalítica dan como resultado un mayor rendimiento de azúcares. Al comparar la acción de las EG de ambos monocomponentes en iguales dosis

enzimáticas sobre las pulpas Kraft (10 y 100 U/g pulpa), los mayores rendimientos en azúcares reductores se obtuvieron luego del tratamiento con la EG de *A. niger*, rendimientos que fueron similares a los obtenidos con la menor dosis (10 UEG/g pulpa) del multicomponente Cellic CTec3. El mayor rendimiento en azúcares reductores siguió la tendencia Cellic CTec3 >>> *A. niger* >> *T. reesei* al utilizar 100 U EG/g pulpa, y al reducir en 10 veces la dosis de EG (de 100 a 10 U/g pulpa) se observó una disminución de alrededor de 5 veces en el rendimiento de azúcares reductores, tanto con los monocomponentes como con el multicomponente. Cuando el multicomponente Cellic CTec3 se utilizó en el tratamiento de las pulpas en diferentes condiciones de pH (4, 6 y 7,5) se observó una disminución significativa en el rendimiento de azúcares reductores al aumentar el pH para 7,5. Mientras que al realizar el tratamiento de las pulpas con Cellic CTec3 en presencia de H₂O₂ y los agentes reductores (ácido ascórbico y ácido gálico) se pudo apreciar un ligero, pero significativo aumento de azúcares a pH 4 respecto a las otras condiciones de pH. Se esperaba que al agregar los agentes reductores y el H₂O₂ a pH 7,5 se incrementaran los azúcares reductores por la acción de la LPMO. Xin et al. (2022) reportan que se obtuvo un efecto potenciador por parte de AA que no ocurrió con AG al utilizar el multicomponente Cellic CTec2 sobre el sustrato Avicel. Los autores, asimismo confirman que existe una disminución en el pH al agregar estos agentes reductores, lo que podría afectar la actividad de las enzimas. Silva et al. (2017) obtuvieron un rendimiento de aproximadamente 16,00 g/L de azúcares reductores después de la hidrólisis de bagazo de caña de azúcar al 3% de consistencia pretratada con NaOH, utilizando 10 U FPU/g de celulosa de Cellic CTec3 a 50 °C durante 24 h. Ese rendimiento en azúcares resultó similar a lo obtenido aquí al utilizar 100 U EG/g pulpa de Cellic CTec3 (15,56 g/L), lo que indica que el aumento en la dosis podría reducir el tiempo de tratamiento del material lignocelulósico. Pero el aumento en los azúcares reductores no siempre es un efecto deseado debido a que la liberación de azúcares producto de la acción las celulasas no solo reduce el rendimiento de la pulpa, como en el caso del tratamiento con 100 UEG del cóctel, sino que puede generar un costo considerable para el tratamiento de ésta (Nagl et al., 2021).

Para la determinación del contenido de oligosacáridos se utilizó la metodología de la solubilidad de las pulpas en álcali (S₁₈), la cual indica el grado de pureza, es decir cuanto más bajo es el S₁₈, mayor es la pureza de la pulpa, mientras que un valor más alto de S₁₈

es perjudicial para reacciones de derivatización y rendimiento de los derivados (Vallejos et al., 2022). El S_{18} típico oscila entre el 4 y el 2 % para celofán, rayón y otros derivados como los acetatos (Vallejos et al., 2022). Este análisis muestra la disolución principalmente de hemicelulosa degradada, pero en general es el contenido de oligosacáridos, y lo esperable luego del tratamiento químico sería que el contenido de éstos fuera menor al del control (Li et al., 2015; Carrillo-Varela et al., 2019). Sin embargo, como se ha reportado en la literatura al aumentar la dosis enzimática el contenido de oligosacáridos aumenta (Sango et al., 2018), indicando un aumento en los polisacáridos degradados. Resultados similares fueron obtenidos por Miao et al. (2014), quienes reportaron un ligero aumento en S_{18} después del tratamiento con endoglucanasas el cual posiblemente se debió al hecho de que una pequeña cantidad de celulosa en la pulpa se degradó excesivamente. Lo que concuerda con los resultados obtenidos aquí donde S_{18} aumentó con el tratamiento con EG en la forma de monocomponente y de cóctel Cellic CTec3 y también al aumentar la dosis enzimática respecto al control. Al analizar los tratamientos con Cellic CTec3 a diferentes valores de pH, también se observaron aumentos en el contenido de oligosacáridos respecto a los tratamientos control, principalmente en pH 4 en presencia de H_2O_2 y el agente reductor ácido ascórbico.

