



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales - Programa de Magíster en Ciencias Forestales

**EVALUACIÓN DEL USO DE CÓCTELES ENZIMÁTICOS
COMERCIALES EN LA CONVERSIÓN DE PULPA GRADO
PAPEL A PULPA GRADO SOLUBLE DE EUCALIPTO
PARA ELABORACIÓN DE HIDROGELES DE CELULOSA**

SEBASTIÁN IGNACIO VIDAURRE VILLALOBOS
CONCEPCIÓN – CHILE
2023

Profesor Guía: Regis Teixeira Mendonça
Dpto. de Manejo de Bosques y Medio Ambiente
Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

EVALUACIÓN DEL USO DE CÓCTELES ENZIMÁTICOS COMERCIALES EN LA CONVERSIÓN DE PULPA GRADO PAPEL A PULPA GRADO SOLUBLE DE EUCALIPTO PARA ELABORACIÓN DE HIDROGELES DE CELULOSA

Comisión evaluadora:

Regis Teixeira Mendonça (Profesor guía)
Ingeniero Químico, Dr.

Ángela Machuca Herrera (Profesora co-guía)
Bioquímica, Dra.

Adriane Maria Ferreira Milagres (Comisión evaluación)
Ingeniera en Alimentos, Dra.

María Oriana Salazar Aguirre (Comisión evaluación)
Bioquímica, Dra.

Director de Postgrado

Regis Teixeira Mendonça
Ingeniero Químico, Dr.

Decano Facultad de Ciencias Forestales

Eugenio Sanfuentes VS.
Ingeniero Forestal, Dr.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mi familia, mamá, papá y hermana por todo el apoyo incondicional, la paciencia y el cariño en todo momento, saber que siempre puedo contar con ustedes me ayudó a cruzar este camino más tranquilo. A mis 3 cachorras que me motivaban a terminar rápido cada semestre para poder volver a la casa.

A mi profesor guía, Dr. Regis Teixeira Mendonça, por su orientación académica, ayuda y comprensión durante todo el magíster.

A la Dra. Ángela Machuca Herrera por su gran disposición ante cada duda, permitirme aprender tanto en su laboratorio y por su ayuda para poder realizar mi pasantía.

A la Profa. Dra. Adriane Ferreira Milagres, del Laboratorio de Bioquímica (EEL/USP) por la supervisión y orientación durante la pasantía de investigación.

Al Proyecto Fondecyt Regular 1200504 por el financiamiento de esta tesis de magister.

A la Facultad de Ciencias Forestales y a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción por la Beca de Articulación Pregrado-Postgrado y por el financiamiento para realizar pasantía de investigación en la Escuela de Ingeniería de Lorena, Universidad de Sao Paulo (EEL/USP), Lorena/SP, Brasil.

A todo ese grupito de personas que se convirtió en la familia universitaria, en especial a Camila por todo el apoyo en este año, diversión, comprensión y cariño. A Leandro por tantos años de amistad, risas y distracciones cuando más las necesitaba.

A todas las y los colegas del Laboratorio de Recursos Renovables del Centro de Biotecnología con los que coincidí en este tiempo, especialmente al equipo de Química de la Madera.

RESUMEN

La pulpa celulósica obtenida desde madera mediante procesos de pulpaje es la materia prima para la producción de pulpa grado papel y pulpa grado soluble. La pulpa grado soluble es utilizada para la obtención de diferentes derivados biodegradables como hidrogeles de celulosa. Actualmente se utilizan tratamientos químicos para la conversión de pulpa grado papel a pulpa grado soluble y como posibles alternativas más sustentables, se han probado diferentes tratamientos enzimáticos. Este trabajo evaluó el efecto de tratamientos enzimáticos en pulpa Kraft blanqueada de *Eucalyptus* utilizando los cócteles comerciales Cellic CTec2 y Cellic CTec 3, y celulasa monocomponente de *Trichoderma reesei*; comparando su efecto en la pulpa grado soluble obtenida desde una purificación química y activación con hidrólisis ácida. El objetivo consistió en obtener pulpas grado soluble de calidad superior mediante los tratamientos enzimáticos, para elaborar en base a ellas hidrogeles de celulosa y estudiar su capacidad de adsorción del colorante azul de metileno. Para esto se determinó la viscosidad intrínseca, contenido de carboxilos y la estructura supramolecular de las pulpas tratadas, así como la densidad aparente, porosidad y capacidad de adsorción de los hidrogeles en diferentes concentraciones de azul de metileno. Tras la aplicación de los preparados enzimáticos comerciales (10 y 100 U) se logró obtener pulpa grado soluble a partir de pulpa grado papel, y posteriormente la elaboración de hidrogeles de celulosa. El análisis de las propiedades químicas y supramoleculares de las pulpas de eucalipto tratadas y de los hidrogeles, evidenció una mejora al aplicar una dosis de 10 U de endoglucanasas de *T. reesei* (EGTr), presentando un mayor contenido de carboxilos (0,1391 mmol/g), una disminución del 17,61% de la viscosidad intrínseca y un grado de cristalinidad de 85,6 en el caso de las pulpas. En el caso de los hidrogeles, éstos presentaron una menor densidad (0,0437 g/cm³), una mayor porosidad (96,92%) y capacidad máxima de adsorción de azul de metileno (22,90 mg/g) que los resultantes de las pulpas tratadas con los multicomponentes enzimáticos Cellic CTec (16,15 a 20,43 mg/g) y con el tratamiento químico con extracción alcalina e hidrólisis ácida (17,06 mg/g). El preparado de endoglucanasas de *T. reesei* representa la mejor alternativa entre los cócteles enzimáticos comerciales probados para reemplazar los tratamientos químicos en las condiciones utilizadas en este estudio, para la modificación de pulpa de eucalipto destinada a la elaboración de diversos biomateriales, como los hidrogeles con capacidad de adsorción de colorantes.

ABSTRACT

Cellulosic pulp obtained from wood through pulping processes is the raw material for paper grade and dissolving pulp production. Dissolving pulp is used to obtain different biodegradable derivatives such as cellulose hydrogels. Currently, chemical treatments are used for the conversion of paper grade pulp to dissolving grade pulp but more sustainable alternatives as enzymatic treatments have also been tested. This work evaluated the effect of enzymatic treatments on bleached *Eucalyptus* Kraft pulp using the commercial cocktails Cellic CTec2 and Cellic CTec 3, and a monocomponent cellulase from *Trichoderma reesei*; comparing their effect on dissolving grade pulp obtained from a purification and activation with acid hydrolysis. The objective was to obtain soluble grade pulps of superior quality by means of the enzymatic treatments, to elaborate cellulose-based hydrogels and their adsorption capacity of methylene blue dye. For this purpose, the intrinsic viscosity, carboxyl content and supramolecular structure of the treated pulps were determined, as well as the bulk density, porosity, and adsorption capacity of the hydrogels in different concentrations of methylene blue. After the application of the commercial enzyme preparations (10 and 100 U), it was possible to obtain soluble grade pulp from paper grade pulp, and subsequently the elaboration of cellulose hydrogels. The analysis of the chemical and supramolecular properties of the treated eucalyptus pulps and hydrogels showed an improvement when applying a dose of 10 U of endoglucanases from *T. reesei* (EGTr), presenting a higher carboxyl content (0.1391 mmol/g), a 17.61% decrease in intrinsic viscosity and a degree of crystallinity of 85.6 in pulps. These hydrogels showed a lower density (0.0437 g/cm³), higher porosity (96.92%) and maximum methylene blue adsorption capacity (22.90 mg/g) as compared with those from pulps treated with Cellic CTec enzymatic multicomponents (16.15 to 20.43 mg/g) and from the chemical treatment by alkaline extraction and acid hydrolysis (17.06 mg/g). The preparation of endoglucanases from *T. reesei* represents the best alternative among the commercial enzyme cocktails tested to replace chemical treatments under the conditions used in this study, for the modification of eucalyptus pulp intended for the elaboration of biomaterials, such as hydrogels with dye adsorption capacity.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
LISTADO DE ABREVIATURAS	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Madera y celulosa	2
1.2. Pulpas celulósicas desde madera	3
1.2.1. Obtención de pulpa grado soluble	5
1.3. Tratamientos enzimáticos	6
1.3.1. Cócteles enzimáticos	6
1.3.2. Enzimas hidrolíticas	7
1.3.3. Enzimas accesorias	9
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo general	11
3.2. Objetivos específicos	11
4. METODOLOGÍA	12
4.1. Pulpa Kraft blanqueada	12
4.2. Tratamientos enzimáticos de la pulpa	12
4.3. Determinación de actividades enzimáticas en cócteles comerciales	13
4.4. Tratamiento químico	14
4.5. Caracterización de pulpas tratadas	14
4.6. Preparación de hidrogeles de celulosa	15
4.7. Caracterización de los hidrogeles	16
4.8. Análisis estadísticos	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1. Caracterización enzimática de cócteles comerciales	19
5.2. Caracterización de pulpas tratadas	20
5.3. Caracterización de hidrogeles de celulosa	27
6. CONCLUSIONES	36
7. BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Viscosidad intrínseca de pulpas de <i>Eucalyptus</i> tratadas química (CCE) y enzimáticamente, con complejos multicomponentes (CCT) y monocomponente (EGTr).	22
Figura 2. Contenido de carboxilos en de pulpas de <i>Eucalyptus</i> tratadas química (CCE) y enzimáticamente, con complejos multicomponentes (CCT) y monocomponente (EGTr).	23
Figura 3. Difractogramas DRX de pulpas de <i>Eucalyptus</i> tratadas química (CCE) y enzimáticamente, con complejos multicomponentes (CCT) y monocomponente (EGTr).	26
Figura 4. Correlación entre la densidad aparente y la porosidad de los hidrogeles obtenidos de pulpas de <i>Eucalyptus</i> tratadas química (CCE) y enzimáticamente, con complejos multicomponentes (CCT) y monocomponente (EGTr).	28
Figura 5. Correlación entre la densidad aparente de los hidrogeles y el contenido de carboxilos en pulpas de <i>Eucalyptus</i> tratadas química (CCE) y enzimáticamente, con complejos multicomponentes (CCT) y monocomponente (EGTr).	29
Figura 6. Capacidad de adsorción de hidrogeles de celulosa obtenido desde pulpa tratada después de 48 h de adsorción. Concentración de MB: 200 mg/L, volumen de solución: 10 mL, pH de la solución: 9,0, temperatura: 25°C.	30
Figura 7. Correlación entre densidad aparente (g/cm ³) (a), porosidad (%) (b) con la capacidad de adsorción de MB (200 mg/L) en hidrogeles de celulosa obtenidos desde pulpas de <i>Eucalyptus</i> tratadas química (CCE) y enzimáticamente, con complejos multicomponentes (CCT) y monocomponente (EGTr).	31
Figura 8. Ajustes no lineales con isothermas de Langmuir y Freundlich para la adsorción de MB en hidrogeles de eucalipto. a) Tratamientos enzimáticos con cócteles Cellic, b) Tratamientos enzimáticos con EGTr y químico CCE5+HA. Concentración de MB: 25, 55, 90, 130 y 200 mg/L, volumen de solución: 10 mL, pH de la solución: 9,0, temperatura: 25°C.	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades determinadas de enzimas glucohidrolasas y oxidativas y contenido total de proteínas en cócteles comerciales	19
Tabla 2. Índice aparente de cristalinidad (CrI) calculado mediante el método de deconvolución (CrIa) y método de Segal (CrIb), y tamaño lateral de cristales (L_{200}) de pulpas de eucalipto	24
Tabla 3. Densidad y porosidad de hidrogeles preparados con pulpas tratadas química y enzimáticamente	27
Tabla 4. Parámetros de modelos de isotermas Langmuir y Freundlich de adsorción de MB en hidrogeles de celulosa obtenidos de pulpa tratada de eucalipto	32

LISTADO DE ABREVIATURAS

- 2,6-DMP: 2,6-dimetoxifenol
- ABTS: 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
- BG: Enzimas β -glucosidasas
- CBH: Enzimas Celobiohidrolasas
- CCE: Extracción cáustica en frío
- CCT2: Cellic CTec2
- CCT3: Cellic CTec3
- CED: Solución de cuprietilendiamina
- CMC: Carboximetilcelulosa
- DNS: Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
- EG: Enzimas endoglucanasas
- EGTr: Endo-glucanasas de *T. reesei*
- EX: Enzimas endoxilanasas
- HCE: Extracción cáustica caliente
- CrI: Índice aparente de cristalinidad
- L₂₀₀: Tamaños lateral de cristales
- LAC: Enzimas lacasas
- LPMO: Monooxigenasas Líticas de Polisacáridos
- MB: Azul de metileno
- NMMO: N-óxido de N-metilmorfolina
- ρ : Densidad volumétrica
- P : Porosidad
- PER: Enzimas peroxidasas
- pNPG: p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido
- q_e : Capacidad de adsorción de hidrogeles
- S: Capacidad de absorción de agua
- UI: μ moles de producto liberado por min

1. INTRODUCCIÓN

La pulpa grado papel y la pulpa grado soluble celulósica son dos de los principales productos del proceso de conversión química de la madera. La primera abarca sobre el 90% de la producción de pulpas a nivel mundial, y se utiliza para la elaboración de papeles y cartones. La pulpa grado soluble se diferencia por su pureza, pues presenta un contenido de celulosa superior al 98-99% (Sixta, 2006; Yang et al., 2019; Arce et al., 2020), y es utilizada para la fabricación de diferentes derivados de celulosa tales como celulosa regenerada, ésteres y éteres de celulosa, y otros productos a base de celulosa, como celulosa nano y microcristalina (Chen et al., 2016). Sin embargo, para la producción de estas pulpas también se utilizan métodos químicos y/o mecánicos que son altamente demandantes de energía o de reactivos químicos, por lo que, en vista de mejorar o sustituir estos procesos por alternativas ambientalmente amigables se han evaluado alternativas biológicas como el uso de enzimas hidrolíticas (Jegannathan & Nielsen, 2013; Chapman et al., 2018), que permiten purificar y activar la celulosa para la elaboración de derivados desde pulpa soluble.

Existen antecedentes del uso de enzimas hidrolasas en procesos de conversión de pulpa grado papel a pulpa grado soluble, como xilanasas y celulasas, que han demostrado tener la capacidad de disminuir el contenido de hemicelulosas y aumentar la reactividad, respectivamente, con mayor eficiencia en procesos combinados con extracción alcalina (Köpcke et al., 2010; Duan et al., 2017; Zhao et al., 2017). De la misma forma se ha estudiado el uso de enzimas auxiliares como las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO) en procesos de hidrólisis y sacarificación en residuos agrícolas como alternativa para aumentar la actividad de las enzimas glucohidrolasas mediante una acción sinérgica (Du et al., 2018; Hu & Saddler, 2018).

En base a lo anterior, se presentan antecedentes bibliográficos para proponer el uso de los cócteles enzimáticos Cellic CTec2 (CCT2) y Cellic CTec3 (CCT3) constituidos por una combinación de enzimas hidrolíticas y enzimas auxiliares y, el preparado monocomponente de endo-glucanasas de *Trichoderma reesei* (EGTr), para avanzar hacia el objetivo de disminuir las concentraciones de reactivos químicos aplicados, además de mejorar las propiedades de la pulpa grado soluble obtenida a partir de madera de eucalipto para la generación de derivados y biomateriales de celulosa.

1.1. Madera y celulosa

La madera está compuesta por celulosa, hemicelulosa, lignina y extraíbles, y se puede dividir en 2 grandes grupos, maderas de especies latifoliadas y maderas de especies coníferas. En una comparación entre ambas, las maderas de latifoliadas tienen un contenido de lignina entre el 23-30%, mientras que las maderas de coníferas entre 26-34%, y un contenido de celulosa del 38-49% y 40-45% respectivamente (Rowell, 2012), además, el volumen de fibras es de 60-80% en maderas de latifoliadas y un 90-95% en maderas de coníferas (Chen et al., 2016). Son importantes estas cualidades de las fibras pues determinan diferentes propiedades de la celulosa que se obtendrá de cada una, como la accesibilidad y la reactividad (Ibarra et al., 2010).

