

**APLICACIÓN DE ETAPAS ENZIMÁTICAS (LACASA-
XILANASA) PARA LA OBTENCIÓN DE PULPA
QUÍMICA DE BAGAZO DE CAÑA**

ANA MARÍA JIMÉNEZ SERNA

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
MEDELLÍN

2016

**APLICACIÓN DE ETAPAS ENZIMÁTICAS (LACASA-
XILANASA) PARA LA OBTENCIÓN DE PULPA
QUÍMICA DE BAGAZO DE CAÑA**

ANA MARÍA JIMÉNEZ SERNA

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
MEDELLÍN

2016

APLICACIÓN DE ETAPAS ENZIMÁTICAS (LACASA- XILANASA) PARA LA OBTENCIÓN DE PULPA QUÍMICA DE BAGAZO DE CAÑA

ANA MARÍA JIMÉNEZ SERNA

Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Biotecnología

Director

GERMÁN CAMILO QUINTANA MARÍN

Doctor en Ingeniería

Codirector

MABEL MILENA TORRES TABORDA

Magister en Biotecnología

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍAS

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

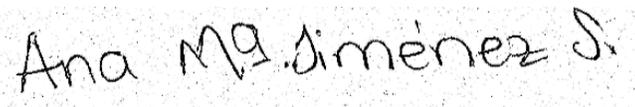
MEDELLÍN

2016

Abril de 2016

Ana María Jiménez Serna

“Declaro que esta tesis (o trabajo de grado) no ha sido presentada para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en ésta o cualquier otra universidad” Art 82 Régimen Discente de Formación Avanzada.



Firma

A mi hermana, mi madre y mi padre que son el motor de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Durante la realización de este proyecto son muchas las personas e instituciones que han participado y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado de forma desinteresada.

En primer lugar agradecer al Doctor Germán Camilo Quintana, por la confianza que depositó en mí desde el momento en que llegue a buscar un proyecto y que con el tiempo ha dejado de ser uno solo para convertirse en varios proyectos que compartimos y que encaminan mi desarrollo como profesional.

En segundo lugar a la Magíster Mabel Milena Torres por su asesoría y apoyo, pues sin sus conocimientos sobre el tema habría sido muy difícil encontrar un hilo que llevara al proyecto por el lugar indicado.

Debo un especial reconocimiento a los dos grupos de investigación, **Pulpa y Papel UPB** y **LEPAMAP UdG**, que formaron parte de esta investigación y que por ellos se llevaron a cabo investigaciones y actividades importantes y decisivas del proyecto; hay algunas que aún continúan. En especial al Doctor Pere Mutjé por acogerme y hacerme parte de su grupo de investigación y por creer en mi trabajo, y a la ingeniera Giovanna Diosa ya que gracias a su permanente apoyo y trabajo en equipo el proyecto salió adelante. Además agradecer a los Doctores Vera Pawlosky-Glahn y Juan José Egozcue por la colaboración con el proyecto y las enseñanzas recibidas; siento una profunda admiración por ustedes.

También agradezco profundamente a mis dos grandes amigos paisas en Cataluña por el apoyo en mi investigación y a mi familia extendida en Girona porque me dieron las fuerzas y el ánimo para creer en mis proyectos.

Y por último a las personas más importantes de mi vida, mi madre, mi hermana, y mi padre porque ellas son mi razón y mi apoyo para seguir adelante con todo lo que me propongo.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	vi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ESTADO DEL ARTE	4
2.1 Proceso de fabricación de papel	4
2.2 Principales componentes de las fibras naturales	6
2.2.1. Celulosa	6
2.2.2. Hemicelulosas.....	7
2.2.3. Lignina	7
2.2.4. Factores que inciden en la degradación de componentes de la fibra y su posterior procesamiento.....	9
2.3 Pulpeo.....	11
2.3.1. Pulpeo mecánico	13
2.3.2. Pulpeo químico.....	15
2.3.3. Biopulpeo	17
2.3.4. Blanqueo.....	19
2.4 Enzimas empleadas en el biopulpeo	20
2.5 Parámetros básicos de las propiedades de la pulpa y el papel.....	20
2.6 Rendimientos típicos en la fabricación del papel	21
2.7 Impacto ambiental.....	22
2.8 Caña de azúcar.....	25