La viscosidad intrínseca de las pulpas tratadas decrece con el aumento en la dosis de enzimas, esto se debe a la disolución de las cadenas de celulosa por acción de las EG, las cuales tienen afinidad por las regiones de celulosa amorfa y promueven un ataque aleatorio en los enlaces β -glucosídicos internos, liberando oligómeros de diferentes longitudes, como celobiosa y celo-oligosacáridos (Barbosa et al., 2020). Los ataques aleatorios causan una rápida disminución de la longitud de las cadenas, lo que hace que la viscosidad disminuya con el aumento de los grupos terminales reductores (Zabed et al., 2017). Por esto, se esperaba que los tratamientos con altas dosis de EG de los monocomponentes redujeran la viscosidad de las pulpas Kraft, pero solo se observó una disminución significativa en el tratamiento con 100 U del monocomponente de *T. reesei* (424 mL/g) respecto a la pulpa control (631 mL/g), lo que podría deberse a que este posee la mayor actividad específica de EG y los valores de viscosidad obtenidos con EG de *T. reesei* fueron comparables a los obtenidos con ambas dosis del multicomponente Cellic CTec3 (aprox. 400 mL/g). A pesar de observarse una disminución de la viscosidad luego del tratamiento con el cóctel Cellic

CTec3, respecto al control, no se observaron diferencias en las viscosidades entre las dosis de 10 y 100 UEG, así como tampoco se observaron diferencias entre los tratamientos a diferentes pHs (4- 7,5). Sin embargo, cuando se utilizó el multicomponente en presencia de H₂O₂ y los agentes reductores (AA y AG) a diferentes pHs, si se observaron variaciones en las viscosidades de las pulpas, con valores que fueron siempre menores que la viscosidad de los respectivos controles, y que correspondieron a las menores viscosidades obtenidas de todos los tratamientos (346-370 mL/g). Se pudo observar una disminución mayor en la viscosidad en los pHs extremos del tratamiento con H₂O₂ y el agente reductor AA, respecto al pH 6. En cambio, con el agente reductor AG, la viscosidad en los pHs extremos fue mayor que a pH 6, sugiriendo diferentes modos de acción para ambos agentes reductores. Ceccherini et al. (2021), reportaron resultados similares al aplicar un tratamiento con una combinación de LPMO (con agente reductor AG) y EG, donde la viscosidad disminuyó un 19% en comparación con el tratamiento solo con EG a pH 7. Similares resultados se observaron con el tratamiento con el cóctel Cellic CTec3 10 UEG combinado con H₂O₂ y AG a pH 6, el cual redujo la viscosidad un 36% comparado con el tratamiento utilizando el monocomponente *T. reesei* 10 U, al mismo valor de pH.