Existe una creciente demanda por las maderas de latifoliadas, prefiriendo la celulosa de fibras más cortas por su mayor disponibilidad en el mercado, rendimiento y crecimiento de las especies, entre otras características. Las especies de *Eucalyptus* en particular han tomado gran importancia dentro del mercado de la madera de latifoliadas y la producción de pulpa grado papel y grado soluble (Kumar & Christopher, 2017), en gran parte debido a su rápido crecimiento, calidad de la madera y alto rendimiento en las pulpas obtenidas, especialmente en plantaciones comerciales de Sudamérica (Turnbull, 1999; Köpcke et al., 2010; Gomes et al., 2015; Carrillo et al., 2017). Debido a estas características, los eucaliptos representan las especies de madera de latifoliadas más plantadas en el mundo, y son ampliamente utilizadas para la obtención de derivados de celulosa (Cetinkol et al., 2012; Carrillo-Varela et al., 2018).

La celulosa es un componente estructural de las paredes celulares de las plantas, y corresponde al polímero renovable más abundante del mundo. Posee una estructura ordenada de cadenas de D-glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos β -1,4 que forman una red rígida y compacta de cadenas largas no ramificadas. Su estructura repetitiva está formada por dímeros de celobiosa, D-glucopiranosil- β -1,4-D-glucopiranososa, y esta a su vez, por dos anillos β -D-glucopiranososa rotados entre sí (Pérez & Samain, 2010; Heinze, 2016).

La compleja organización de la celulosa es el resultado de la interacción entre grupos hidroxilos libres presentes entre las cadenas lineales del polisacárido, que forman enlaces intra e intermoleculares, los cuales, dependiendo de su ordenación, formarán la celulosa nativa (celulosa I) o la disposición antiparalela en estado regenerado (celulosa II) (Heinze,

2016). La celulosa I es aparentemente el polimorfo más abundante en el estado natural de las plantas, y puede convertirse en celulosa II mediante un tratamiento con NaOH, siendo esta más compacta y entrelazada (Koch, 2006; Carrillo et al., 2018).

Actualmente, las principales materias primas para obtener celulosa para la producción de derivados son la pulpa grado soluble de madera y el algodón (Li et al., 2018), pero el algodón tiene un alto costo y, debido a la demanda estimada para el año 2030, se pronostica que su producción no cubrirá las necesidades del mercado en los próximos años (Haemmerle, 2011; Liu et al., 2016). Por estas razones la producción de pulpa ha aumentado, especialmente en China, país que a su vez es el principal consumidor en el mundo, y que presenta un creciente interés en aumentar la eficiencia y disminuir el costo de la producción de pulpa grado soluble desde madera (Mateos-Espejel et al., 2013; Chen et al., 2016).

1.2. Pulpas celulósicas desde madera

La pulpa obtenida desde madera tiene 2 posibles aplicaciones, la pulpa grado papel para la producción de papel y cartón, y la pulpa grado soluble usada para la obtención de fibras regeneradas y derivados de celulosa (Sixta et al., 2013; Kumar & Christopher, 2017).

La pulpa grado papel es con diferencia la más producida en el mundo, con un porcentaje sobre el 90% de la producción total de pulpa, donde el método más usado para su obtención es el proceso Kraft (Hutterer et al., 2017; Bajpai, 2018). Mediante este proceso se obtiene una pulpa con resistencia superior que es utilizada para fabricar papel, bolsas, cartón Kraft, papel de periódico y otros productos, dependiendo del tipo de madera del que proviene la pulpa (Sixta, 2006).

La pulpa grado soluble es un grado especial de pulpa que destaca por su pureza y alto contenido de α -celulosa (90-99%), un bajo contenido de hemicelulosas y solo trazas de lignina, resinas u otras impurezas (Sixta, 2006; Yang et al., 2019; Arce et al., 2020). Es usada como materia prima para la producción de diferentes derivados de la celulosa, como la celulosa regenerada, utilizada en la elaboración de textiles; éteres y ésteres de celulosa, acetatos de celulosa, celulosa nanofibrilada e hidrogeles de celulosa (Sixta et al., 2013; Zhang et al., 2018). Los hidrogeles son redes de celulosa que tienen la capacidad de absorber grandes volúmenes de agua u otros solventes sin disolverse en el proceso, debido a su

contenido de enlaces de hidrógeno y alta cristalinidad, resultantes de la interacción de las fibras de celulosa (Carrillo-Varela et al., 2022). Pueden ser utilizados como agentes adsorbentes para retener sustancias contaminantes presentes en soluciones acuosas, como azul de metileno (MB), tetraciclina, iones Cu^{2+} y Hg^{2+} , entre otros, y resultan una excelente alternativa para el tratamiento de agua debido a su fácil separación y recuperación (Akter et al., 2021; Lei et al., 2022; Yang et al., 2022). Su elaboración puede ser llevada a cabo mediante la disolución y coagulación utilizando líquidos iónicos, N-óxido de N-metilmorfolina (NMMO) o con un sistema disolvente de LiOH/urea, entre otros métodos (Li et al., 2009; Shen et al., 2019; Zhang et al., 2019; Yang et al., 2022).

En base al biomaterial que se producirá, se busca que la pulpa grado soluble cumpla con determinados niveles deseados de reactividad, viscosidad, polimorfos de celulosa y hemicelulosa residual. La reactividad es un parámetro para evaluar el estado y potencial uso de la pulpa y depende en gran medida de la madera y los tratamientos utilizados en la producción (Carrillo-Varela et al., 2018; Ferreira et al., 2020). Se relaciona con la capacidad de los grupos hidroxilos libres de la celulosa para reaccionar con reactivos químicos dependiendo del tipo de derivado a producir. Se ve afectada por las características estructurales de la celulosa, accesibilidad, tamaño de los cristales, grado de cristalinidad, contenido de hemicelulosas, apertura de poros/huecos, entre otras (Ibarra et al., 2009; Carrillo-Varela et al., 2019; Ferreira et al., 2020). La viscosidad es determinada por el largo de las cadenas de celulosa de la pulpa, o su grado de polimerización (DP), y está relacionada con la distribución del peso molecular y, es junto a la reactividad, uno de los parámetros claves para determinar la procesabilidad de la pulpa para obtener derivados de celulosa (Borrega et al., 2018). Los valores estándares de viscosidad deben ser controlados en un rango entre los 400–550 mL/g, y para la producción de viscosa de alta calidad, entre los 200-300 mL/g (Köpcke et al., 2008), pues valores más bajos pueden causar problemas de filtración, y valores más altos reducen el rendimiento (Duan et al., 2015a; Yang et al., 2019). Con relación a los polimorfos de la celulosa, debe ser lo más pura posible en contenido de celulosa I, pues la celulosa II presenta una orientación antiparalela que forma de estructuras más compactas, debido a la formación de nuevos enlaces entre los grupos hidroxilos (Köpcke et al., 2010; Arnoul-Jarriault et al., 2015). La celulosa II se forma producto de la mercerización, dificultando la accesibilidad, pero incrementando la termo estabilidad de la

pulpa (Kumar & Christopher, 2017). El contenido de hemicelulosas residuales en la pulpa afecta a la morfología y accesibilidad, dificultando la acetilación de los grupos hidroxilos libres al competir y bloquear a la celulosa, provocando la disminución de la reactividad. El valor ideal para la pulpa grado soluble corresponde a un contenido de hemicelulosas menor al 4% (Roselli et al., 2014; Bajpai, 2018).

1.2.1. Obtención de pulpa grado soluble

Comercialmente los 2 procesos químicos más utilizados para la obtención de pulpa grado soluble son el sulfito ácido (AS) y la pre-hidrólisis Kraft (PHK), donde AS era el proceso predominante con un porcentaje cercano al 60% de la producción total de pulpa, pero en los últimos años en gran parte del mundo, sobre todo en China, se usa PHK para producir el 78% de la pulpa grado soluble (Kumar & Christopher, 2017; Bajpai, 2018). La pre-hidrólisis Kraft es un método comercial que mediante una etapa previa al pulpaje, con agua o vapor de agua, elimina una gran cantidad de las hemicelulosas de la madera, para luego realizar el pulpaje Kraft que removerá la lignina, seguido de un proceso de blanqueo que resultará en la obtención de una pulpa grado soluble con un alto porcentaje de celulosa (Behin et al., 2008; Dou & Tang, 2017; Bajpai, 2018).

La pulpa grado soluble, en comparación a la pulpa grado papel, tiene un costo mayor de producción, explicado por un menor rendimiento en fibra y proceso de blanqueo utilizado, pero un mayor valor de mercado comparado con la pulpa grado papel (Mateos-Espejel et al., 2013; Sixta et al., 2013; Arnoul-Jarriault et al., 2015). El *upgrade* de pulpa grado papel a pulpa grado soluble también es una alternativa que ha sido evaluada (Wang et al., 2014; Yang et al., 2019). Los requisitos para el *upgrade* a pulpa grado soluble comienza con la remoción de hemicelulosas residuales, que corresponde a la etapa de purificación, y el aumento de la accesibilidad, que se traduce en el incremento de la reactividad, corresponde a la etapa de activación (Ceccherini et al., 2021).

Para la remoción de hemicelulosas pueden utilizarse tratamientos químicos de prehidrólisis como parte del proceso de PHK, o post tratamientos con extracción cáustica en frío o caliente (CCE o HCE), pues resultado del proceso Kraft se obtiene una pulpa con un contenido de hemicelulosas cercano al 20% y debe disminuir a un valor entre 1-4% (Arnoul-Jarriault et al., 2015; Bajpai, 2018). El problema del uso de estos reactivos químicos es que a

concentraciones mayores de álcalis (> 8%) se produce un cambio en la red cristalina de la celulosa, resultando en la transformación de celulosa I a celulosa II, disminución de la reactividad, α -celulosa, brillo y viscosidad de la pulpa (Goluguri et al., 2012; Duan et al., 2016; Kumar & Christopher, 2017). Me parece raro esto, pues es justamente por eso que se hace la mercerización para textiles. Para solucionar este inconveniente se han evaluado alternativas de pretratamientos enzimáticos con xilanasas y celulasas para la remoción de hemicelulosas, aumentar la reactividad y controlar la viscosidad, al disminuir el grado de polimerización de la pulpa (Yang et al., 2019).

1.3. Tratamientos enzimáticos

Los tratamientos enzimáticos de la biomasa han surgido como una alternativa a los procesos químicos convencionales que tienen como consecuencia un gran coste energético y de agua, además de residuos que ocasionan un riesgo medioambiental alto, lo que limita su uso de cara al futuro (Hu et al., 2018). Los tratamientos con enzimas forman parte de las herramientas biotecnológicas utilizadas en las industrias desde hace décadas, donde se aplican para la obtención de alimentos, textiles, producción de alcoholes, etc. (Toushik et al., 2017). Mientras que, para el tratamiento de biomasa lignocelulósica son ampliamente utilizados para la sacarificación enzimática, transformando residuos agroindustriales en biocombustibles. Este proceso conlleva la hidrólisis completa de la biomasa hasta azúcares simples, y debe ser llevado a cabo por una variedad de enzimas lignocelulósicas que trabajan en conjunto para degradar las paredes celulares vegetales, pues se ha comprobado que, para numerosos fines, un solo tipo de enzima no es capaz de deconstruir la compleja estructura de la biomasa vegetal (Lopes et al., 2018). Es por esto por lo que se ha trabajado en la elaboración de cócteles enzimáticos, que, mediante la adición de enzimas de distintos tipos y especificidades, muestren una acción coordinada y sinérgica que permita degradar o modificar la biomasa más eficientemente.

1.3.1. Cócteles enzimáticos

Para aprovechar este efecto sinérgico en la industria, los cócteles enzimáticos son utilizados en la producción de alimentos y bebestibles, textiles, variadas aplicaciones biotecnológicas y para la producción de biocombustibles, pulpa o papel (Ibarra et al., 2010; Zhou et al., 2019).

Comercialmente, se pueden encontrar preparados enzimáticos con diferentes tipos y cantidades de enzimas, de acuerdo con las indicaciones de los proveedores sobre sus productos. Los cócteles multicomponente se basan en la importancia de combinar diferentes enzimas para aumentar su eficiencia y eficacia catalítica, de forma similar a como los microorganismos heterótrofos como los hongos degradan complejos biopolímeros en la naturaleza, mediante la secreción de múltiples proteínas y enzimas, dependiendo de las condiciones medioambientales en las que se encuentran (Filiatrault-Chastel et al., 2021). En estos cócteles multicomponente, se adiciona una enzima principal, a la que se agregan varias otras enzimas de igual o diferente acción catalítica, que idealmente puedan actuar colaborativamente con la enzima principal, aumentando la catálisis (Lopes et al., 2018). Por el contrario, los preparados comerciales monocomponente, teóricamente deberían estar compuestos solo por una enzima principal, indicada por el proveedor, generalmente obtenidas de microorganismos específicos, muchas veces recombinantes (Filiatrault-Chastel et al., 2021). En este caso, al tratarse de una sola enzima aumenta la especificidad del tratamiento que puede realizarse para degradar o modificar un determinado sustrato, pero la enzima se verá sometida a distintas condiciones como la accesibilidad al sustrato, la presencia de otros polisacáridos, y los derivados liberados por la misma enzima que pueden causar su inactivación y, por ende, la detención de su actividad catalítica (Scott et al., 2016; Cheng et al., 2020; Forsberg et al., 2020).

Se han estudiado las interacciones sinérgicas entre enzimas hidrolasas y enzimas accesorias para la degradación de materiales lignocelulósicos, y sacarificación para producción de biocombustibles y otros derivados de lignocelulosa (Cheng et al., 2020; Zerva et al., 2020; Bernardi et al., 2021). En busca de optimizar el funcionamiento de los cócteles enzimáticos, se puede, por ejemplo, adicionar enzimas no hidrolíticas, suplementar con surfactantes u otros reactivos químicos, realizar una caracterización para determinar las condiciones óptimas de funcionamiento, entre otras modificaciones (Lopes et al., 2018).

1.3.2. Enzimas hidrolíticas

La hidrólisis de celulosa requiere la acción combinada y sinérgica de las celulasas, enzimas catalogadas como glucohidrolasas y que incluyen a las endoglucanasas (EG), celobiohidrolasas (CBH) y β -glucosidasas (BG) que actúan en diferentes zonas de la

estructura de la celulosa (Dadwal et al., 2019). Las EG actúan escindiendo los enlaces β -1,4-glucosídicos de los polisacáridos y oligosacáridos presentes en zonas internas de menor compactación (zonas amorfas) de la celulosa, las CBH hidrolizan los extremos expuestos de las cadenas, liberando disacáridos de celobiosa. La presencia de este disacárido en el medio inhibe la actividad de las celulasas, por lo que las BG hidrolizan la celobiosa y otros oligosacáridos, en monómeros de glucosa (Kim et al., 2014; Barbosa et al., 2020).

Las endoxilanasas (EX) catalizan la endohidrólisis de los enlaces 1,4- β -D-xilosídicos del xilano. El xilano es el componente principal de un complejo entre diferentes carbohidratos poliméricos que forman las hemicelulosas (Collins et al., 2005). Este complejo incluye generalmente, además de xilano; manano, xiloglucanos, glucomanano, galactoglucomanano y arabinogalactano (Dadwal et al., 2019; Kim et al., 2016) La presencia de xilano, restringe significativamente la accesibilidad a la celulosa dificultando su hidrólisis (Li et al., 2017; Hu & Saddler, 2018), por lo que se han implementado las xilanasas en diferentes cócteles enzimáticos, pues estas enzimas pueden actuar removiendo selectivamente los xilanos superficiales, aumentando la actividad hidrolítica de las celulasas en sustratos lignocelulósicos (Song et al., 2016).

Las enzimas xilanasas se han aplicado como pretratamiento antes de aplicar un CCE para la purificación de pulpa Kraft, disminuyendo la concentración necesaria de reactivos químicos aplicados (<7%) (Kaur et al., 2016; Yang et al., 2019). Además, la utilización de celulasas en un tratamiento enzimático, seguida de xilanasas, aumenta la reactividad de la pulpa Kraft de eucalipto desde un 35-36% a un 71%, con una disminución simultánea de la viscosidad entre 120 y 150 mL/g, en comparación a un tratamiento solo con endoglucanasas (Ibarra et al., 2009). Sin embargo, la combinación más eficiente en términos de calidad de pulpa es la aplicación de xilanasas seguida de un tratamiento con álcali, y finalmente un tratamiento con celulasas, incrementando los valores de reactividad de Fock de 31,1% a 66,2%, y disminuyendo la viscosidad de 725 a 290 mL/g, debido a la disminución del grado de polimerización de la pulpa, compensando los efectos del tratamiento con álcali (Köpcke et al., 2008; Ibarra et al., 2010; Duan et al., 2015b). Estos resultados relevan el papel de las xilanasas en combinación con endoglucanasas, dependiendo del objetivo del tratamiento enzimático.