2.9	Bagazo de caña de azúcar.....	28
2.10	Biopulpeo de bagazo de caña	31
3.	TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS.....	34
3.1.	Xilanasa	34
3.1.1.	Estructura del xilano.....	34
3.1.2.	Enzimas xilanodegradantes.....	35
3.1.3.	Endo-1,4- β -xilansas.....	36
3.1.4.	Mecanismo	36
3.1.5.	Fuente de producción de xilanasa	37
3.1.6.	Aplicaciones de la xilanasa.....	38
3.2.	Lacasa	42
3.2.1.	Estructura de la lignina	42
3.2.2.	Enzimas que degradan la lignina	43
3.2.3.	Fuente de producción de lacasa.....	44
3.2.4.	Mecanismo (sitio activo, reacción, ciclo catalítico).....	45
3.2.5.	Mediadores que amplían el rango de acción de la enzima.....	47
3.2.6.	Aplicaciones de la lacasa.....	49
3.3.	Endoglucanasa	51
3.3.1.	Mecanismo	51
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
4.1.	Caracterización química de la materia prima (bagazo de caña).....	54
4.2.	Actividades enzimáticas	55
4.3.	Biopulpeo.....	55
4.4.	Análisis estadístico y gráfico de los datos.....	56
4.5.	Pulpeo alcalino.....	57

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	58
5.1. Caracterización química del bagazo de caña.....	58
5.2. Actividades enzimáticas.....	59
5.3. Determinación de las condiciones de operación.....	60
5.3.1. Análisis estadístico:.....	62
5.3.2. Análisis gráfico:.....	64
5.4. Biopulpeo y pulpeo químico.....	71
5.4.1. Condiciones de pulpeo y rendimientos.....	72
5.4.2. Propiedades de la pulpa obtenida en el biopulpeo.....	75
5.4.3. Propiedades de la pulpa obtenida en el ensayo con xilanasa.....	77
5.4.4. Propiedades de la pulpa obtenida en el ensayo con lacasa.	78
5.4.5. Propiedades de la pulpa para el ensayo con endoglucanasa.	79
5.4.6. Análisis estadístico de algunas propiedades papeleras.	79
6. CONCLUSIONES	82
7. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS.....	83
8. REFERENCIAS.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso esquemático para la producción de papel	4
Figura 2. Fabricación de papel	5
Figura 3. Equipo para la fabricación de papel a escala de laboratorio	6
Figura 4a. Esquema de la lignina, 4b.	8
Figura 5. Esquema de una hifa fúngica	11
Figura 6. Tipos de pastas obtenidas mediante pulpeo	11
Figura 7. Desfibrador de muelas	13
Figura 8. Desfibrador de discos	14
Figura 9. Sistema de producción termomecánico de pulpa	15
Figura 10. Rendimientos típicos en el procesamiento de papel	22
Figura 11. Bagazo de caña de azúcar.	24
Figura 12. Tallo de caña de azúcar	26
Figura 13. Hemicelulosa	35
Figura 14. Acción de las xilanasas	36
Figura 15. Sitio activo de lacasa	45
Figura 16. Mecanismo de lacasa	47
Figura 17. Estructuras de algunos mediadores de lacasa	48
Figura 18. Acción de las celulasas	53
Figura 19. Diagrama del proceso realizado	54
Figura 23. Gráfico biplot	63
Figura 21. Evaluación de lacasa sobre las fibras	66
Figura 22. Barras de error para lacasa	67

Figura 23. Evaluación de xilanasa sobre las fibras	69
Figura 24. Barras de error para xilanasa	71
Figura 25. Rendimientos del pulpeo	73
Figura 26. Principales enlaces presentes en las moléculas de lignina	74
Figura 27. Números Kappa de pulpas tratadas	75
Figura 28. Longitud de ruptura y grado Schopper de las pulpas tratadas	77
Figura 29. Gráfico de las medias para longitud de ruptura por tratamiento	80
Figura 30. Gráfico de las medias para índice Mullen por tratamiento	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de las normas TAPPI	21
Tabla 2. Principales componentes del tallo de caña de azúcar.....	26
Tabla 3. Otros constituyentes de la caña presentes en el jugo.....	27
Tabla 4. Composición química porcentual del bagazo de caña	29
Tabla 5. Componentes del bagazo de caña	29
Tabla 6. Composición química de algunas maderas.....	30
Tabla 7. Ejemplos de preparaciones comerciales que contienen xilanasa	38
Tabla 8. Estudios de tratamientos realizados con xilanasa.....	41
Tabla 9. Estudios de tratamientos realizados con lacasa.....	50
Tabla 10. Dosis y tiempos del biopulpeo para cada enzima.....	56
Tabla 11. Caracterización química del bagazo de caña	58
Tabla 12. Análisis ANOVA y R ² para lacasa y xilanasa	60
Tabla 13. Componentes principales de los tratamientos.....	63
Tabla 14. Condiciones de operación.....	72
Tabla 15. Condiciones del pulpeo químico	73
Tabla 16. Propiedades papeleras de la pulpa para lacasa, xilanasa y Endoglucanasa	76