Existen grupos funcionales importantes de determinar en las pulpas de celulosa que han sido sometidas a algún tipo de tratamiento químico o enzimático, tales como los grupos carboxilo y los aldehídos, debido a que estos determinan la capacidad de absorción, la resistencia a la tracción y la flexibilidad de la pulpa entre otros (Aracri et al., 2011; Quintana et al., 2017). Aquí se determinaron los grupos carboxilo y aldehídos en las pulpas tratadas con el monocomponente de *T. reesei* y con el multicomponente Cellic CTec3, en ausencia y presencia de H₂O₂ y agentes reductores a diferentes valores de pH. Los grupos carboxilo son grupos hidrofílicos que pueden promover el hinchamiento y fibrilación de las fibras de celulosa y, por lo tanto, mejorar la fuerza de unión de las fibras (Lin et al., 2018). El contenido de grupos carboxilos obtenido aquí luego de los diferentes tratamientos enzimáticos (0,16 – 0,25 mmol/g) fue similar a lo reportado por Nie et al. (2018), al tratar pulpa de *Eucalyptus* con xilanasas donde el control presentó un contenido de carboxilos de 0,14 mmol/g y las pulpas tratadas con dosis de 5 y 30 UI/g un contenido de 0,15 y 0,18 mmol/g, respectivamente. En las pulpas tratadas con el multicomponente Cellic CTec3 era esperable que a pH 7,5 hubiera un aumento en el contenido de grupos carboxilos debido a la actividad de la enzima LPMO detectada, principalmente luego de adicionar H₂O₂ y agentes

reductores. Sin embargo, solo se vio un aumento a pH 4, lo cual sería contradictorio con la determinación de la actividad LPMO que es máxima a pH 7,5 y no se detecta a pH 4, utilizando 2,6-DMP como sustrato. La aparente falta de efecto de esta enzima en los ensayos en que se intentó potenciar su actividad utilizando H₂O₂ y agentes reductores a pH 7,5, podría deberse a las condiciones de temperatura usadas en los tratamientos de las pulpas, ya que es sabido que la actividad de LPMO incrementa entre los 25 y 40 °C, pero a 50 °C se inactiva rápidamente (Breslmayr et al., 2018). El tipo de solución tampón utilizado también puede influir en la actividad de la LPMO, ya que aniones citrato interactúan con el cobre del sitio activo disminuyendo la actividad hasta 40 veces (Breslmayr et al., 2018). En cuanto al contenido de grupos aldehídos se esperaba que las pulpas tratadas con el cóctel Cellic CTec3 (10 UEG) presentaran un mayor contenido de grupos aldehídos, debido a la actividad de LPMO que debería producir un cierto grado de oxidación de la pulpa, y el grado de oxidación está relacionado con un alto contenido de grupos aldehídos (Lin et al., 2020). Sin embargo, el tratamiento a pH 7,5 en presencia de H₂O₂ y el agente reductor AG solo produjo un leve aumento en el contenido de aldehídos, pero que fue significativo respecto al tratamiento control. Un estudio realizado por Syverud et al. (2014), demostró que los grupos aldehído de nanofibrillas de celulosa oxidada se pueden usar para facilitar el entrecruzamiento de las fibrillas y obtener estructuras de gel permanentes.

Los hidrogeles son candidatos atractivos para una amplia gama de aplicaciones, incluidas la agricultura y la ingeniería biomédica, principalmente debido a la enorme capacidad de absorber y retener grandes cantidades de líquidos (Wong et al., 2021), por esto se seleccionaron pulpas tratadas enzimáticamente con viscosidades intrínsecas similares para formular hidrogeles, los cuales fueron formulados de manera exitosa y a los cuales se les probó la eficiencia a través de la capacidad de adsorción utilizando del colorante azul de metileno (MB). Los hidrogeles obtenidos mostraron capacidades de adsorción de MB que variaron entre 23,6 y 45,3 mg/g, sin embargo, estos valores no mostraron diferencias estadísticas con el hidrogel control (28,8 mg/g). Duman et al. (2020), determinaron la capacidad de adsorción de azul de metileno (MB) de hidrogeles de agar/k-carragenano (derivado de la celulosa de algas rojas) donde a las 24 h obtuvieron una adsorción de 16 mg/g de hidrogel. Carrillo et al. (2022), determinaron la capacidad de adsorción de MB de hidrogeles de pulpas Kraft tratadas químicamente con extracción cáustica en frío (CCE) y

con activación por hidrólisis ácida diluida, y obtuvieron valores de adsorción de entre 29 y 45 mg/g de hidrogel, siendo comparable a la capacidad de adsorción de los hidrogeles obtenidos de los tratamientos enzimáticos con el monocomponente de *T. reesei* 100 U (45,3 mg/g) y también con los hidrogeles tratados con Cellic CTec3 10 U (31,8 mg/g) y con el cóctel combinado con H₂O₂ y AG (32,7 mg/g).