1.3.3. Enzimas accesorias

Con la finalidad de seguir mejorando la eficiencia de los procesos que buscan degradar biomasa lignocelulósica para su conversión en biocombustibles u otros derivados, se han incluido en los tratamientos enzimáticos las enzimas accesorias, como las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO), y se ha demostrado su efecto sinérgico con enzimas xilanasas y celulasas (Guo et al., 2017; de Gouvêa et al., 2018; Du et al., 2018; Hu & Saddler, 2018).

Las LPMO son enzimas monocúpricas muy estudiadas en la última década por su actividad oxidativa, y por actuar despolimerizando oxidativamente los polisacáridos, provocando ruptura de los enlaces glucosídicos. Presentan un ion cobre (II) en su sitio de unión al sustrato junto a dos residuos de histidina y uno de tirosina, formando una estructura plana que se une al sustrato (Ipsen et al., 2021). Para el funcionamiento del mecanismo catalítico redox, las LPMO necesitan la presencia de oxígeno (O_2) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como co-sustrato para su activación, siendo este último de mayor eficiencia, al permitir acelerar la reacción incluso en condiciones anaeróbicas (Müller et al., 2018; Costa et al., 2020); y un donador de electrones como ácido ascórbico o ácido gálico, entre otros (Stepnov et al., 2021). Debido a su actividad con O_2 y H_2O_2 como co-sustrato, las LPMO pueden tener actividad monooxigenasa o peroxidasa, respectivamente. Para la reacción monooxigenasa se necesitan 2 electrones y 2 protones para completar cada ciclo catalítico, lo que equivale a la escisión de un enlace glucosídico. La reacción peroxidasa, que utiliza H_2O_2 como sustrato necesita 1 electrón para la reducción de LPMO-Cu-(II) a LPMO-Cu-(I) (Forsberg et al., 2020).

Estas enzimas están actualmente clasificadas como enzimas de actividad auxiliar (AA), entre las familias AA9-AA11 y AA13-AA16, por la base de datos de las enzimas activas en carbohidratos (CAZy; <http://www.cazy.org>) (Levasseur et al., 2013). Son catalogadas como enzimas redox que participan en la degradación de carbohidratos y que presentan actividad en sustratos como xilano, xiloglucanos, hemicelulosas, almidón, quitina y celulosa cristalina (Moreau et al., 2019; Valenzuela et al., 2019; Ipsen et al., 2021; Shi et al., 2021). Debido a la capacidad catalítica de las LPMO, se ha estudiado su efecto sinérgico en combinación con las enzimas hidrolíticas antes descritas, comprobando un aumento de la actividad hidrolítica

sobre diferentes tipos de sustratos lignocelulósicos (de Gouvêa et al., 2019; Bala et al., 2020; Zhou et al., 2020; Li et al., 2021).

Si bien se han estudiado las interacciones sinérgicas entre enzimas hidrolasas y accesorias para la degradación de materiales lignocelulósicos, sacarificación para producción de biocombustibles y producción de otros derivados de lignocelulosa (Ibarra et al., 2010; Zhou et al., 2019; Cheng et al., 2020; Zerva et al., 2020; Bernardi et al., 2021), no se han realizado ensayos enfocados a la conversión de pulpa grado papel a pulpa grado soluble usando cócteles de enzimas. Existen antecedentes del uso de xilanasas y celulasas, en conjunto y separadas, en el proceso de conversión a pulpa grado soluble, pero para aumentar la accesibilidad y eficiencia de estas enzimas se deben combinar con procedimientos químicos o mecánicos (Ibarra et al., 2010; Duan et al., 2016; Yang et al., 2019).

En este trabajo se evaluará el efecto de dos cócteles comerciales Cellic CTec2 y Cellic CTec3, y del preparado monocomponente de celulasas de *Trichoderma reesei* en el proceso de conversión de pulpa grado papel a pulpa grado soluble, mediante la caracterización química y estructural de la pulpa resultante, la elaboración y caracterización de hidrogeles regenerados en base a las mismas (como modelo de biomaterial celulósico), con la respectiva comparación con un tratamiento químico utilizado para la conversión de pulpa grado papel a pulpa grado soluble de eucalipto. Los antecedentes proporcionados por los proveedores y la literatura indican que los cócteles del tipo Cellic CTec contienen enzimas del tipo EG, BG, EX y CBH, diferenciándose principalmente por la adición de enzimas tipo LPMO en el caso del cóctel Cellic CTec3 (Zhai et al., 2018; Pereira & Arantes, 2020; Bondancia et al., 2022)

2. HIPÓTESIS

El uso de preparados enzimáticos comerciales multicomponentes (cócteles tipo Cellic CTec) permite la obtención de pulpas celulósicas con propiedades iguales o superiores a las pulpas obtenidas con un preparado enzimático monocomponente y tratamiento químico durante la conversión de pulpa grado papel a pulpa grado soluble de eucalipto. Particularmente, la pulpa tratada con los cócteles enzimáticos presentará mayor contenido de carboxilos y valores similares de viscosidad, mientras que los hidrogeles obtenidos a partir de estas pulpas presentarán niveles similares de densidad, porosidad, y una mayor capacidad de adsorción del colorante azul de metileno.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Determinar el efecto de la aplicación de cócteles enzimáticos comerciales multi- (Cellic CTec) y monocomponentes (endoglucanasa de *T. reesei*) durante el proceso de conversión de pulpa grado papel a pulpa grado soluble de eucalipto para la producción de hidrogeles de celulosa.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar las propiedades químicas y supramoleculares de la pulpa grado soluble obtenida desde los tratamientos enzimáticos.
- Comparar el efecto de los tratamientos con cócteles enzimáticos con el proceso químico para la conversión de pulpa grado papel a pulpa grado soluble.
- Obtener hidrogeles a partir de las pulpas tratadas química y enzimáticamente, y determinar su capacidad de adsorción.

4. METODOLOGÍA

4.1. Pulpa Kraft blanqueada

Se utilizó pulpa Kraft blanqueada de fibra corta que presenta un contenido del 80% de *Eucalyptus nitens* y 20% *E. globulus*, proporcionadas por CMPC celulosa, Región del Biobío (Chile). Estas pulpas fueron previamente caracterizadas por sus propiedades químicas, estructura supramolecular y viscosidad intrínseca (Carrillo-Varela et al., 2022).

4.2. Tratamientos enzimáticos de la pulpa

La pulpa Kraft blanqueada fue sometida a diferentes tratamientos enzimáticos con complejos comerciales multicomponente Cellic CTec2 (CCT2) (Novozyme Inc., Curitiba, Brasil) y Cellic CTec 3 (CCT3) (Novozyme Inc., Curitiba, Brasil), y con el complejo monocomponente (endocelulasa) de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.). Los cócteles Cellic corresponden a preparados líquidos viscosos, mientras que el complejo de *T. reesei* corresponde a un preparado sólido en polvo. Previo a la realización de los tratamientos, los complejos enzimáticos comerciales fueron debidamente caracterizados, y para ello se utilizó una preparación diluida 50 veces para el caso de los cócteles Cellic, y una preparación de 1 mg/mL de la endo-glucanasa de *T. reesei* (EGTr).

Los tratamientos enzimáticos se realizaron usando una cantidad adecuada de pulpa Kraft de *Eucalyptus* con una consistencia del 3% en buffer citrato-fosfato 0,05 M (pH 6,0), y el volumen adecuado de cada cóctel enzimático por gramo de pulpa, correspondiente a 10 y 100 UI de actividad de EG. Los tratamientos se realizaron en matraces de vidrio y se incubaron a 50°C durante 1 h, en agitación a 120 rpm. Los tratamientos control incluyeron las mismas condiciones de incubación, exceptuando la adición de enzimas. Se realizó el filtrado de las pulpas, luego se detuvo la reacción enzimática por adición de agua hervida y se lavaron las pulpas con 1 L de agua destilada. Se determinaron sus porcentajes de humedad y almacenaron en refrigeración (4°C) para realizar los posteriores análisis de caracterización. Los azúcares reductores se determinaron a partir de los filtrados de las pulpas tratadas, mediante el método del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

4.3. Determinación de actividades enzimáticas en cócteles comerciales

Tanto en los complejos multicomponentes como en el monocomponente fueron determinadas las actividades enzimáticas del tipo endo-celulasa o endo-glucanasa (EG), que debería ser la enzima principal predominante en los complejos comerciales usados aquí, como también la actividad de las enzimas que podrían estar presentes en los preparados como exo-celulasas o cellobiohidrolasa (CBH), β -glucosidasa (β G) y endo-xilanasas (EX), además se investigó la presencia de enzimas oxidativas del tipo lacasa (LAC), peroxidasa (PER) y LPMO. Las actividades enzimáticas fueron expresadas en μ moles de producto liberado por min (UI). La concentración de proteínas (mg/mL) de los preparados comerciales se determinó mediante el método Bradford, leyendo la absorbancia a 595 nm (Bradford, 1976). Todas las mediciones de absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro UV-Vis (UV-1280, Shimadzu Corporation, Kioto, Japón), y los valores informados corresponden al promedio de 3 réplicas.

Las actividades EG, CBH y EX se midieron utilizando como sustratos enzimáticos carboximetilcelulosa (CMC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.) al 0,44% (Tanaka et al., 1981), Avicel (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.) al 1% (Kumar & Parikh et al., 2015), y xilano de *birchwood* (Sigma, St. Louis, EE. UU.) al 1% (Bailey et al., 1992), respectivamente. El buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5.0) se utilizó para la determinación de las EG, CBH y EX, incubando a 50°C, durante 30, 60 y 5 min, respectivamente. Luego de la reacción enzimática, los azúcares reductores liberados fueron determinados a través del método del DNS, midiendo la absorbancia a 540 nm (Miller, 1959). La actividad β G se determinó utilizando *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.) al 0,1% como sustrato y buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5,0), a 50°C durante 30 min. El producto liberado (*p*-nitrophenol) se determinó midiendo la absorbancia a 410 nm (Tan et al., 1987).

Para la determinación de las actividades LAC y PER se utilizó 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) 2 mM como sustrato enzimático y buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5,0), en presencia de H₂O₂ 5 mM para el caso de PER. La cinética de oxidación del sustrato se siguió durante 5 min en el espectrofotómetro a 420 nm (Bourbonnais y Paice, 1990). Para el caso de la actividad LPMO se utilizó 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) 10 mM como sustrato, buffer fosfato 116 mM (pH 7,5), en presencia de H₂O₂ 20

mM. En este caso la cinética de oxidación del 2,6-DMP se siguió durante 5 min a 469 nm en el espectrofotómetro (Breslmayr et al., 2018). Los valores de absorbancia se transformaron en actividad de cada enzima utilizando el coeficiente de absortividad molar de los sustratos (36.000 M⁻¹ cm⁻¹ para ABTS, 53.200 M⁻¹ cm⁻¹ para 2,6-DMP).

4.4. Tratamiento químico

Se aplicó un tratamiento de extracción cáustica fría (CCE) a la pulpa blanqueada para la remoción de hemicelulosas residuales, utilizando NaOH al 5% y 10% (p/v), durante 1 h a 30°C en baño de agua, a una consistencia de pulpa del 10%. Posteriormente, las pulpas fueron tratadas con ácido con H₂SO₄ 0,03 M a 80°C por 1 h, utilizando una consistencia del 3%, para reducción de la viscosidad intrínseca. Una vez concluido el tratamiento, las pulpas tratadas se filtraron y lavaron con abundante agua destilada, y luego se almacenaron en refrigeración (4°C) para su caracterización (Carrillo-Varela et al., 2019).

4.5. Caracterización de pulpas tratadas

Determinación de grupos carboxilos

El contenido de grupos carboxilos de las pulpas fue determinado por el método de valoración conductimétrica (Saito e Isogai, 2004). Se dispersaron 0,3 g de masa seca en 50 mL de agua destilada y 5 mL de NaCl 0,01 M. Se ajustó el pH de la solución a 2,5 mediante la adición de HCl 0,1 M, y se realizó la valoración añadiendo 0,1 mL/min de NaOH 0,01 M hasta alcanzar el pH 11, registrando los valores de conductividad utilizando un conductímetro (HI 2315, HANNA Co., Seúl, Corea del Sur). Las curvas obtenidas muestran 2 puntos de cambio, donde A indica la neutralización del ácido fuerte (HCl), y B representa la titración del ácido débil (grupos carboxilos). El contenido de grupos carboxilos se calculó utilizando la siguiente ecuación (1):

$$\text{Carboxyl content} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) = \frac{[V(\text{NaOH}) * C(\text{NaOH})]}{g} \quad (1)$$

Donde V (NaOH) es el volumen en mL de la solución NaOH usada para la titración entre los puntos A y B, C (NaOH) es la concentración de la solución de NaOH (M), y g es el peso seco utilizado para la reacción.

Viscosidad intrínseca

La viscosidad intrínseca fue calculada midiendo el tiempo de eflujo de la pulpa disuelta en una solución de cuprietilendiamina (CED) diluida, según la norma TAPPI T230 om-99. Se utilizaron 0,1 g de masa seca y se agitaron durante 10 min con 25 mL de agua. Se adicionaron 25 mL de CED y se mantuvo en agitación por 15 min, para luego medir el tiempo de eflujo en un viscosímetro capilar. Las mediciones se realizaron por triplicado y los valores se expresaron en mL/g.

Difracción de rayos X:

Para evaluar la cristalinidad de la celulosa y el tamaño de los cristales se aislaron 50 mg de pulpa tratada y se prensaron para formar pellets (Nam et al., 2016). Estos pellets fueron analizados en un difractor de rayos X D4 Endeavor (Bruker AXS, Alemania) con radiación Cu K α monocromática ($\lambda=0,154$ nm) a 40 kV y 20 mA. La intensidad fue medida en un rango de $5^\circ < 2\theta < 45^\circ$, con intervalos de lectura cada $0,02^\circ$. Cada muestra se analizó por duplicado. La curva fue ajustada con el software PeakFit (www.systat.com), el índice de cristalinidad aparente por DRX (CrI) de las muestras se calculó por áreas deconvolucionadas (CrI^a) y por alturas de pico según el método de Segal (CrI^b), según la metodología descrita por Carrillo-Varela et al. (2018; 2019).

4.6. Preparación de hidrogeles de celulosa

Los hidrogeles de celulosa fueron preparados utilizando las pulpas de *Eucalyptus* tratadas química y enzimáticamente, realizando la disolución en el solvente NMMO y usando agua como antisolvente. En vasos precipitados (50 mL) se mezclaron 0,42 g de pulpa seca con 25 mL del solvente NMMO/H₂O (50% p/p), adicionando una pequeña cantidad de propil galato como antioxidante. La mezcla se mantuvo en agitación a 90°C hasta obtener una solución transparente, luego fue enfriada hasta solidificarse, y se realizó la remoción del NMMO agregando agua destilada al vaso precipitado, cambiando el agua cada 8 h hasta su remoción completa. Los hidrogeles obtenidos se almacenaron en agua destilada hasta su caracterización.

4.7. Caracterización de los hidrogeles

Capacidad de adsorción de azul de metileno (MB)

La capacidad de adsorción de colorantes de los hidrogeles se determinó comparando las cantidades de colorante (MB) que los hidrogeles adsorben en las mismas condiciones. Se sumergieron 10 mg de masa seca de cada hidrogel en 10 mL de solución MB de distintas concentraciones: 25, 55, 90, 130 y 200 mg/L, a pH 9,0, con las cuales se elaboró una curva de calibración. El ensayo se realizó por triplicado en un agitador-incubador orbital (Edmund Bühler, Hechingern, Alemania) a temperatura ambiente y 120 rpm, por 48 h. La concentración de colorante adsorbido fue determinada mediante la diferencia entre las soluciones iniciales y en equilibrio de MB, los datos de absorbancia fueron medidos a una longitud de onda de 664 nm y se transformaron usando la curva de calibración.

La capacidad de adsorción de los hidrogeles se calculó con la siguiente ecuación (2):

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) V}{m} \quad (2)$$

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

Capacidad de absorción de agua de hidrogeles

La capacidad de absorción de agua (S) se midió mediante la siguiente ecuación:

$$S(\%) = \frac{W_{sw} - W_{dry}}{W_{dry}} \times 100 \quad (3)$$

Donde W_{sw} corresponde al peso del hidrogel secado superficialmente, luego de ser extraído desde el agua destilada; W_{dry} es el peso del hidrogel liofilizado (Sangtarashani et al. 2020; Tyshkunova et al. 2021).