RESUMEN

El papel un producto que se fabrica con fibras de celulosa de la madera, las materias primas usadas para este fin son conocidas como maderas pulpables, generalmente duras o blandas. Algunas opciones diferentes a estas maderas son las plantas anuales dentro de las cuales está el bagazo que se obtiene de la caña, la paja que sale del arroz, el yute, entre otras. Para que este proceso se lleve a cabo se realiza un pulpeo químico que consiste en extraer la lignina de las fibras usando temperatura, presión y reactivos químicos como la sosa o hidróxido de sodio (NaOH) y el sulfuro de sodio (Na₂S), entre otros.

El bagazo de caña de azúcar es un material lignocelulósico constituido principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Se obtiene como subproducto o residuo agroindustrial en los ingenios después de la extracción del jugo de la caña de azúcar y representa aproximadamente entre el 25% y el 40% del total de la materia procesada.

En la industria papelera se emplea bagazo de caña para la obtención de pulpas, las cuales son tratadas químicamente a altas temperaturas durante tiempos moderados, lo que ocasiona la formación de residuos muy contaminantes. Estos excedentes pueden ser mitigados aplicando tratamientos enzimáticos (biopulpeo) al bagazo, haciendo que la carga química sea menor y que los residuos resultantes se degraden más fácilmente. El biopulpeo es la aplicación de métodos biotecnológicos para la fabricación de pasta de papel utilizando enzimas producidas por microorganismos en una etapa anterior al proceso de pulpeo, haciendo que el consumo energético sea menor que el requerido en el pulpeo químico sin pretratamiento.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de tres enzimas comerciales diferentes, *Lacasa*, *Xilanasa* y *Endoglucanasa*, sobre las condiciones del pulpeo alcalino de bagazo de caña para la obtención de pulpa química.

La experimentación con enzimas en procesos previos al biopulpeo es una práctica con pocos antecedentes en la literatura, y por la inherente incertidumbre de éxito en su uso para este tipo de aplicaciones, la dosificación y tiempo de contacto así como sus niveles de aplicación fueron establecidos a partir la literatura disponible, la información de fichas técnicas o la experiencia de uso en centros de investigación. Los resultados para las enzimas fueron analizados mediante técnicas estadísticas como: diseño de

experimentos, análisis exploratorio, diagrama biplot y análisis gráfico, metodologías ampliamente usadas en procesos químicos. Consecuentemente, cada uno de los productos fue adicionado de forma independiente en la etapa del biopulpeo, y se hizo control de su dosificación y tiempo de contacto con la fibra.

Una vez culminado el procesamiento, se caracterizó el bagazo de caña desmedulado, considerando las normas TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry): Extraíbles Orgánicos (TAPPI T-264-om-97), Extraíbles Acuosa (TAPPI T-207-om-93), Lignina Klason (TAPPI T-207-om-88), Porcentaje de Cenizas (TAPPI T-211-om-93) y Número Kappa (TAPPI T-236-om-85). La caracterización de la materia prima se realizó antes y después del proceso de pulpeo alcalino, para establecer los rendimientos de las pulpas.

Teniendo como muestra de control un rendimiento de cocción para la pulpa sin tratamiento equivalente al 81.5%, la pulpa tratada con *Lacasa* presentó un 85.36% de eficiencia, mientras que el uso de *Xilanasa* arrojó 89.58% y la *Endoglucanasa* un 87.58%.