Estos resultados preliminares sugieren que nuevas condiciones de tratamiento enzimático de las pulpas Kraft con los monocomponentes y multicomponente deberían ser probadas y optimizadas, y al mismo tiempo análisis adicionales deberían ser incluidos que permitieran determinar los cambios producidos en las pulpas por acción de las enzimas.



8. Conclusiones

- Se corroboró que la actividad hidrolítica predominante en los preparados enzimáticos comerciales monocomponente de *T. reesei* y *A. niger* era de endoglucanasa (EG), pero se determinó que éstos también presentan actividad de exo-glucanasa, β -glucosidasa y endoxilanasas. Las mismas enzimas fueron detectadas en el multicomponente Cellic CTec3, además de la actividad auxiliar del tipo LPMO.
- La actividad EG tanto de los monocomponentes como del multicomponente fue significativamente ($P \leq 0,05$) afectada por el pH y el tiempo de reacción, observándose las mayores actividades en rangos de pH ácido (4-6) y en tiempos cortos de incubación (30 min).
- Los tratamientos enzimáticos fueron capaces de generar modificaciones en las propiedades de la pulpa Kraft de eucalipto siguiendo la tendencia multicomponente Cellic CTec3 > monocomponente de *T. reesei* > monocomponente de *A. niger*, y las diferencias observadas en los tratamientos con los monocomponentes de ambos hongos sugieren diferentes mecanismos de acción de las EG.
- Los tratamientos enzimáticos con el multicomponente Cellic CTec3 (10 y 100 U) y el monocomponente de *T. reesei* (100 U) fueron métodos eficaces para disminuir la viscosidad intrínseca y aumentar el contenido de oligosacáridos de las pulpas, principalmente a pH 4 y 6, y en presencia de H_2O_2 y agentes reductores en el caso del Cellic CTec3.
- Las pulpas tratadas enzimáticamente y seleccionadas por viscosidades similares fueron utilizadas para la formulación de hidrogeles de celulosa que presentaron capacidad de adsorción de azul de metileno, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos enzimáticos.
- La selección de una determinada preparación enzimática comercial en la forma de mono- o multicomponente para el tratamiento de pulpas Kraft u otro material lignocelulósico debería considerar una optimización previa de diversos factores determinantes de la catálisis, ya que el éxito del tratamiento enzimático dependerá del mecanismo de acción particular de cada enzima.

Bibliografía

Adsul M., Sandhu S.K., Singhanian R.R., Gupta R., Puri S.K., Mathur A. (2020). Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. *Enzyme and Microbial Technology*, 133, 109442, 1-12.

Aracri E., Vidal T., Ragauskas A.J. (2011). Wet strength development in sisal cellulose fibers by effect of a laccase–TEMPO treatment. *Carbohydrate Polymers*, 84(4), 1384-1390.

Ayouch I., Kassem I., Kassab Z., Barrak I., Barhoun A., Jacquemin J., Draoui K., Achaby M.E. (2021). Crosslinked carboxymethyl cellulose-hydroxyethyl cellulose hydrogel films for adsorption of cadmium and methylene blue from aqueous solutions. *Surfaces and Interfaces*, 24, 101124, 1-15.

Barbosa F.C., Silvello M.A., Goldbeck R. (2020). Cellulase and oxidative enzymes: new approaches, challenges and perspectives on cellulose degradation for bioethanol production. *Biotechnology Letters*, 42, 875-884.

Barruetabeña N., Alonso-Lerma B., Galera-Prat A., Joudeh N., Barandiaran L., Aldazabal L., Arbulu M., Alcalde M., De Sancho D., Gavira J.A., Carrion-Vazquez M., Perez-Jimenez R. (2019). Resurrection of efficient Precambrian endoglucanases for lignocellulosic biomass hydrolysis. *Communications Chemistry*, 2(76), 1-13.