Isotermas de adsorción

Se emplearon los modelos de isotermas de Langmuir y Freunlich para evaluar los datos obtenidos de los ensayos de adsorción de hidrogeles de celulosa utilizando 10 mg de masa seca en 5 soluciones de MB con diferentes concentraciones (25, 55, 90, 130 y 200 mg/L) a

pH 9,0. Los ensayos se realizaron por triplicado en un agitador-incubador orbital (Edmund Bühler, Hechingern, Alemania) a temperatura ambiente y 120 rpm, por 48 h.

La función no lineal para el modelo de isoterma de Langmuir se obtuvo mediante la siguiente ecuación (4):

$$q_e = q_{max} K_L \frac{C_e}{1 + K_L C_e} \quad (4)$$

Donde q_e y q_{max} son las capacidades de adsorción en equilibrio y al máximo (mg/g), respectivamente. C_e es la concentración de la solución de MB en el equilibrio (mg/L) y K_L es la constante de Langmuir (L/mg) (Langmuir, 1916).

La función no lineal para el modelo de isoterma de Freundlich se obtuvo mediante la siguiente ecuación (5):

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad (5)$$

Donde K_F es una constante que se relaciona con la capacidad de adsorción (L/mg) y n indica la intensidad de la adsorción (Freundlich, 1906; Carrillo-Varela et al., 2022).

Densidad volumétrica y porosidad de hidrogeles

La densidad volumétrica (ρ) de los hidrogeles se calculó mediante la siguiente ecuación (6):

$$\rho = \frac{m}{v} \quad (6)$$

Donde m y v son la masa (g) y el volumen (cm^3) del hidrogel, respectivamente (Tyshkynova et al., 2021).

La porosidad (P) se determinó mediante la siguiente ecuación (7):

$$P(\%) = \frac{(W_w - W_{dry})/\rho_{H_2O}}{(W_w - W_{dry})/\rho_{H_2O} + W_{dry}/\rho_c} \times 100 \quad (7)$$

donde W_w y W_{dry} equivalen a los pesos del hidrogel húmedo y liofilizado, respectivamente; ρ_{H_2O} es la densidad del agua (0.998 g/cm^3) y ρ_c es la densidad de la celulosa (1.528 g/cm^3) (Cai et al. 2008). Ambos parámetros se midieron por triplicado.

4.8. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software OriginPro 10.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE. UU). Se realizaron análisis de ANOVA para determinar diferencias significativas entre medias. Para determinar la homogeneidad de varianza se aplicó una prueba de Levene's (valor $p < 0,05$). El coeficiente de correlación de Pearson (r) se utilizó para analizar la correlación entre variables y se determinó la significación estadística del índice de Pearson (valor $p < 0,05$).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización enzimática de cócteles comerciales

Se determinó la actividad enzimática de EG en los cócteles comerciales Cellic CTec 2, Cellic CTec 3 y Celulasas de *T. reesei*. Estas actividades catalíticas de enzimas glucohidrolasas se utilizaron para establecer la dosis enzimática que se aplicaría en los tratamientos de pulpa de celulosa más adelante. La mayor actividad fue determinada a partir de las diluciones del cóctel CCT2 (301 UI/mL), seguido por el cóctel CCT3 (298 UI/mL) y luego por el cóctel de EGTr (0.95 UI/mg) (Tabla 1).

Tabla 1. Actividades de enzimas glucohidrolasas y oxidativas, y contenido total de proteínas en preparados comerciales multi- y monocomponente

Actividad (UI/mL)	CCT2	CCT3	EGTr
Endoglucanasas	301 ± 21	298 ± 11	0,95 ± 0,03
B-Glucosidasas	2169 ± 33	2195 ± 17	0,33 ± 0,004
Endoxilanasas	6693 ± 297	4093 ± 187	1,65 ± 0,02
Celobiohidrolasas	50 ± 8	44 ± 3	0,76 ± 0,36
LPMO	0,0193 ± 0,0007	0,0183 ± 0,0003	0,0021 ± 0,0003
Peroxidasas	s.a.	s.a.	s.a.
Lacasas	s.a.	s.a.	s.a.
Proteínas (mg/mL)	233 ± 5	335 ± 4	0,88 ± 0,03

s.a.: Sin actividad

Al realizar la caracterización completa se evidenció la presencia de las 4 enzimas hidrolíticas (EG, BG, EX y CBH) en los 3 cócteles, lo que permite comprobar que el cóctel EGTr realmente contiene más enzimas que solo EG que los proveedores informan, e incluso contiene enzimas tipo EX. Con esta información no puede corroborarse la presencia de enzimas EX en el monocomponente debido a que podría tratarse de enzimas EG con la capacidad de degradar hemicelulosas que podrían explicar esta actividad (Vlasenko et al., 2010; Hua et al., 2018). Dentro del grupo de enzimas hidrolíticas, el cóctel CCT2 presentó la mayor actividad en EX y CBH (6693 y 50 UI/mL, respectivamente), mientras que ambos

cócteles (CCT2 y CCT3) presentaron similar actividad de BG (2169 y 2195 UI/mL, respectivamente).

Dentro de las enzimas oxidativas medidas, las enzimas LPMO presentaron actividad en los 3 cócteles comerciales, siendo la única de este tipo presente, pues no se observó actividad de las enzimas PER y LAC, por lo menos utilizando ABTS como sustrato. Según los proveedores solo el CCT3 debería contener enzimas LPMO, aun así, se detectó una actividad mayor en CCT2 (0,0193 UI/mL), y su presencia en el preparado EGTr, sumado a las enzimas hidrolasas detectadas, permitiría considerarlo también como un multicomponente, más que como un monocomponente.

5.2. Caracterización de pulpas tratadas

Viscosidad intrínseca de las pulpas celulósicas

En la Figura 1 se presentan los resultados de viscosidad intrínseca de las pulpas blanqueadas luego del tratamiento con cócteles enzimáticos en dosis de 10 U y 100 U, y tratamiento CCE 5% e hidrólisis ácida diluida. El control de pulpa Kraft blanqueada mostró un valor de 642 mL/g, valor que se buscaba disminuir hasta un rango entre 400 y 550 mL/g, pues valores altos de viscosidad resultan en una mayor resistencia en la pulpa, dificultando la elaboración, por ejemplo, de hidrogeles como derivados de la pulpa tratada. Se observó que los tratamientos con una dosis de 10 U de CCT2 (540 mL/g) y EGTr (529 mL/g), además de los tratamientos químicos, CCE5+HA (530 mL/g), disminuyeron los valores de viscosidad significativamente respecto al control, pero no presentaron diferencias entre ellos ($0,3534 > p$). Se observó que al aumentar la dosis enzimática a 100 UI de EG el valor de la viscosidad disminuyó significativamente respecto al resto de tratamientos, mostrando la tendencia EGTr (424 mL/g) < CCT3 (435 mL/g) < CCT2 (471 mL/g). En base a esto se comprueba que existe una diferencia entre la aplicación de las 2 dosis enzimáticas probadas, obteniendo una mayor disminución con la dosis de 100 U de los 3 cócteles comerciales. De la misma forma, se obtuvo una mayor disminución de la viscosidad intrínseca de las pulpas tratadas con los cócteles (CCT2 100 U, CCT3 10 y 100 U, y EGTr 100 U), comparada con la obtenida luego de la aplicación del tratamiento químico. La disminución de la viscosidad en todos los tratamientos (enzimáticos o químico) respecto al control, se explica por el corte de las cadenas de celulosa disminuyendo su grado de polimerización. El ácido de estos tratamientos

produce la degradación de las zonas amorfas presentes en la pulpa, y dependiendo de la concentración de NaOH utilizada en el tratamiento de CCE, este será mayor o menor, pues esta concentración está relacionada con la eliminación de xilanos en la pulpa, polímeros que forman redes que protegen las cadenas de celulosa y dificultan su degradación (Palme et al., 2016). De la misma forma, en los tratamientos enzimáticos la disminución del largo de las cadenas de celulosa es causada por las endoglucanasas principalmente, utilizadas en diversos estudios como reemplazo del ácido en la etapa de activación para la disminución del grado de polimerización, actuando sobre las zonas amorfas de la celulosa (Miao et al., 2015; Virtanen et al., 2015). De forma similar al efecto del NaOH, otras enzimas se encargan de la degradación de xilanos en la pulpa, aumentando la accesibilidad hasta las cadenas de celulosa, lo que explica que al aumentar la dosis de enzima por gramo de pulpa se observe esta disminución en la viscosidad.

Contenido de grupos carboxilos de pulpas celulósicas

Las cargas en la pulpa proceden en principio de la etapa de pulpaje debido a la interacción con los reactivos del proceso Kraft, generando grupos con cargas negativas, como los ácidos hexenurónicos que se forman en las cadenas de xilano (Laine et al., 1996). El valor en la pulpa control medido fue de 0,080 mmol/g, coincidiendo con los valores registrados por Carrillo-Varela et al. (2022). La pulpa tratada con el cóctel CCT2 presentó una disminución significativa en el contenido de grupos carboxilos, pero no presentó diferencia entre las 2 dosis aplicadas ($0,5058 > p$) (Figura 2). Con el cóctel CCT3 se obtuvo un resultado similar, pues provocó en ambos casos una disminución significativa del contenido de carboxilos, pero evidenció diferencia entre las dosis aplicadas ($0,0365 < p$), siendo el tratamiento con 10 U el que provocó la mayor disminución. La disminución del contenido de carboxilos por parte de los cócteles Cellic podría deberse a la eliminación de xilanos por parte de las xilanasas presentes en el multicomponente, coincidiendo con el cóctel que presentó la mayor actividad de xilanasas por gramo de pulpa, lo que podría explicar la disminución en menor grado del contenido de carboxilos provocada por el cóctel CCT3.

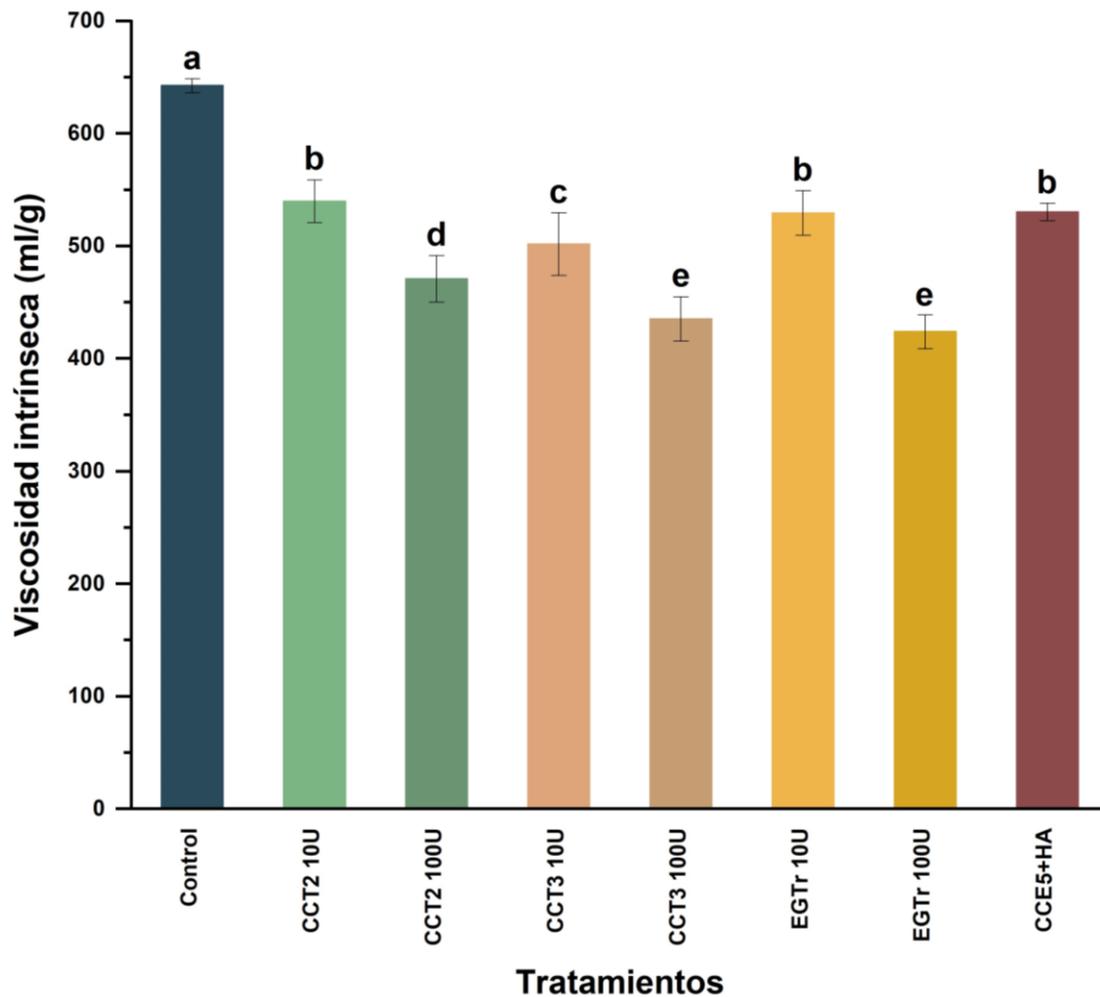


Figura 1. Viscosidad intrínseca de pulpas de *Eucalyptus* tratadas química (CCE) y enzimáticamente, con complejos multicomponentes (CCT) y monocomponente (EGTr). Los resultados son el promedio de 4 réplicas por tratamiento. Para discriminar entre medias se aplicó una prueba de LSD de Fisher luego de comprobar diferencias significativas por ANOVA ($0,05 > p$). Se aplicó una prueba de Levene's para verificar la homogeneidad de las varianzas ($0,1392 > p$).

El mayor contenido de carboxilos fue determinado de la pulpa tratada con 10 UI del cóctel EGTr (0,1391 mmol/g), resultado de una menor remoción de xilanos desde la pulpa, dada su menor actividad enzimática comparada con los cócteles Cellic, y un aumento de la accesibilidad por parte del complejo de celulastas.

Respecto al tratamiento químico, no presentó diferencia significativa con el control. Esto podría deberse a que la extracción con NaOH produjo una disminución del contenido de grupos carboxilos por el aumento en la remoción de xilanos, pero a su vez permite el acceso a las fibras de celulosa por parte del ácido en la etapa posterior, resultando en la transformación de los nuevos grupos hidroxilos disponibles en grupos sulfónicos que también forman parte de los grupos que otorgan carga negativa a la superficie y son detectados en la titulación conductimétrica (An et al., 2016).

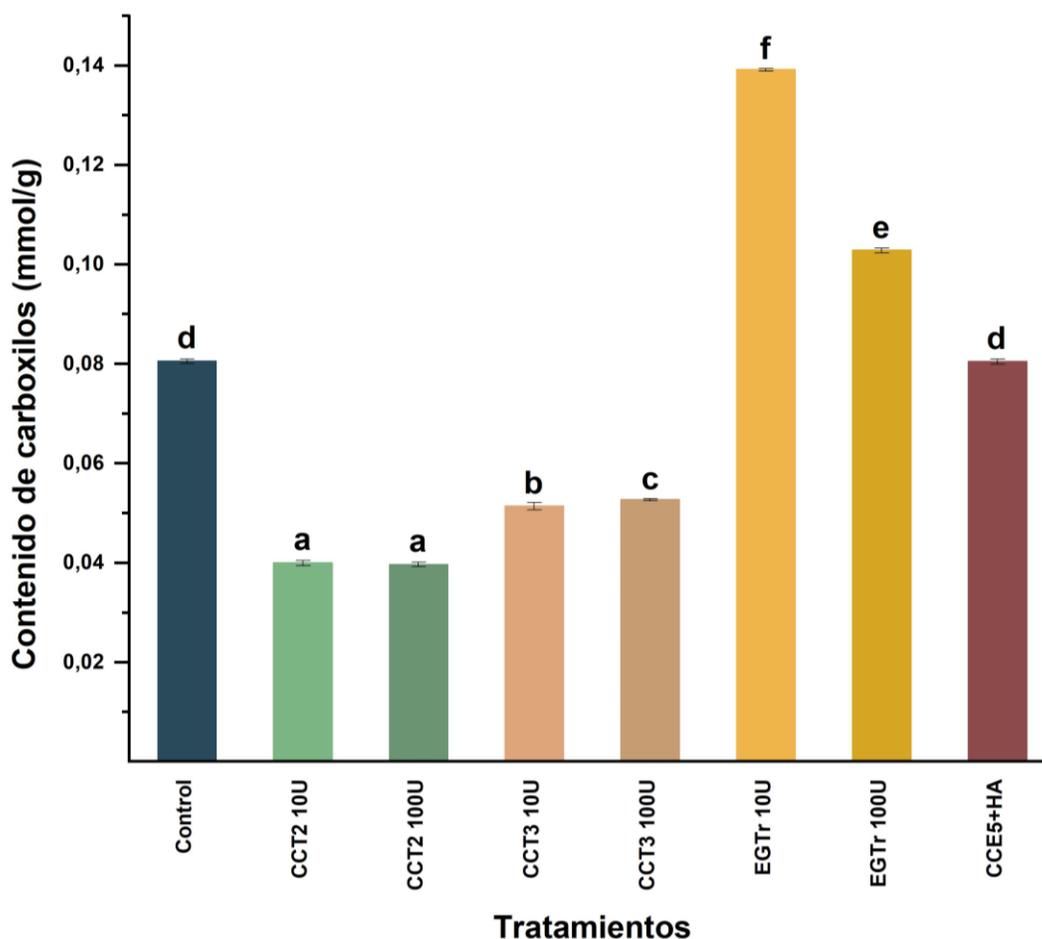


Figura 2. Contenido de carboxilos en de pulpas de *Eucalyptus* tratadas química (CCE) y enzimáticamente, con complejos multicomponentes (CCT) y monocomponente (EGTr). Los resultados son el promedio de 3 réplicas por tratamiento. Para discriminar entre medias se aplicó una prueba de LSD de Fisher luego de comprobar diferencias significativas por ANOVA ($0,05 > p$). Se aplicó una prueba de Levene's para verificar la homogeneidad de las varianzas ($0,8366 > p$).