Adicionalmente, para medir la pertinencia y aplicabilidad del bagazo en procesos papeleros, se caracterizaron la longitud de ruptura y la drenabilidad mediante el grado Schopper-Riegler (°SR). En ese caso la longitud de ruptura del papel sin tratamiento fue de 5417m (°SR: 27), con *Xilanasa* de 4664m (°SR: 28), usando *Lacasa* fue de 5053m (°SR: 37) y empleando *Endoglucanasa* se obtuvo 5504m (°SR: 22).

Los resultados reflejan un desempeño apropiado de las enzimas comerciales en el proceso de biopulpeo realizado debido a que se obtienen mejoras en las propiedades papeleras, lo cual permite sitios más asequibles para los reactivos a la hora de la cocción y que se traduce en un ahorro de tiempo y dinero a la hora de efectuar el pulpeo químico.

Palabras Clave: *Bagazo de caña, biopulpeo, tratamiento enzimático, Lacasa, Xilanasa, Endoglucanasa.*

ABSTRACT

Paper is made with cellulose fibers present in wood. Raw materials used for this purpose are known as pulpwood timber, which generally are hard or soft woods. Different options to these woods are annual plants such as sugarcane bagasse, rice straw, jute, among others. For this process to be carried out, a chemical pulping which involves removing the lignin from the fibers using chemical reagents, temperature and pressure is performed. Some reactants used in the pulping are: soda or sodium hydroxide (NaOH), sodium sulfide (Na₂S), among others.

Sugarcane bagasse is a lignocellulosic material consisting mainly of cellulose, hemicellulose and lignin. It is obtained as a by-product or agro residue that comes from mills after sugar cane's juice extraction, and represents approximately between 25% and 40% of the processed material.

In the paper industry bagasse is used for the production of pulps, which are chemically treated at high temperatures during moderate times, causing the formation of highly polluting waste. These surpluses can be mitigated by applying enzymatic treatments (biopulping) to the bagasse, reducing the chemical load and making the residues easier to be degraded. Biopulping is the application of biotechnological methods to the manufacture of pulp and paper and it is accomplished through the use of microbial enzymes as a pretreatment before pulping, thus reducing the energy consumption compared to the required one in the chemical pulping.

The objective of this study was to evaluate the effect of using three different commercial enzymes: *Lacasse*, *Xylanase* and *Endoglucanase*, on the alkaline pulping conditions of sugarcane bagasse for the production of chemical pulp. Because the amount of experimental literature is limited, and due to the inherent uncertainty of success in its use for this type of application, dosage, contact time, and application levels were established from the available literature, information from data sheets or from the experience of research centers. Therefore, results for some enzymes were analyzed using statistical techniques such as design of experiments, exploratory analysis, biplot diagram and graphical analysis; methodologies widely used in chemical processes. Consequently, each product was independently added in the step

of biopulping, by controlling specific dosage and time of contact with the fiber; then, a chemical pulping was performed.

Once the process was completed, depithing sugarcane bagasse was characterized by using the TAPPI standards (Technical Association of the Pulp and Paper Industry): Extractable Organic (TAPPI T-264-om-97), Removable Aqueous (TAPPI T-207-om-93), Klason Lignin (TAPPI T-207-om-88), percentage of ash (TAPPI T-211-om-93) and Kappa Number (TAPPI T-236-om-85). Characterization of the raw material was performed before and after the alkaline pulping process in order to establish the yield of the pulps. Taking as control cooking yield for non-treated pulp 81.5%, the treated pulp with *Laccase* yields 85.36% of efficiency, while the use of *Xylanase* sheds 89.58%, and 87.58% for *Endoglucanase*.

Additionally, the breaking length and drainability were characterized, by means of the Schopper-Riegler degree ($^{\circ}$ SR), in order to measure the relevance and applicability of sugarcane bagasse in papermaking processes. In our case the breaking length of the untreated paper was 5417m ($^{\circ}$ SR 27), 4664m for the pulp treated with *Xylanase* ($^{\circ}$ SR 28) 5053m, *Laccase* ($^{\circ}$ SR 37) and 5504m obtained with *Endogluconase* ($^{\circ}$ SR: 22).

The commercial enzymes show a good performance in biopulping process, because the paper properties were improved, allowing more available reactive sites, reflected in saving time and money.

Keywords: Bagasse, biopulping, enzymatic treatment, laccase, xylanase, endoglucase

1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posibles; debido a que las enzimas son extremadamente específicas frente a sus sustratos y a que normalmente actúan en condiciones suaves de temperatura y presión tienen una amplia aplicabilidad industrial. Algunas enzimas son usadas comercialmente, en la síntesis de antibióticos y productos domésticos de limpieza. Además, son ampliamente utilizadas en la fabricación de alimentos o producción de biocombustibles (Alonso, Bond, & Dumesic, 2010).