Bhattacharya, A. S., Bhattacharya, A., & Pletschke, B. I. (2015). Synergism of fungal and bacterial cellulases and hemicellulases: a novel perspective for enhanced bio-ethanol production. *Biotechnology Letters*, 37(6), 1117-1129.

Binod P., Janu K. U., Sindhu R., Pandey A. (2011). Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. *Biofuels*, 229-250.

Bissaro B., Røhr Å.K., Müller G., Chylenski P., Skaugen M., Forsberg Z., Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Eijsink V.G.H (2017). Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂. *Nature Chemical Biology* 13 (10), 1123-1128.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brander S., Lausten S., Ipsen J.Ø., Falkenberg K.B., Bertelsen A. B., Nørholm M.H.H., Østergaard L.H., Johansen K.S. (2021). Colorimetric LPMO assay with direct implication for cellulolytic activity. *Biotechnology Biofuels* 14, 1-13.

Breslmayr E., Hanžek M., Hanrahan A., Leitner C., Kittl R., Šantek B., Oostenbrink C., Ludwig R. (2018). A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1-13.

Carrillo-Varela I., Mendonça R.T., Pereira M., Reyes-Contreras P., Contreras D. (2022) Methylene blue adsorption onto hydrogels made from different Eucalyptus dissolving pulps. *Cellulose*, 29, 445-468.

Carrillo-Varela I., Retamal R., Pereira M., Mendonça R.T. (2019). Structure and reactivity of cellulose from bleached kraft pulps of different Eucalyptus species upgraded to dissolving pulp. *Cellulose*, 26(9), 5731-5744.

Ceccherini S., Rahikainen J., Marjamaa K., Sawada D., Grönqvist S., Maloney T. (2021). Activation of softwood kraft pulp at high solids content by endoglucanase and lytic polysaccharide monooxygenase. *Industrial Crops and Products*, 166, 113463, 1-10.

Chylenski P., Forsberg Z., Ståhlberg J., Várnai A., Lersch M., Bengtsson O., Sæbø S., Horn S.J., Eijsink V.G.H. (2017). Development of minimal enzyme cocktails for hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass. *Journal of Biotechnology*, 246, 16-23.

Collins T., Gerday C., Feller G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3-23.

Cuevas C. (2021). Enzimas xilanolíticas provenientes de microorganismos termófilos para aplicaciones industriales. Universidad de Concepción.

Da Silva A.S., Espinheira R.P., Teixeira R.S.S., de Souza M.F., Ferreira-Leitão V., Bon E.P.S. (2020). Constraints and advances in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: a critical review. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 1-28.

Dixit P., Basu B., Puri M., Tuli D.K., Mathur A.S., Barrow C.J. (2019). A screening approach for assessing lytic polysaccharide monooxygenase activity in fungal strains. *Biotechnology for Biofuels*, 12, 1-16.

Duman O., Polat T.G., Diker C.Ö., Tunç S. (2020). Agar/ κ -carrageenan composite hydrogel adsorbent for the removal of Methylene Blue from water. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 823-835.

Fei X., Jia W., Wang J., Chen T., Ling Y. (2019). Study on enzymatic hydrolysis efficiency and physicochemical properties of cellulose and lignocellulose after pretreatment with electron beam irradiation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 733-739.

Ferreira R.G., Azzoni A.R., Freitas S. (2020). On the production cost of lignocellulose-degrading enzymes. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 15(1), 85-99.

Forsberg Z., Stepanov A.A., Nærdal G.K., Klinkenberg G., Eijsink V.G.H. (2020). Engineering lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). *Methods in Enzymology*, 644, 1-34.

Gutiérrez-Rojas I., Moreno-Sarmiento N., Montoya D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1-12.

Han X., Bi R., Khatri V., Oguzlu H., Takada M., Jiang J., Bao J., Saddler J.N. (2021). Use of Endoglucanase and Accessory Enzymes to Facilitate Mechanical Pulp Nanofibrillation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(3), 1406-1413.