Cristalinidad y tamaño de cristales de pulpas celulósicas

La Tabla 2 muestra los tamaños laterales de los cristales (L_{200}) determinados por la ecuación de Scherrer, y los grados de cristalinidad aparente obtenidos por los métodos de deconvolución (CrI^a) y de Segal (CrI^b) para las muestras de celulosa de *Eucalyptus*. Los valores obtenidos a partir del método Segal fueron mayores a los obtenidos de la deconvolución, tal como reportaron Carrillo et al. (2018) y Xu et al. (2013). Dado que solo se observó la presencia de celulosa I, pues ni los tratamientos enzimáticos ni el químico provocaron la conversión a celulosa II, el método Segal se utilizará para evaluar los porcentajes de cristalinidad (Nam et al., 2016). El control presentó un CrI del 83,9%, y se observó que todos los tratamientos provocaron un aumento significativo en la cristalinidad de las muestras tratadas química y enzimáticamente. El porcentaje más alto de cristalinidad se obtuvo del tratamiento químico CCE5+HA (91,5%), donde la etapa alcalina del tratamiento produjo la degradación de las hemicelulosas residuales en la pulpa, para luego eliminar principalmente la zona amorfa de la celulosa al aplicar el tratamiento ácido, resultando en el aumento del porcentaje de cristalinidad.

Tabla 2. Índice aparente de cristalinidad (CrI) calculado mediante el método de deconvolución (CrI^a) y método de Segal (CrI^b), y tamaño lateral de cristales (L_{200}) de pulpas de eucalipto

Tratamientos	CrI^a (%)		CrI^b (%)		L_{200} (nm)	
Pulpa kraft	59,2 ± 1	CD	83,9 ± 0,2	A	4,22 ± 0,04	A
CCT2 10 U	56,2 ± 0,9	A	87,4 ± 0,1	D	4,37 ± 0,03	B
CCT2 100 U	56,7 ± 0,5	AB	84,7 ± 0,7	B	4,75 ± 0,02	D
CCT3 10 U	61,6 ± 0,6	E	86,3 ± 1	C	4,57 ± 0,03	C
CCT3 100 U	57,9 ± 0,8	BC	85,5 ± 0,2	BC	4,85 ± 0,04	E
EGTr 10 U	59,8 ± 1	D	85,6 ± 0,4	C	5,05 ± 0,04	G
EGTr 100 U	58,3 ± 0,3	CD	86,3 ± 0,3	C	4,96 ± 0,02	F
CCE5 + HA	58,7 ± 1	CD	91,5 ± 0,3	E	4,90 ± 0,04	F

Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada columna ($p \leq 0,05$).

De la misma forma que la cristalinidad, el tamaño lateral de los cristales aumentó significativamente en todos los tratamientos, esto debido a que la eliminación de hemicelulosa residual y celulosa amorfa, además de la degradación de cristales de menor tamaño, aumentaron el tamaño promedio de los cristales en la pulpa (Carrillo-Varela et al., 2019).

Los cócteles Cellic se comportaron de manera similar en la pulpa, aumentando de forma significativa el tamaño lateral de los cristales al aumentar la dosis aplicada, siendo el multicomponente CCT3 el que causó el mayor aumento (4,85 nm). El mayor tamaño de cristales fue obtenido con el preparado EGTr con una dosis de 10 U (5,05 nm), sumado al aumento significativo del índice de cristalinidad se obtuvo un efecto similar al registrado por Ceccherini et al. (2021), luego de aplicar un tratamiento con endoglucanasas y enzimas tipo LPMO de *Trichoderma*, observaron un aumento de ambos parámetros. Según Hu et al. (2018) este resultado se explica debido a que las enzimas en conjunto modificaron la red de enlaces intramoleculares en la estructura de la celulosa tras la conversión de grupos luego de la oxidación causada principalmente por las LPMO, favoreciendo la actividad del complejo de celulasas.

Los patrones de DRX de la pulpa de Eucalipto tratada química y enzimáticamente se muestran en la Figura 3. Estos muestran los peaks de celulosa I asociados su respectivo plano cristalográfico, ubicados en los grados $14,8^{\circ}$ (0-10), $16,5^{\circ}$ (110) y $22,3^{\circ}$ (200) (French 2014), donde se puede comprobar la ausencia de celulosa II en las pulpas tratadas, pues no se registran reflexiones en los planos (1-10), (110), y (020) que son donde se suelen observar los peaks de celulosa II (Nomura et al., 2020).

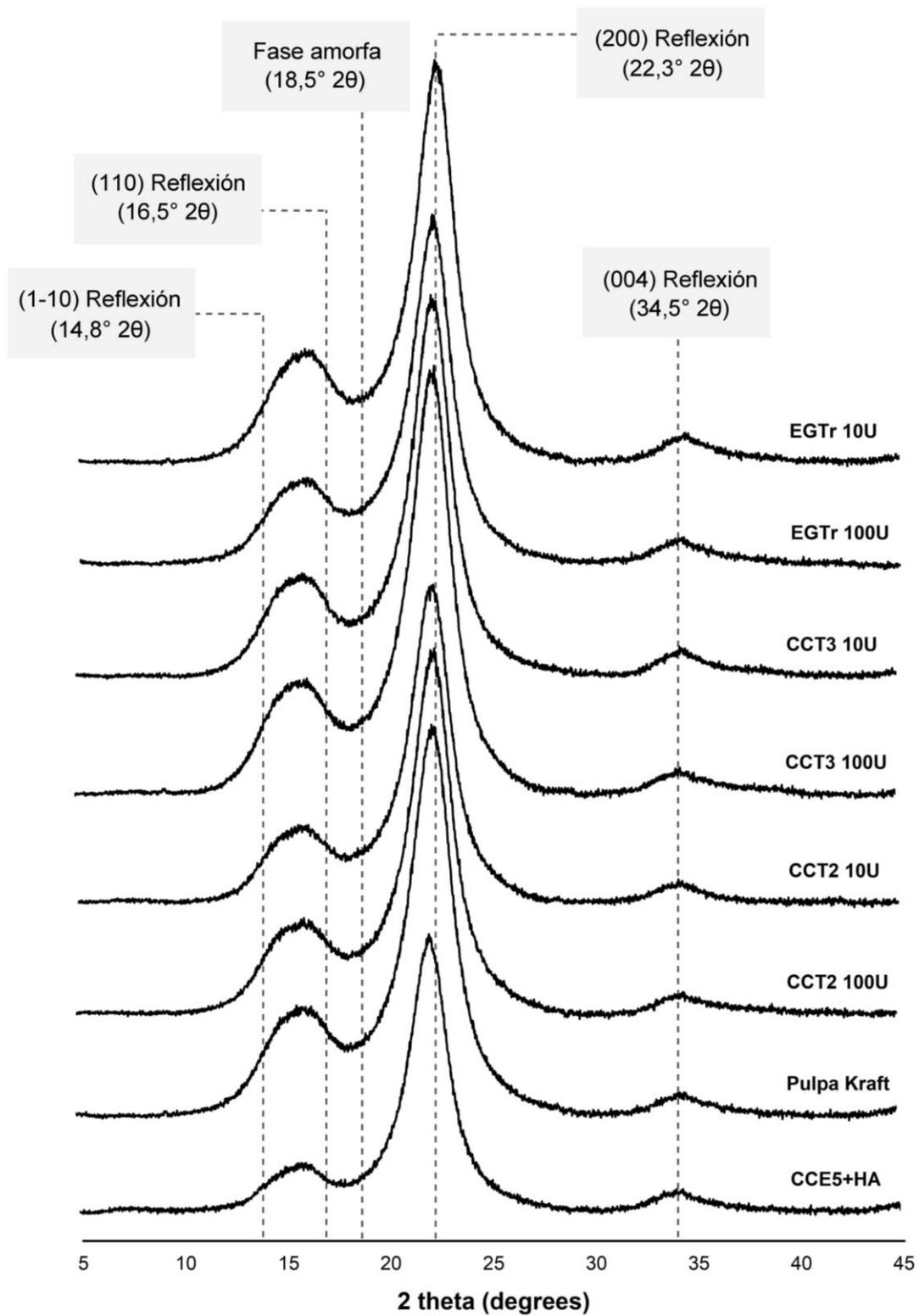


Figura 3. Difractogramas DRX de pulpas de *Eucalyptus* tratadas química (CCE) y enzimáticamente, con complejos multicomponentes (CCT) y monocomponente (EGTr).

5.3. Caracterización de hidrogeles de celulosa

Densidad aparente y porosidad de hidrogeles

En la tabla 3 se presentan los valores de densidad aparente y porosidad de los hidrogeles de celulosa preparados por disolución en NMMO. La densidad de los hidrogeles obtenidos a partir de las pulpas tratadas enzimáticamente varió desde 0,0437 hasta 0,0524 g/cm³, mientras que en los hidrogeles obtenidos de pulpas tratadas químicamente fue de 0,0519 g/cm³.

El valor de densidad está relacionado con la concentración de celulosa al preparar el hidrogel. Liebner et al. (2009), reportaron que la densidad de los aerogeles en las mismas condiciones de celulosa al 3% con NMMO/H₂O fue de 46-69 mg/cm³, coincidiendo con los rangos obtenidos en este estudio, excepto por los hidrogeles correspondientes al tratamiento con EGTr, que variaron de 0,0437 (10 U) a 0,0439 g/cm³ (100 U).

Tabla 3. Densidad y porosidad de hidrogeles preparados con pulpas tratadas química y enzimáticamente

Tratamientos	Densidad aparente (g/cm³)	Porosidad (%)
CCT2 10 U	0,0503 ± 0,0036 (B)	96,49 ± 0,35 (bc)
CCT2 100 U	0,0524 ± 0,0036 (BC)	96,43 ± 0,19 (ab)
CCT3 10 U	0,0505 ± 0,0015 (B)	96,45 ± 0,13 (ab)
CCT3 100 U	0,0522 ± 0,0026 (BC)	96,42 ± 0,30 (ab)
EGTr 10 U	0,0437 ± 0,0020 (A)	96,92 ± 0,12 (c)
EGTr 100 U	0,0439 ± 0,0017 (A)	96,67 ± 0,05 (bc)
CCE5 + HA	0,0519 ± 0,0054 (BC)	96,23 ± 0,43 (a)

Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada columna ($p \leq 0,05$).

Se reportó por Sescousse et al. (2011), que al igual que los valores de densidad, la porosidad está relacionada inversamente con la concentración de celulosa, por lo que al aumentar la densidad aparente del aerogel la porosidad debería disminuir. Esto se confirma en el presente caso, donde se obtuvo una correlación negativa significativa entre ambos parámetros tras

realizar una prueba de correlación de Pearson (Figura 4). Estos parámetros son importantes para evaluar la capacidad adsorbente del hidrogel, pues las características deseadas además del área superficial, selectividad, y reciclabilidad, son una baja densidad y alta porosidad (Foudazi et al., 2023).

En la Figura 5 se presenta el índice de correlación de Pearson entre el contenido de carboxilos en la pulpa tratada química y enzimáticamente, y los valores de densidad aparente de los hidrogeles regenerados a partir de las muestras, observando una fuerte correlación negativa entre estos parámetros. Si bien no existen antecedentes relacionando el contenido de carboxilos con la densidad de los hidrogeles, diversos estudios han reportado que al oxidar las pulpas de celulosa se obtienen materiales con mayor porosidad (Masruchin et al., 2015; Alam & Christopher, 2018; Hu et al., 2022), y dada la correlación presentada anteriormente entre la porosidad de los hidrogeles y su densidad aparente, el contenido de grupos carboxilos en la pulpa permite estimar el comportamiento de los valores de densidad en los hidrogeles previo a su elaboración.

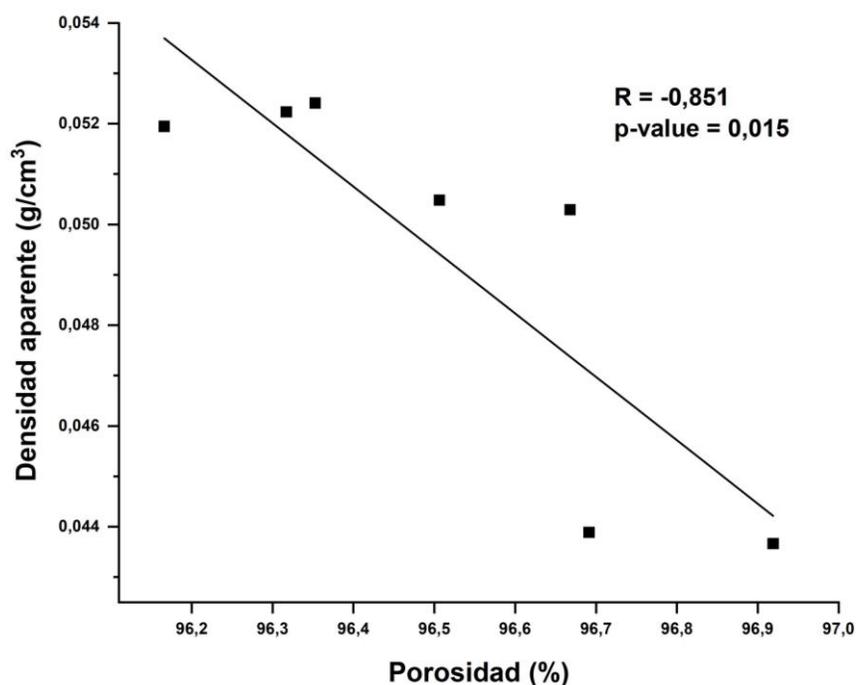


Figura 4. Correlación entre la densidad aparente y la porosidad de los hidrogeles obtenidos de pulpas de *Eucalyptus* tratadas química (CCE) y enzimáticamente, con complejos multicomponentes (CCT) y monocomponente (EGTr).