Hasunuma T., Okazaki F., Okai N., Hara K.Y., Ishii J., Kondo A. (2013). A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource Technology*, 135, 513-522.

Hu J., Arantes V., Pribowo A., Gourlay K., Saddler J.N. (2014). Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. *Energy Environ. Sci.*, 7(7), 2308-2315.

Hu J., Arantes V., Pribowo A., Saddler J.N. (2013). The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a "cellulase mixture" but is highly substrate specific. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1-12.

Hu J., Arantes V., Saddler J.N. (2011). The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnol. Biofuels*, 4, 1-14.

Hu X., Yan L., Wang Y., Xu M. (2020). Self-assembly of binary oppositely charged polysaccharides into polyelectrolyte complex hydrogel film for facile and efficient Pb²⁺ removal. *Chemical Engineering Journal*, 388, 124189, 1-12.

Intasian P., Prakinee K., Phintha A., Trisrivirat D., Weeranoppanant N., Wongnate T., Chaiyen P. (2021). Enzymes, In Vivo Biocatalysis, and Metabolic Engineering for Enabling a Circular Economy and Sustainability. *Chemical Reviews*, 121, 10367-10451.

Jo C., Kim S.S., Rukmanikrishnan B., Ramalingam S., Prabakaran D.S., Lee J. (2022). Properties of Cellulose Pulp and Polyurethane Composite Films Fabricated with Curcumin by Using NMMO Ionic Liquid. *Gels*, 8(4), 248, 1-14.

Johansen K.S. (2016). Discovery and industrial applications of lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Biochemical Society Transactions*, 44(1), 143-149.

Juturu V., Wu J.C., (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188-203.

Kaushal J., Khatri M., Singh G., Arya S.K. (2021). A multifaceted enzyme conspicuous in fruit juice clarification: an elaborate review on xylanase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 1350-1361.

Kubicek C.P. (2013). Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 133-142.

Kumar V., Marín-Navarro J., Shukla P. (2016). Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(2), 1-10.

Kracher D., Forsberg Z., Bissaro B., Gangl S., Preims M., Sygmund C., Eijsink V.G.H., Ludwig R. (2020). Polysaccharide Oxidation by Lytic Polysaccharide Monooxygenase is Enhanced by Engineered Cellobiose Dehydrogenase. *FEBS Journal*, 287, 897-908.

Laurent C.V.F.P., Sun P., Scheiblbrandner S., Csarman F., Cannazza P., Frommhagen M., Ludwig R. (2019). Influence of Lytic Polysaccharide Monooxygenase Active Site Segments on Activity and Affinity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6219, 1-22.

Li J., Zhang H., Duan C., Li Y., Ni Y. (2015). Enhancing hemicelluloses removal from a softwood sulfite pulp. *Bioresource Technology*, 192, 11-16.

Lin P., Liu L., He G., Zhang T., Yang M., Cai J., Fan L., Tao S. (2020). Preparation and properties of carboxymethyl chitosan/oxidized hydroxyethyl cellulose hydrogel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1692-1698.

Lin X., Wu Z., Zhang C., Liu S., Nie S. (2018). Enzymatic pulping of lignocellulosic biomass. *Industrial Crops and Products*, 120, 16-24.

Lopes A.M., Ferreira Filho E.X., Moreira L.R.S. (2018) An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. *Journal of Applied Microbiology*, 125, 632-645.

Maeda R.N., Barcelos C.A., Anna L.M.M.S., Pereira N. (2013). Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *Journal of Biotechnology*, 163(1), 38-44.

Maleki M., Shahraki M.F., Kavousi K., Ariaeenejad S., Salekdeh G.H. (2020). A novel thermostable cellulase cocktail enhances lignocellulosic bioconversion and biorefining in a broad range of pH. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 349-360.

Malgas S., Mafa M.S., Mkabayi L., Pletschke B.I. (2019). A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(12), 1-13.

Martin A.F., Toward a Referee Viscosity Method for Cellulose. *TAPPI*, 1951, 34, 363-366.

Miao Q., Chen L., Huang L., Tian C., Zheng L., Ni Y. (2014). A process for enhancing the accessibility and reactivity of hardwood kraft-based dissolving pulp for viscose rayon production by cellulase treatment. *Bioresource Technology*, 154, 109-113.

Mihajlovski K.R., Carević M.B., Dević M.L., Šiler-Marinković S., Rajilić-Stojanović M.D., Dimitrijević-Branković S. (2015) Lignocellulosic waste material as substrate for Avicelase production by a new strain of *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 104, 426-34.

Miller G.L. (1959) Modified DNS method for reducing sugars, *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.

Mohanram S., Amat D., Choudhary J., Arora A., Nain L. (2013). Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), 1-12.

Morrison J.M., Elshahed M.S., Youssef N.H. (2016). Defined enzyme cocktail from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A effectively releases sugars from pretreated corn stover and switchgrass. *Scientific Reports*, 6(1), 29217, 1-12.

Motta L.L., Andrade C.C., Santana M.H. (2013). A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*. InTechOpen, New York, 1, 251-276.

Nagl M., Haske-Cornelius O., Skopek L., Pellis A., Bauer W., Nyanhongo G.S., Guebitz G. (2021). Biorefining: the role of endoglucanases in refining of cellulose fibers. *Cellulose*, 28(12), 7633-7650.

Nie S., Zhang K., Lin X., Zhang C., Yan D., Liang H., Wang S. (2018). Enzymatic pretreatment for the improvement of dispersion and film properties of cellulose nanofibrils. *Carbohydrate Polymers*, 181, 1136-1142.

Ordaz-Pérez D., Fuentes-Garibay J.A., Guerrero-Olazarán M., Viader-Salvadó J.M. (2022) Sequence Engineering of an *Aspergillus niger* Tannase to Produce in *Pichia pastoris* a Single-Chain Enzyme with High Specific Activity. *Molecular Biotechnology*, 64, 388-400.

Quintana E., Roncero M.B., Vidal T., Valls C. (2017). Cellulose oxidation by Laccase-TEMPO treatments. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1488-1495.

Quiroz-Castañeda E.R., Folch-Mallol J.L. (2013). Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, InTechOpen, Rijeka, 119-155.

Risso V.A., Gavira J.A., Mejia-Carmona D.F., Gaucher E.A., Sanchez-Ruiz J.M. (2013). Hyperstability and Substrate Promiscuity in Laboratory Resurrections of Precambrian β -Lactamases. *Journal of the American Chemical Society*, 135(8), 2899-2902.

Roy R., Rahman M.S., Raynie D.E. (2020). Recent advances of greener pretreatment technologies of lignocellulose. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 3, 100035, 1-17.

Saito T., Isogai A. (2004). TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose. The Effect of Oxidation Conditions on Chemical and Crystal Structures of the Water-Insoluble Fractions. *Biomacromolecules*, 5(5), 1983-1989.

Sango C., Kaur P., Bhardwaj N.K., Sharma J. (2018). Bacterial cellulase treatment for enhancing reactivity of pre-hydrolysed kraft dissolving pulp for viscose. *3 Biotech*, 8(6), 1-7.

Silva T.A.L., Zamora H.D.Z., Varão L.H.R., Prado N.S., Baffi M. A., Pasquini D. (2017). Effect of Steam Explosion Pretreatment Catalysed by Organic Acid and Alkali on Chemical and Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. *Waste and Biomass Valorization*. 9, 2191-2201.

Sindhu R., Binod P., Pandey A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology*, 199, 76-82.

Singhania R.R., Dixit P., Patel A.K., Giri B.S., Kuo C.H., Chen C.W., Di Dong C. (2021). Role and Significance of Lytic Polysaccharide Monooxygenases (LPMOs) in Lignocellulose Deconstruction. *Bioresource Technology*, 335, 125261, 1-9.