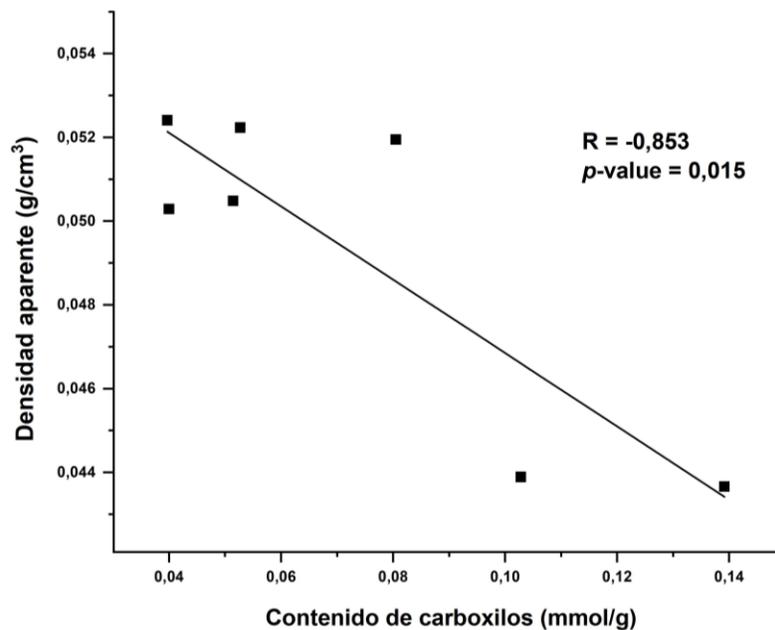


Figura 5. Correlación entre la densidad aparente de los hidrogeles y el contenido de carboxilos en pulpas de *Eucalyptus* tratadas química (CCE) y enzimáticamente, con complejos multicomponentes (CCT) y monocomponente (EGTr).

Capacidad de adsorción de azul de metileno (MB) e isothermas de adsorción

La capacidad de adsorción de MB de los hidrogeles obtenidos a partir de las pulpas de eucalipto tratadas química y enzimáticamente fue determinada utilizando una solución de MB de 200 mg/L (Figura 6). De acuerdo con los parámetros de densidad aparente y porosidad presentados anteriormente, se estimó que los hidrogeles con mayor capacidad de adsorción de MB corresponderían a los obtenidos del tratamiento con el monocomponente EGTr, coincidiendo con los hidrogeles con mayor porosidad y menor densidad, características que permiten una mayor difusión del MB en el área superficial del hidrogel (Ning et al., 2021). Esta estimación coincidió con los valores de q_e registrados, donde presentaron los valores más altos con una diferencia significativa del resto de tratamientos, 22,89 y 24,26 mg/g para la dosis de 10 U y 100 U de EGTr, respectivamente (Figura 6). Se evaluó la correlación entre los parámetros a partir de los valores registrados de q_e , densidad aparente y porosidad, obteniendo una fuerte correlación negativa de la capacidad de adsorción con la densidad aparente, y una fuerte correlación positiva con los porcentajes de porosidad de los hidrogeles

(Figura 7), lo que confirma que para obtener una mayor adsorción en los hidrogeles de celulosa es necesaria una estructura menos compacta y con una mayor superficie disponible.

En el caso de las muestras CCT2 y CCT3, el aumento de la dosis enzimática resultó en una disminución significativa de la capacidad de adsorción de los hidrogeles ($0,05 > p$), presentando en las dosis de 100 U los niveles de adsorción más bajos de los tratamientos enzimáticos (Figura 6). El tratamiento químico aplicado a las pulpas de eucalipto provocó el aumento de la densidad y la disminución de la porosidad en los hidrogeles de celulosa, lo que explica su menor capacidad de adsorción de MB. Carrillo-Varela et al. (2022) obtuvieron una mayor capacidad de adsorción en hidrogeles elaborados a partir de pulpas con un menor porcentaje de cristalinidad, lo que podría explicarse debido al efecto que tienen los cambios en la estructura supramolecular (grado de cristalinidad y tamaño lateral de cristales), deriva en una mayor compactación de los hidrogeles regenerados en la solución de NMMO, resultando en la menor capacidad adsorción obtenida.

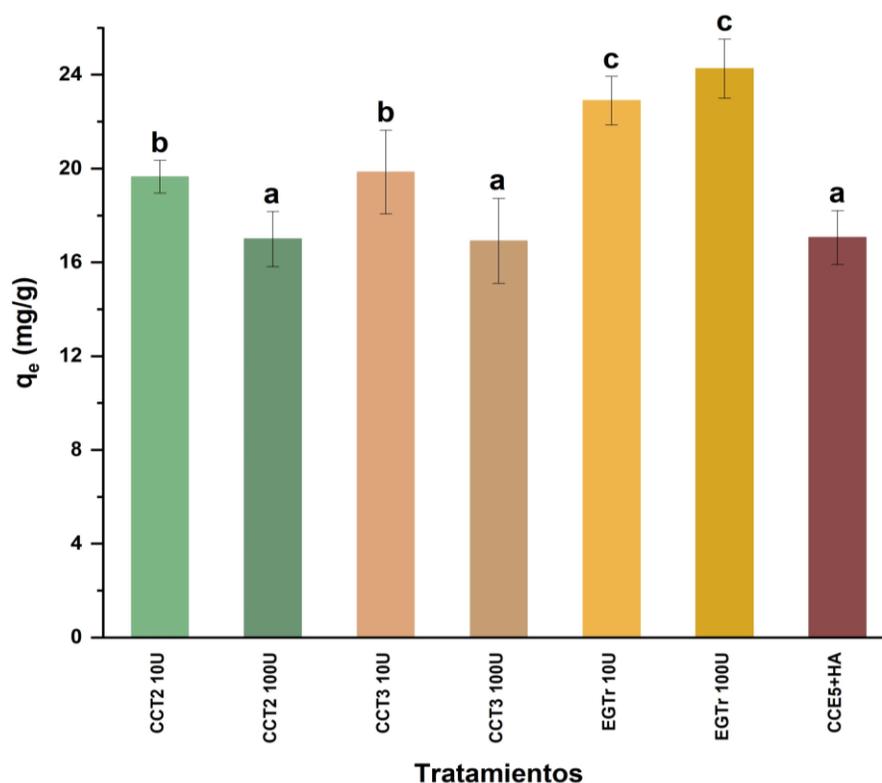


Figura 6. Capacidad de adsorción de MB (200 mg/L) de los hidrogeles de celulosa obtenidos desde pulpa tratadas de Eucalyptus tratadas química (CCE) y enzimáticamente (CCT y EGTr) después de 48 h de adsorción a pH 9,0 y 25°C. Los resultados son el promedio de 5

réplicas por tratamiento. Para discriminar entre medias se aplicó una prueba de LSD de Fisher luego de comprobar diferencias significativas por ANOVA ($0,05 > p$). Se aplicó una prueba de Levene's para verificar la homogeneidad de las varianzas ($0,3918 > p$).

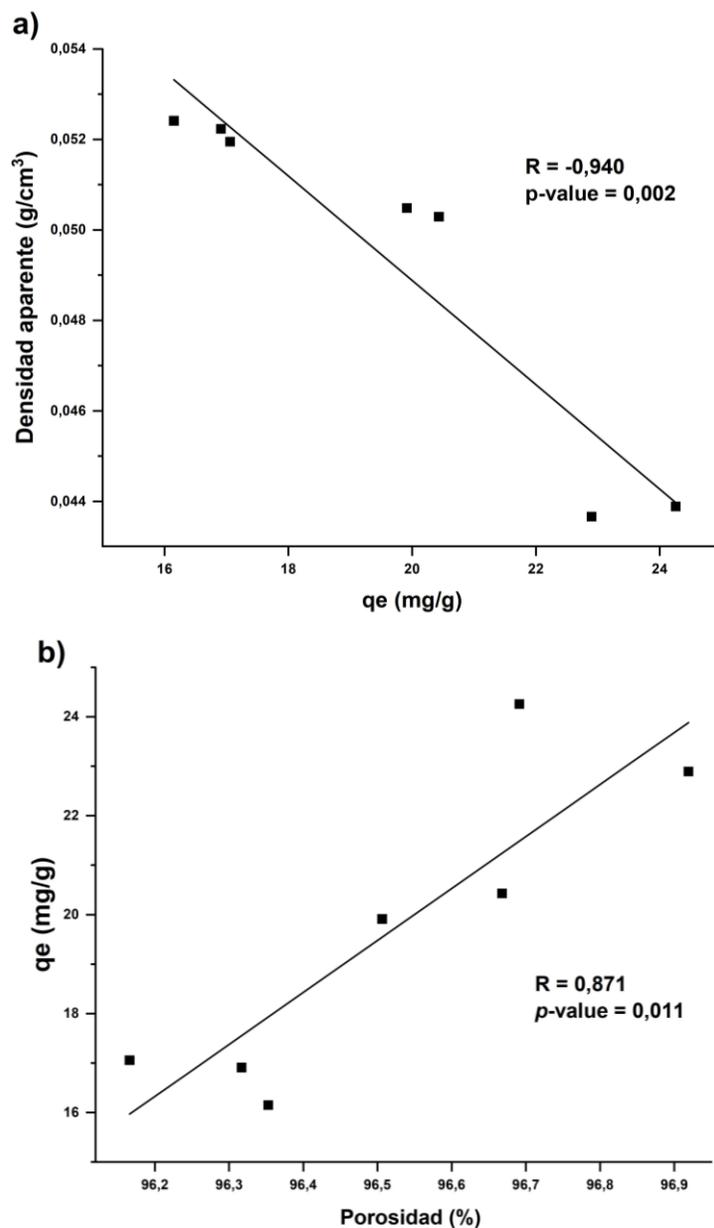


Figura 7. Correlación entre densidad aparente (g/cm^3) (a), porosidad (%) (b) con la capacidad de adsorción de MB (200 mg/L) en hidrogeles de celulosa obtenidos desde pulpas de *Eucalyptus* tratadas química (CCE) y enzimáticamente, con complejos multicomponentes (CCT) y monocomponente (EGTr).

Los modelos de isotermas de Langmuir y Freunlich sirven para describir como ocurre la adsorción de MB en los hidrogeles de eucalipto (Figura 8). El método de Langmuir supone que la adsorción ocurre de forma homogénea y en una capa de la superficie, además de suponer una energía constante de adsorción y la ausencia de interacción entre las moléculas adsorbidas. De forma contraria, el método de Freunlich supone la adsorción en múltiples capas, de forma no uniforme en la superficie (Foo & Hameed, 2010; Elmorsi, 2011; Kalam et al., 2021). Al comparar los valores de R^2 de ambos métodos (Tabla 4) se concluye que el modelo de isotermas de Langmuir se ajusta de mejor manera al comportamiento de los hidrogeles de celulosa, excepto por el tratamiento de 10 U del cóctel CCT3 que presentó un mejor ajuste al modelo de Freunlich (Tabla 4). El valor q_{\max} indica que los hidrogeles obtenidos desde la pulpa tratada enzimáticamente con 10 U de los cócteles Cellic y en ambas dosis del preparado EGTr presentan una mayor capacidad máxima de adsorción en comparación con el tratamiento químico, siendo mayor la capacidad al aplicar 10 U de enzima EG por gramo de pulpa, en los tres casos.

Tabla 4. Parámetros de modelos de isotermas Langmuir y Freundlich de adsorción de MB en hidrogeles de celulosa obtenidos de pulpa tratada de eucalipto

Tratamientos	Modelo Langmuir			Modelo Freundlich		
	q_{\max} (mg/g)	K_L (L/mg)	R^2	K_F (L/mg)	n	R^2
CCT2 10 U	20 ± 2	$0,062 \pm 0,013$	0,914	5 ± 2	4 ± 1	0,823
CCT2 100 U	$16,6 \pm 0,7$	$0,087 \pm 0,011$	0,971	6 ± 1	5 ± 1	0,905
CCT3 10 U	19 ± 1	$0,091 \pm 0,021$	0,905	7 ± 1	5 ± 1	0,907
CCT3 100 U	$18,6 \pm 0,8$	$0,040 \pm 0,003$	0,991	$3,4 \pm 0,7$	$3,2 \pm 0,5$	0,956
EGTr 10 U	26 ± 2	$0,054 \pm 0,008$	0,963	6 ± 2	4 ± 1	0,800
EGTr 100 U	23 ± 1	$0,081 \pm 0,013$	0,953	$7,0 \pm 0,8$	$4,1 \pm 0,5$	0,970
CCE5 + HA	$18,1 \pm 0,9$	$0,049 \pm 0,005$	0,981	$3,9 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,4$	0,976

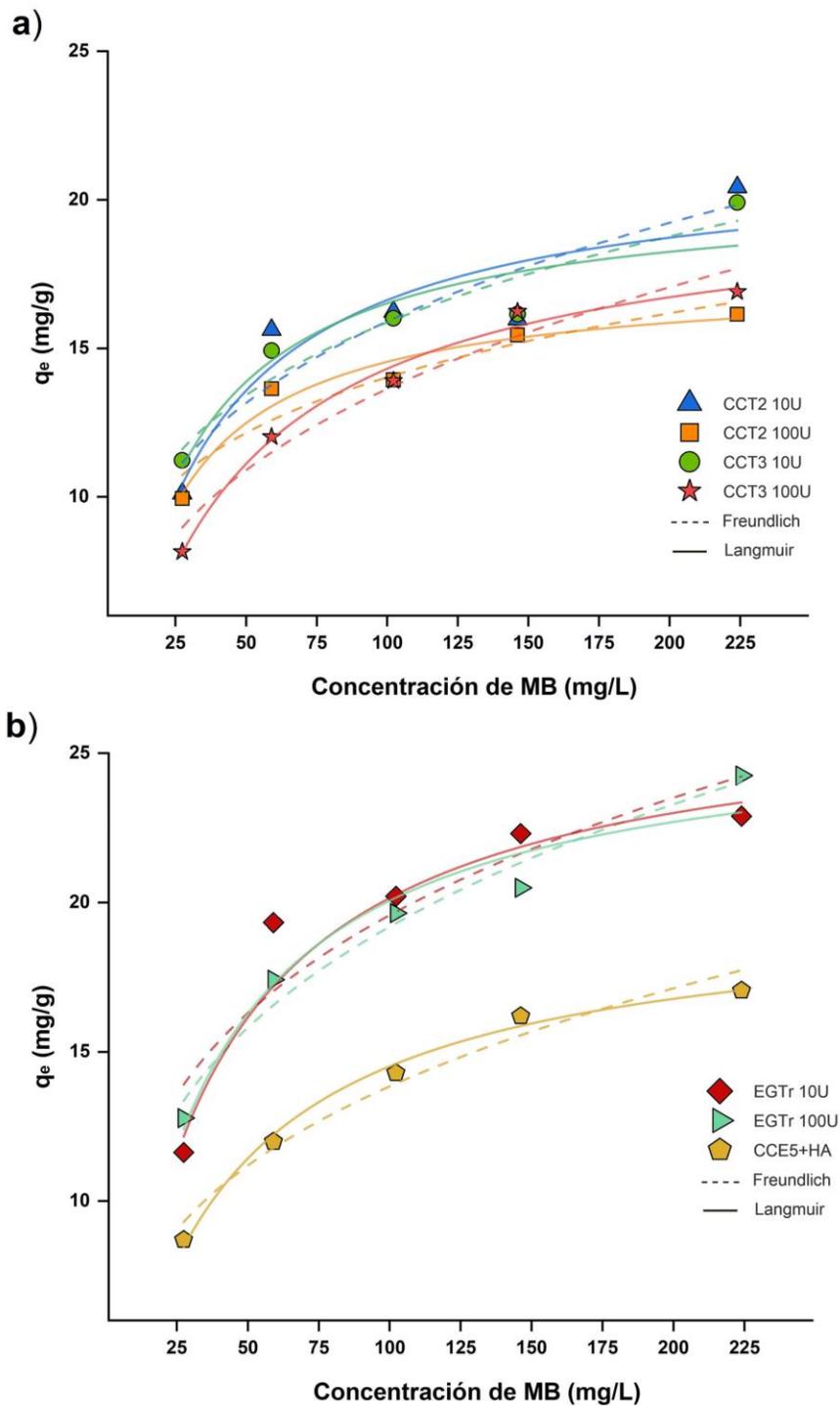


Figura 8. Ajustes no lineales con isothermas de Langmuir y Freundlich para la adsorción de MB en hidrogel de eucalipto. a) Tratamientos enzimáticos con cócteles Cellic, b) Tratamientos enzimáticos con EGTr y químico CCE5+HA. Concentración de MB: 25, 55, 90, 130 y 200 mg/L, volumen de solución: 10 mL, pH de la solución: 9,0, temperatura: 25°C. Los resultados son el promedio de 5 réplicas por tratamiento.