Singhvi M.S., Gokhale D.V. (2019). Lignocellulosic biomass: Hurdles and challenges in its valorization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 9305-9320.

Syverud K., Pettersen S.R., Draget K., Chinga-Carrasco G. (2014). Controlling the elastic modulus of cellulose nanofibril hydrogels—scaffolds with potential in tissue engineering. *Cellulose*, 22(1), 473-481.

Tanaka T., Ono D., Takinami K. (1981). Method of producing improved by lipase. US Patent 4,275,011.

- Teow Y.H., Kam L.M., Mohammad A.W. (2018). Synthesis of cellulose hydrogel for copper (II) ions adsorption. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(4), 4588-4597.
- Thoresen M., Malgas S., Mafa M.S., Pletschke B.I. (2021) Revisiting the phenomenon of cellulase action: Not all endo-and exo-cellulase interactions are synergistic. *Catalysts*, 11, 170, 1-13.
- Tokin R., Ipsen J.Ø., Westh P., Johansen K.S. (2020). The synergy between LPMOs and cellulases in enzymatic saccharification of cellulose is both enzyme- and substrate-dependent. *Biotechnology Letters*, 42, 1975-1984.
- Usmani Z., Sharma M., Awasthi, A.K., Lukk, T., Tuohy, M.G., Gong, L., Nguyen-Tri, P., Goddard, A.D., Bill, R.M., Nayak, S.C., Gupta, V.K. (2021). Lignocellulosic biorefineries: The current state of challenges and strategies for efficient commercialization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 148, 111258, 1-14.
- Valenzuela S.V., Valls C., Schink V., Sánchez D., Roncero M.B., Diaz P., Martínez J., Pastor F.I.J, (2018). Differential activity of lytic polysaccharide monooxygenases on celluloses of different crystallinity. Effectiveness in the sustainable production of cellulose nanofibrils. *Carbohydrate Polymers*, 207, 59-67.
- Vallejos M.E., Olmos G.V., Taleb M.C., Felissia F.F., Ehma N.V., Peresin S.M., Area M. C., Maximino M.G. (2022) Dissolving pulp from eucalyptus sawdust for regenerated cellulose products. *Cellulose* 29, 4645-4659.
- Valls C., Pastor F.I.J., Roncero M.B., Vidal T., Diaz P., Martínez J., Valenzuela S.V. (2019). Assessing the enzymatic effects of cellulases and LPMO in improving mechanical fibrillation of cotton linters. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 161, 1-14.
- Van Dyk J.S., Pletschke B.I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1458-1480.
- Wan C., Li Y. (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1447-1457.

Winarsih S., Siskawardani D.D. (2020). Hydrolysis of corncobs using a mixture of crude enzymes from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* for bioethanol production. *Energy Reports*, 6, 256-262.

Wong L.C., Leh C.P., Goh C.F. (2021). Designing cellulose hydrogels from non-woody biomass. *Carbohydrate Polymers*, 264, 118036, 1-17.

Wu D., Wei Z., Mohamed T.A., Zheng G., Qu F., Wang F., Zhao Y., Song C. (2022). Lignocellulose biomass bioconversion during composting: Mechanism of action of lignocellulase, pretreatment methods and future perspectives. *Chemosphere*, 286, 131635, 1-15.

Xin D., Blossom B.M., Lu X., Felby C. (2022). Improving Cellulases Hydrolytic Action: An Expanded Role for Electron Donors of Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Cellulose Saccharification. *Bioresource Technology*. 346, 126662, 1-6.

Zabed H., Sahu J.N., Suely A., Boyce A.N., Faruq G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475-501.

Zhou X., Kovaleva E.S., Wu-Scharf D., Campbell J.H., Buchman G.W., Boucias D.G., Scharf M.E. (2010). Production and characterization of a recombinant beta-1,4-endoglucanase (glycohydrolase family 9) from the termite *Reticulitermes flavipes*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 74(3), 147-162.