El análisis realizado a los datos obtenidos de la aplicación de los seis tratamientos enzimáticos, para el tratamiento de pulpa de eucalipto, determinó que el aumento en la dosis enzimática de 10 para 100 U en todos los tratamientos provocó una disminución en la viscosidad intrínseca, un contenido similar o menor de grupos carboxilos y un menor aumento de la cristalinidad, posiblemente por una menor remoción de la fracción de hemicelulosa residual por parte de enzimas tipo xilanasas, o una menor degradación de las zonas amorfas por parte del complejo de celulasas. Respecto a los hidrogeles elaborados se registraron niveles similares de densidad y porosidad entre las dosis aplicadas de cada tratamiento, pero diferencias significativas en su capacidad de adsorción, siendo mayor en los tratamientos de 10 U. Si bien la capacidad registrada por los hidrogeles del tratamiento EGTr de 100 U fue mayor, según el modelo de isothermas de Langmuir aplicado, la capacidad máxima calculada sería más alta en el tratamiento de 10 U. El aumento de la dosis enzimática causó cambios en la pulpa que quizás no fueron evaluadas en este estudio, pero que provocó esta disminución en la capacidad de adsorción de los hidrogeles, como la total o parcial de remoción de hemicelulosas (Carrillo-Varela et al., 2022). Por esto existen estudios que buscan optimizar temperaturas, tiempos de reacción, tipos de enzimas o sustratos, y dosis enzimática para la obtención de tratamientos más específicos que permitan ahorrar económica y energéticamente, y al mismo tiempo mejorando las propiedades de la pulpa tratada en el proceso (Squinca et al., 2020; Kumar et al., 2021; Rosales-Calderon et al., 2021). Estas mejoras en los tratamientos enzimáticos servirán para hacerlos más competitivos en el mercado, y aumentar su uso en reemplazo de tratamientos con reactivos químicos que conllevan un elevado riesgo medioambiental.

En el presente estudio se evaluaron tratamientos enzimáticos realizados con cócteles multicomponentes y un preparado de *T. reesei*, que al realizar la caracterización de las enzimas presentes se evidenció que también corresponde a un multicomponente pues diferentes enzimas hidrolíticas y una enzima tipo LPMO presentaron actividad catalítica. Al realizar la caracterización de los cócteles Cellic y comprobar que ambos presentaban actividad tipo LPMO, sumado a la presencia de las enzimas glucohidrolasas que ya habían sido determinadas en ambos cócteles, se concluyó que las principales enzimas que componen estos preparados multicomponente son similares, evidencia de esto son las propiedades de los hidrogeles elaborados en base a las pulpas tratadas de eucalipto, donde no presentaron

diferencias significativas en densidad, porosidad y adsorción de MB entre los tratamientos aplicados. La diferencia en la efectividad entre los cócteles tipo Cellic y el preparado de *T. reesei* podría explicarse por la rápida liberación de azúcares de xilosa al medio debido a la actividad xilanasas de los multicomponentes, pues se ha estudiado la inhibición de la actividad de enzimas del complejo de celulasas en presencia de altos niveles de estos azúcares, disminuyendo su capacidad de aumentar la accesibilidad de la pulpa (Xiao et al., 2004; Qing et al., 2010; Hsieh et al., 2014).

El cóctel de endoglucanasas de *Trichoderma* produjo la mayor mejora de la calidad de la pulpa, con una disminución de la viscosidad dentro del rango deseado, un aumento significativo del contenido de grupos carboxilos y la producción de cambios en la estructura supramolecular, que se tradujeron en una mejora significativa de las propiedades de los hidrogeles elaborados en base a la pulpa tratada. Los diferentes preparados enzimáticos con una dosis de 10 U cumplieron el objetivo de mejorar las características de la pulpa en comparación al tratamiento químico con extracción alcalina con NaOH al 5% y un tratamiento ácido posterior, en un menor tiempo, un menor uso de equipos y sin el uso de reactivos químicos que requieran un almacenamiento, transporte o disposición final.

6. CONCLUSIONES

- El análisis de las propiedades químicas y supramoleculares de las pulpas de eucalipto tratadas y de los hidrogeles de celulosa obtenidos a partir de éstas, evidenció una mejora luego del tratamiento con el preparado de endoglucanasas de *T. reesei* (EGTr), presentando un mayor contenido de carboxilos y viscosidad dentro del rango deseado, en el caso de las pulpas. En el caso de los hidrogeles, éstos presentaron una menor densidad, una mayor porosidad y capacidad máxima de adsorción de azul de metileno que los resultantes de las pulpas tratadas con los preparados enzimáticos Cellic CTec y con el tratamiento químico con extracción alcalina e hidrólisis ácida, por lo que se rechaza la hipótesis planteada.
- La aplicación de los preparados enzimáticos comerciales, multicomponente (Cellic CTec) y monocomponente (endoglucanasa de *T. reesei*), al igual que el tratamiento químico, permitió la obtención de pulpa grado soluble a partir de pulpa grado papel, y posteriormente permitió la elaboración de hidrogeles de celulosa, como una forma de evaluar la capacidad adsorbente de estos biomateriales.
- La capacidad de adsorción de MB por los hidrogeles elaborados a partir de las pulpas tratadas siguió la tendencia monocomponente de *T. reesei* (10 y 100 U) > multicomponentes Cellic CTec (10 U) > multicomponentes Cellic CTec (100 U) \approx tratamiento químico (extracción alcalina + hidrólisis ácida).
- El preparado de endoglucanasas de *T. reesei* representa la mejor alternativa entre los cócteles enzimáticos probados para reemplazar los tratamientos químicos en las condiciones utilizadas en este estudio, para la elaboración de hidrogeles y modificación de pulpa de eucalipto destinada a la elaboración de diversos biomateriales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Akter, M., Bhattacharjee, M., Dhar, A. K., Rahman, F. B. A., Haque, S., Rashid, T. U., & Kabir, S. M. F. (2021). Cellulose-based hydrogels for wastewater treatment: A concise review. *Gels*, 7(1), 30.
- Alam, M. N., & Christopher, L. P. (2018). Natural cellulose-chitosan cross-linked superabsorbent hydrogels with superior swelling properties. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(7), 8736-8742.
- An, X., Wen, Y., Cheng, D., Zhu, X., & Ni, Y. (2016). Preparation of cellulose nano-crystals through a sequential process of cellulase pretreatment and acid hydrolysis. *Cellulose*, 23(4), 2409-2420.
- Arce, C., Llano, T., García, P., & Coz, A. (2020). Technical and environmental improvement of the bleaching sequence of dissolving pulp for fibre production. *Cellulose*, 27(7), 4079-4090.
- Arnoul-Jarriault, B., Lachenal, D., Chirat, C., & Heux, L. (2015). Upgrading softwood bleached kraft pulp to dissolving pulp by cold caustic treatment and acid-hot caustic treatment. *Industrial Crops and Products*, 65, 565-571.
- Bailey, M. J., Biely, P., & Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23(3), 257-270.
- Bajpai, P. (2018). Chapter 14 - Production of dissolving grade pulp. In P. Bajpai (Ed.), *Biermann's handbook of pulp and paper (Third Edition)* (pp. 375-388). Elsevier.
- Bala, A., Anu, Alokika, Kumar, A., Kumar, S., Singh, D., & Singh, B. (2020). Secretome analysis of thermophilic mould *Myceliophthora thermophila* cultivated on rice straw and hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(4), 283-292.
- 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(6), 875-884.

- Behin, J., Mikaniki, F., & Fadaei, Z. (2008). Dissolving pulp (alpha-cellulose) from corn stalk by kraft process. *Iranian Journal of Chemical Engineering*, 5(3), 14-28.
- Bernardi, A. V., Gerolamo, L. E., de Gouvêa, P. F., Yonamine, D. K., Pereira, L. M. S., de Oliveira, A. H. C., Uyemura, S. A., & Dinamarco, T. M. (2021). LPMO AfAA9_B and cellobiohydrolase AfCel6A from *A. fumigatus* boost enzymatic saccharification activity of cellulase cocktail. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 276.
- Bondancia, T. J., Florencio, C., Baccarin, G. S., & Farinas, C. S. (2022). Cellulose nanostructures obtained using enzymatic cocktails with different compositions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 207, 299-307.
- Borrega, M., Larsson, P. T., Ahvenainen, P., Ceccherini, S., Maloney, T., Rautkari, L., & Sixta, H. (2018). Birch wood pre-hydrolysis vs pulp post-hydrolysis for the production of xylan-based compounds and cellulose for viscose application. *Carbohydrate Polymers*, 190, 212-221.
- Bourbonnais, R., & Paice, M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, 267(1), 99-102.
- 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, 248-254.
- 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 monoxygenase. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 79.
- Cai, J., Kimura, S., Wada, M., Kuga, S., & Zhang, L. (2008). Cellulose aerogels from aqueous alkali hydroxide-urea solution. *ChemSusChem: Chemistry & Sustainability Energy & Materials*, 1(1-2), 149-154.
- Carrillo, I., Mendonça, R. T., Ago, M., & Rojas, O. J. (2018). Comparative study of cellulosic components isolated from different *Eucalyptus* species. *Cellulose*, 25(2), 1011-1029.

- Carrillo, I., Vidal, C., Elissetche, J. P., & Mendonça, R. T. (2017). Wood anatomical and chemical properties related to the pulpability of *Eucalyptus globulus*: A review. *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, 80(1), 1-8.
- 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(1), 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.
- Çetinkol, Ö. P., Smith-Moritz, A. M., Cheng, G., Lao, J., George, A., Hong, K., Henry, R., Simmons, B. A., Heazlewood, J. L., & Holmes, B. M. (2012). Structural and chemical characterization of hardwood from tree species with applications as bioenergy feedstocks. *PLOS ONE*, 7(12), e52820.
- Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238.
- Chen, C., Duan, C., Li, J., Liu, Y., Ma, X., Zheng, L., Stavik, J., & Ni, Y. (2016). Cellulose (dissolving pulp) manufacturing processes and properties: A mini-review. *BioResources*, 11(2), 5553-5564.
- Cheng, C., Haider, J., Liu, P., Yang, J., Tan, Z., Huang, T., Lin, J., Jiang, M., Liu, H., & Zhu, L. (2020). Engineered LPMO significantly boosting cellulase-catalyzed depolymerization of cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(51), 15257-15266.
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3-23.

- Costa, T. H. F., Kadic', A., Chylenski, P., Várnai, A., Bengtsson, O., Lidén, G., Eijsink, V. G. H., & Horn, S. J. (2020). Demonstration-scale enzymatic saccharification of sulfite-pulped spruce with addition of hydrogen peroxide for LPMO activation. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14(4), 734-745.
- Dadwal, A., Sharma, S., & Satyanarayana, T. (2019). Diversity in cellulose-degrading microbes and their cellulases: Role in ecosystem sustainability and potential applications. In T. Satyanarayana, S. K. Das, & B. N. Johri (Eds.), *Microbial diversity in ecosystem sustainability and biotechnological applications: volume 2. Soil & Agroecosystems* (pp. 375-402). Springer Singapore.
- de Gouvea, P., Gerolamo, L., Bernardi, A., Pereira, L., Uyemura, S., & Dinamarco, T. (2019). Lytic polysaccharide monooxygenase from *Aspergillus fumigatus* can improve enzymatic cocktail activity during sugarcane bagasse hydrolysis. *Protein & Peptide Letters*, 26, 377-385.
- de Gouvêa, P. F., Bernardi, A. V., Gerolamo, L. E., de Souza Santos, E., Riaño-Pachón, D. M., Uyemura, S. A., & Dinamarco, T. M. (2018). Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. *BMC Genomics*, 19(1), 232.
- Dou, X., & Tang, Y. (2017). The influence of cold caustic extraction on the purity, accessibility and reactivity of dissolving-grade pulp. *Chemistry Select*, 2(35), 11462-11468.
- Du, L., Ma, L., Ma, Q., Guo, G., Han, X., & Xiao, D. (2018). Hydrolytic boosting of lignocellulosic biomass by a fungal lytic polysaccharide monooxygenase, AnLPMO15g from *Aspergillus niger*. *Industrial Crops and Products*, 126, 309-315.
- Duan, C., Li, J., Ma, X., Chen, C., Liu, Y., Stavik, J., & Ni, Y. (2015). Comparison of acid sulfite (AS)- and prehydrolysis kraft (PHK)-based dissolving pulps. *Cellulose*, 22(6), 4017-4026.
- Duan, C., Long, Y., Li, J., Ma, X., & Ni, Y. (2015). Changes of cellulose accessibility to cellulase due to fiber hornification and its impact on enzymatic viscosity control of dissolving pulp. *Cellulose*, 22(4), 2729-2736.

- Duan, C., Verma, S. K., Li, J., Ma, X., & Ni, Y. (2016). Combination of mechanical, alkaline and enzymatic treatments to upgrade paper-grade pulp to dissolving pulp with high reactivity. *Bioresource Technology*, 200, 458-463.
- Duan, C., Wang, X., Zhang, Y., Xu, Y., & Ni, Y. (2017). Fractionation and cellulase treatment for enhancing the properties of kraft-based dissolving pulp. *Bioresource Technology*, 224, 439-444.
- Eibinger, M., Ganner, T., Bubner, P., Rošker, S., Kracher, D., Haltrich, D., Ludwig, R., Plank, H., & Nidetzky, B. (2014). Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(52), 35929-35938.
- Ferreira, J. C., Evtuguin, D. V., & Prates, A. (2020). Effect of cellulose structure on reactivity of eucalyptus acid sulphite dissolving pulp. *Cellulose*, 27(8), 4763-4772.
- Filiatrault-Chastel, C., Heiss-Blanquet, S., Margeot, A., & Berrin, J. G. (2021). From fungal secretomes to enzymes cocktails: The path forward to bioeconomy. *Biotechnology Advances*, 52, Article 107833.
- Foo, K. Y., & Hameed, B. H. (2010). Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal*, 156(1), 2-10.
- Forsberg, Z., Stepnov, A. A., Nærdal, G. K., Klinkenberg, G., & Eijsink, V. G. H. (2020). Chapter One - Engineering lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). In D. S. Tawfik (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 644, pp. 1-34). Academic Press.
- Foudazi, R., Zowada, R., Manas-Zloczower, I., & Feke, D. L. (2023). Porous hydrogels: Present challenges and future opportunities. *Langmuir*, 39(6), 2092-2111.
- French, A. D. (2014). Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs. *Cellulose*, 21(2), 885-896.
- Freundlich, H. (1906). Over the adsorption in solution. *Journal of Physical Chemistry A*, 57, 385-470.

- Goluguri, B. R., Thulluri, C., Cherupally, M., Nidadavolu, N., Achuthananda, D., Mangamuri, L. N., & Addepally, U. (2012). Potential of thermo and alkali stable xylanases from *Thielaviopsis basicola* (MTCC-1467) in biobleaching of wood kraft pulp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(8), 2369-2380.
- Gomes, F. J. B., Colodette, J. L., Burnet, A., Batalha, L. A. R., Santos, F. A., & Demuner, I. F. (2015). Thorough characterization of brazilian new generation of eucalypt clones and grass for pulp production. *International Journal of Forestry Research*, 2015, 814071.
- Guo, Z.-p., Duquesne, S., Bozonnet, S., Nicaud, J.-M., Marty, A., & O'Donohue, M. J. (2017). Expressing accessory proteins in cellulolytic *Yarrowia lipolytica* to improve the conversion yield of recalcitrant cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 298.
- Haemmerle, F. (2011). The Cellulose Gap (The Future of Cellulose Fiber). *Lenzinger Berichte*, 89, 12-21.
- Heinze, T. (2016). Cellulose: Structure and Properties. In O. J. Rojas (Ed.), *Cellulose chemistry and properties: Fibers, nanocelluloses and advanced materials* (pp. 1-52). Springer International Publishing.
- Hsieh, C.-w. C., Cannella, D., Jørgensen, H., Felby, C., & Thygesen, L. G. (2014). Cellulase inhibition by high concentrations of monosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(17), 3800-3805.
- Hu, J., & Saddler, J. N. (2018). Why does GH10 xylanase have better performance than GH11 xylanase for the deconstruction of pretreated biomass? *Biomass and Bioenergy*, 110, 13-16.
- Hu, J., Tian, D., Renneckar, S., & Saddler, J. N. (2018). Enzyme mediated nanofibrillation of cellulose by the synergistic actions of an endoglucanase, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) and xylanase. *Scientific Reports*, 8(1), 3195.
- Hu, Y., Zhan, Y., Xu, M., Niu, F., Chen, Y., Yang, Q., Xiong, C., & Shi, Z. (2022). One-step preparation of flexible nanocellulose-based composite hydrogel supercapacitors with high specific capacitance. *Composites Science and Technology*, 230, 109725.

- Hua, C., Li, W., Han, W., Wang, Q., Bi, P., Han, C., & Zhu, L. (2018). Characterization of a novel thermostable GH7 endoglucanase from *Chaetomium thermophilum* capable of xylan hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *117*, 342-349.
- Hutterer, C., Kliba, G., Punz, M., Fackler, K., & Potthast, A. (2017). Enzymatic pulp upgrade for producing high-value cellulose out of a kraft paper pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, *102*, 67-73.
- Ibarra, D., Köpcke, V., & Ek, M. (2009). Exploring enzymatic treatments for the production of dissolving grade pulp from different wood and non-wood paper grade pulps. *Holzforschung*, *63*(6), 721-730.
- Ibarra, D., Köpcke, V., & Ek, M. (2010). Behavior of different monocomponent endoglucanases on the accessibility and reactivity of dissolving-grade pulps for viscose process. *Enzyme and Microbial Technology*, *47*(7), 355-362.
- Ipsen, J. Ø., Hallas-Møller, M., Brander, S., Lo Leggio, L., & Johansen, K. S. (2021). Lytic polysaccharide monooxygenases and other histidine-brace copper proteins: structure, oxygen activation and biotechnological applications. *Biochemical Society Transactions*, *49*(1), 531-540.
- Jegannathan, K. R., & Nielsen, P. H. (2013). Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. *Journal of Cleaner Production*, *42*, 228-240.
- Kalam, S., Abu-Khamsin, S. A., Kamal, M. S., & Patil, S. (2021). Surfactant adsorption isotherms: A review. *ACS Omega*, *6*(48), 32342-32348.
- Kaur, P., Bhardwaj, N. K., & Sharma, J. (2016). Pretreatment with xylanase and its significance in hemicellulose removal from mixed hardwood kraft pulp as a process step for viscose. *Carbohydrate Polymers*, *145*, 95-102.
- Kim, I. J., Lee, H. J., Choi, I.-G., & Kim, K. H. (2014). Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(20), 8469-8480.

- Kim, I. J., Youn, H. J., & Kim, K. H. (2016). Synergism of an auxiliary activity 9 (AA9) from *Chaetomium globosum* with xylanase on the hydrolysis of xylan and lignocellulose. *Process Biochemistry*, 51(10), 1445-1451.
- Koch, G. (2006). Raw material for pulp. In *Handbook of pulp* (pp. 21-68).
- Köpcke, V., Ibarra, D., & Ek, M. (2008). Increasing accessibility and reactivity of paper grade pulp by enzymatic treatment for use as dissolving pulp. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 23(4), 363-368.
- Köpcke, V., Ibarra, D., Larsson, P. T., & Ek, M. (2010). Optimization of treatments for the conversion of eucalyptus kraft pulp to dissolving pulp. *Polymers from Renewable Resources*, 1(1), 17-34.
- Kumar, A., Ram, C., & Tazeb, A. (2021). Enzyme-assisted pulp refining: An energy saving approach. *Physical Sciences Reviews*, 6(2), 20190046.
- Kumar, A. K., & Parikh, B. S. (2015). Cellulose-degrading enzymes from *Aspergillus terreus* D34 and enzymatic saccharification of mild-alkali and dilute-acid pretreated lignocellulosic biomass residues. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1), 7.
- Kumar, H., & Christopher, L. P. (2017). Recent trends and developments in dissolving pulp production and application. *Cellulose*, 24(6), 2347-2365.
- Laine, J., Buchert, J., Viikari, L., & Stenius, P. (1996). Characterization of unbleached kraft pulps by enzymatic treatment, potentiometric titration and polyelectrolyte adsorption. *Holzforschung*, 50(3), 208-214.
- Langmuir, I. (1916). The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. *Journal of the American Chemical Society*, 38(11), 2221-2295.
- Lei, C., Bian, Y., Zhi, F., Hou, X., Lv, C., & Hu, Q. (2022). Enhanced adsorption capacity of cellulose hydrogel based on corn stalk for pollutants removal and mechanism exploration. *Journal of Cleaner Production*, 375, 134130.

- Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2013). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, *6*(1), 41.
- Li, H., Legere, S., He, Z., Zhang, H., Li, J., Yang, B., Zhang, S., Zhang, L., Zheng, L., & Ni, Y. (2018). Methods to increase the reactivity of dissolving pulp in the viscose rayon production process: A review. *Cellulose*, *25*(7), 3733-3753.
- Li, H., Wu, H., Xiong, L., Chen, X., Wang, C., Qi, G., Huang, C., Guo, H., Luo, M., Liu, J., Long, M., & Chen, X. (2017). The hydrolytic efficiency and synergistic action of recombinant xylan-degrading enzymes on xylan isolated from sugarcane bagasse. *Carbohydrate Polymers*, *175*, 199-206.
- Li, J., Solhi, L., Goddard-Borger, E. D., Mathieu, Y., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G., & Brumer, H. (2021). Four cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenases from *Cellulomonas* species. *Biotechnology for Biofuels*, *14*(1), 29.
- Li, L., Lin, Z., Yang, X., Wan, Z., & Cui, S. (2009). A novel cellulose hydrogel prepared from its ionic liquid solution. *Chinese Science Bulletin*, *54*(9), 1622-1625.
- Liebner, F., Haimer, E., Potthast, A., Loidl, D., Tschegg, S., Neouze, M.-A., Wendland, M., & Rosenau, T. (2009). Cellulosic aerogels as ultra-lightweight materials. Part 2: Synthesis and properties 2nd ICC 2007, Tokyo, Japan, October 25–29, 2007. *Holzforschung*, *63*(1), 3-11.
- Liu, Y., Shi, L., Cheng, D., & He, Z. (2016). Dissolving pulp market and technologies: chinese prospective - a mini-review. *BioResources*, *11*(3), 7902-7916.
- 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*(3), 632-645.
- Masruchin, N., Park, B.-D., & Causin, V. (2015). Influence of sonication treatment on supramolecular cellulose microfibril-based hydrogels induced by ionic interaction. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *29*, 265-272.

- Mateos-Espejel, E., Radiotis, T., & Jemaa, N. (2013). Implication of converting a converting a Kraft pulp mill to a dissolving pulp operation with a hemicellulose extraction stage. *Tappi Journal*, *12*, 29-38.
- Miao, Q., Tian, C., Chen, L., Huang, L., Zheng, L., & Ni, Y. (2015). Combined mechanical and enzymatic treatments for improving the Fock reactivity of hardwood kraft-based dissolving pulp. *Cellulose*, *22*(1), 803-809.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426-428.
- Moreau, C., Tapin-Lingua, S., Grisel, S., Gimbert, I., Le Gall, S., Meyer, V., Petit-Conil, M., Berrin, J.-G., Cathala, B., & Villares, A. (2019). Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 156.
- Müller, G., Chylenski, P., Bissaro, B., Eijsink, V. G. H., & Horn, S. J. (2018). The impact of hydrogen peroxide supply on LPMO activity and overall saccharification efficiency of a commercial cellulase cocktail. *Biotechnology for Biofuels*, *11*, 209-209.
- Nam, S., French, A. D., Condon, B. D., & Concha, M. (2016). Segal crystallinity index revisited by the simulation of X-ray diffraction patterns of cotton cellulose I β and cellulose II. *Carbohydrate Polymers*, *135*, 1-9.
- Ning, F., Zhang, J., Kang, M., Ma, C., Li, H., & Qiu, Z. (2021). Hydroxyethyl cellulose hydrogel modified with tannic acid as methylene blue adsorbent. *Journal of Applied Polymer Science*, *138*(8), 49880.
- Nomura, S., Kugo, Y., & Erata, T. (2020). ¹³C NMR and XRD studies on the enhancement of cellulose II crystallinity with low concentration NaOH post-treatments. *Cellulose*, *27*(7), 3553-3563.
- Palme, A., Theliander, H., & Breid, H. (2016). Acid hydrolysis of cellulosic fibres: Comparison of bleached kraft pulp, dissolving pulps and cotton textile cellulose. *Carbohydrate Polymers*, *136*, 1281-1287.

- Pereira, B., & Arantes, V. (2020). Production of cellulose nanocrystals integrated into a biochemical sugar platform process via enzymatic hydrolysis at high solid loading. *Industrial Crops and Products*, *152*, 112377.
- Pérez, S., & Samain, D. (2010). Structure and engineering of celluloses. In D. Horton (Ed.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Vol. 64, pp. 25-116). Academic Press.
- Qing, Q., Yang, B., & Wyman, C. E. (2010). Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource Technology*, *101*(24), 9624-9630.
- Rosales-Calderon, O., Pereira, B., & Arantes, V. (2021). Economic assessment of the conversion of bleached eucalyptus kraft pulp into cellulose nanocrystals in a stand-alone facility via acid and enzymatic hydrolysis. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *15*(6), 1775-1788.
- Roselli, A., Hummel, M., Monshizadeh, A., Maloney, T., & Sixta, H. (2014). Ionic liquid extraction method for upgrading eucalyptus kraft pulp to high purity dissolving pulp. *Cellulose*, *21*(5), 3655-3666.
- Rowell, R. (2012). Chemical modification of wood to produce stable and durable composites. *Cellulose Chemistry and Technology*, *46*, 443-448.
- 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.
- Sangtarashani, S. M. H., Rahmaninia, M., Behrooz, R., & Khosravani, A. (2020). Lignocellulosic hydrogel from recycled old corrugated container resources using ionic liquid as a green solvent. *Journal of Environmental Management*, *270*, 110853.
- Scott, B. R., Huang, H. Z., Frickman, J., Halvorsen, R., & Johansen, K. S. (2016). Catalase improves saccharification of lignocellulose by reducing lytic polysaccharide monooxygenase-associated enzyme inactivation. *Biotechnology Letters*, *38*(3), 425-434.

- Sescousse, R., Gavillon, R., & Budtova, T. (2011). Aerocellulose from cellulose–ionic liquid solutions: Preparation, properties and comparison with cellulose–NaOH and cellulose–NMMO routes. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1766-1774.
- Shen, X., Xie, Y., Wang, Q., Yi, X., Shamshina, J. L., & Rogers, R. D. (2019). Enhanced heavy metal adsorption ability of lignocellulosic hydrogel adsorbents by the structural support effect of lignin. *Cellulose*, 26(6), 4005-4019.
- Shi, Y., Chen, K., Long, L., & Ding, S. (2021). A highly xyloglucan active lytic polysaccharide monooxygenase EpLPMO9A from *Eupenicillium parvum* 4-14 shows boosting effect on hydrolysis of complex lignocellulosic substrates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 202-213.
- Sixta, H. (2006). Pulp properties and applications. In *Handbook of Pulp* (pp. 1009-1067).
- Sixta, H., Iakovlev, M., Testova, L., Roselli, A., Hummel, M., Borrega, M., van Heiningen, A., Froschauer, C., & Schottenberger, H. (2013). Novel concepts of dissolving pulp production. *Cellulose*, 20(4), 1547-1561.
- Song, H.-T., Gao, Y., Yang, Y.-M., Xiao, W.-J., Liu, S.-H., Xia, W.-C., Liu, Z.-L., Yi, L., & Jiang, Z.-B. (2016). Synergistic effect of cellulase and xylanase during hydrolysis of natural lignocellulosic substrates. *Bioresource Technology*, 219, 710-715.
- Squinca, P., Bilatto, S., Badino, A. C., & Farinas, C. S. (2020). Nanocellulose production in future biorefineries: An integrated approach using tailor-made enzymes. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(5), 2277-2286.
- Stepnov, A. A., Forsberg, Z., Sørli, M., Nguyen, G.-S., Wentzel, A., Røhr, Å. K., & Eijsink, V. G. H. (2021). Unraveling the roles of the reductant and free copper ions in LPMO kinetics. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 28.
- Tan, L. U. L., Mayers, P., Illing, M., & Saddler, J. N. (1987). The copurification of β -glucosidase, β -xylosidase, and 1,3- β -glucanase in two separate enzyme complexes isolated from *Trichoderma harzianum* E58. *Biochemistry and Cell Biology*, 65(9), 822-832.

- Tanaka, M., Taniguchi, M., Matsuno, R., & Kamikubo, T. (1981). Purification and properties of cellulases from *Eupencillium javanicum*: Studies on the re-utilization of cellulosic resources (VII). *Journal of Fermentation Technology*, 59(3), 177-183.
- Toushik, S. H., Lee, K. T., Lee, J. S., & Kim, K. S. (2017). Functional applications of lignocellulolytic enzymes in the fruit and vegetable processing industries. *Journal of Food Science*, 82(3), 585-593.
- Turnbull, J. W. (1999). Eucalypt plantations. *New Forests*, 17(1), 37-52.
- Tyshkunova, I. V., Chukhchin, D. G., Gofman, I. V., Poshina, D. N., & Skorik, Y. A. (2021). Cellulose cryogels prepared by regeneration from phosphoric acid solutions. *Cellulose*, 28(8), 4975-4989.
- Valenzuela, S. V., Valls, C., Schink, V., Sánchez, D., Roncero, M. B., Diaz, P., Martínez, J., & Pastor, F. I. J. (2019). Differential activity of lytic polysaccharide monooxygenases on celluloses of different crystallinity. Effectiveness in the sustainable production of cellulose nanofibrils. *Carbohydrate Polymers*, 207, 59-67.
- Virtanen, T., Penttilä, P. A., Maloney, T. C., Grönqvist, S., Kamppuri, T., Vehviläinen, M., Serimaa, R., & Maunu, S. L. (2015). Impact of mechanical and enzymatic pretreatments on softwood pulp fiber wall structure studied with NMR spectroscopy and X-ray scattering. *Cellulose*, 22(3), 1565-1576.
- Vlasenko, E., Schülein, M., Cherry, J., & Xu, F. (2010). Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. *Bioresource Technology*, 101(7), 2405-2411.
- Wang, H., Pang, B., Wu, K., Kong, F., Li, B., & Mu, X. (2014). Two stages of treatments for upgrading bleached softwood paper grade pulp to dissolving pulp for viscose production. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 183-187.
- Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J., & Saddler, J. N. (2004). Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113-116, 1115-1126.
- Xu, F., Shi, Y. C., & Wang, D. (2013). X-ray scattering studies of lignocellulosic biomass: a review. *Carbohydrate Polymers*, 94(2), 904-917.

- Yang, J., Liu, D., Song, X., Zhao, Y., Wang, Y., Rao, L., Fu, L., Wang, Z., Yang, X., Li, Y., & Liu, Y. (2022). Recent progress of cellulose-based hydrogel photocatalysts and their applications. *Gels*, 8(5), 270.
- Yang, S., Yang, B., Duan, C., Fuller, D. A., Wang, X., Chowdhury, S. P., Stavik, J., Zhang, H., & Ni, Y. (2019). Applications of enzymatic technologies to the production of high-quality dissolving pulp: A review. *Bioresource Technology*, 281, 440-448.
- Zerva, A., Pentari, C., Grisel, S., Berrin, J.-G., & Topakas, E. (2020). A new synergistic relationship between xylan-active LPMO and xylobiohydrolase to tackle recalcitrant xylan. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 142.
- Zhai, R., Hu, J., & Saddler, J. N. (2018). The inhibition of hemicellulosic sugars on cellulose hydrolysis are highly dependant on the cellulase productive binding, processivity, and substrate surface charges. *Bioresource Technology*, 258, 79-87.
- Zhang, L., Lu, H., Yu, J., Fan, Y., Ma, J., & Wang, Z. (2019). Contribution of lignin to the microstructure and physical performance of three-dimensional lignocellulose hydrogels. *Cellulose*, 26(4), 2375-2388.
- Zhang, L., Lu, H., Yu, J., Fan, Y., Yang, Y., Ma, J., & Wang, Z. (2018). Synthesis of lignocellulose-based composite hydrogel as a novel biosorbent for Cu²⁺ removal. *Cellulose*, 25(12), 7315-7328.
- Zhao, L., Yuan, Z., Kapu, N. S., Chang, X. F., Beatson, R., Trajano, H. L., & Martinez, D. M. (2017). Increasing efficiency of enzymatic hemicellulose removal from bamboo for production of high-grade dissolving pulp. *Bioresource Technology*, 223, 40-46.
- Zhou, H., Li, T., Yu, Z., Ju, J., Zhang, H., Tan, H., Li, K., & Yin, H. (2019). A lytic polysaccharide monooxygenase from *Myceliophthora thermophila* and its synergism with cellobiohydrolases in cellulose hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 570-576.
- Zhou, X., Xu, Z., He, J., Li, Y., Pan, C., Wang, C., Deng, M.-R., & Zhu, H. (2020). A myxobacterial LPMO10 has oxidizing cellulose activity for promoting biomass

enzymatic saccharification of agricultural crop straws. *Bioresource Technology*, 318, 124217.