Estas enzimas también pueden ser usadas en la etapa previa al pulpeo químico. Algunas de ellas son la *lacasa*, la *xilanasa* y la *endoglucanasa*. Las lacasas son enzimas pertenecientes al grupo de las oxidasas de cobre azul. Por su parte las xilanasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de xilanos que forman parte de las hemicelulosas presentes en las fibras celulósicas. Estas hemicelulosas se encuentran, en cierta forma, en una situación intermedia entre las cadenas ordenadas de celulosa y la fracción amorfa de lignina.

Otras enzimas empleadas en el bipulpeo son las endoglucanasas (1,4- β -D-glucan 4-glucanohidrolasas), que producen una disminución en el grado de polimerización de la celulosa, por cortes al azar de la cadena glucosídica, produciendo glucosa, celobiosa (disacáridos) y celotriosa (trisacáridos). Los sustratos sobre los que actúan las endoglucanasas incluyen carboximetilcelulosa, celulosa amorfa, celooligosacáridos; que no atacan de forma significativa a la celulosa cristalina (Barreto 2008).

Esta investigación pretende determinar cuál de las tres enzimas mencionadas es la que mejora las propiedades de las pulpas de forma significativa, para ello se realizan biopulpeos mediante la aplicación independiente de lacasa, xilanasa y endoglucanasa a diferentes muestras de fibras de bagazo de caña. Se evalúan las propiedades de las pastas (número kappa, extraíbles, lignina Klason, entre otros); posteriormente la pasta es usada para la fabricación de papel, material al que se le miden sus características físicas y mecánicas mediante pruebas TAPPI (el grado Schopper-Riegler (TAPPI T-227-om-94), el número Kappa (TAPPI T-236-om-85), la longitud de ruptura (TAPPI T-404-om-87), el factor de estallido (TAPPI T-403-om-85), el factor de rasgado (TAPPI T-414-om-88), la porosidad Gurley (TAPPI T-460-om-11), la cohesión interna o *internal bond strenght* (TAPPI T-569-om-09) y el

análisis morfológico de las fibras) a fin de comparar la efectividad de cada enzima y su contribución a las propiedades obtenidas, así como el posible impacto ambiental de cada proceso empleado.

La estructura del documento está definida de la siguiente manera: el primer capítulo incluye los conceptos básicos de la producción de papel así como las nociones preliminares que sustentan la utilización de excedentes industriales (en este caso el bagazo de caña de azúcar). Posteriormente se incluye un estado del arte de la cadena productiva involucrada en el proceso; esto es, el uso de la caña de azúcar, el bagazo y las diferentes opciones de procesamiento para la producción de papel (pulpeo mecánico, químico y termomecánico). Esta sección además incluye una descripción de las enzimas empleadas en el biopulpeo así como sus mecanismos de acción y como éstos pueden ser adaptados para su uso en biopulpeo de bagazo de caña. La sección tres, materiales y métodos, incluye la caracterización química del bagazo de caña y los detalles de procesamiento empleados en el biopulpeo así como el pulpeo alcalino. Aquí se describen cada uno de los procesos químicos empleados como la producción a escala de laboratorio usada para la obtención de papel. La sección cuatro contiene los resultados del biopulpeo, las propiedades de pulpa obtenidas con cada enzima y las propiedades de calidad del papel fabricado. Por último se presentan las conclusiones y las recomendaciones para investigaciones futuras.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1. Proceso de fabricación de papel

El papel se fabrica con las fibras de celulosa que hay en la madera o biomasa en general. Las materias primas usadas para este fin son conocidas como maderas pulpables, que generalmente son maderas blandas como la picea, el pino, el abeto y el alerce y también maderas duras como el eucalipto y el abedul (Biermann, 1996). Cuando éstas son usadas por primera vez reciben el nombre de fibra virgen y cuando se hace a través del reciclaje, es decir que se recupera el papel y se vuelve a utilizar como materia prima para fabricación de papel, recibe el nombre de fibra reciclada o secundaria. Pero en realidad se trata de la misma fibra en momentos diferentes de su ciclo de vida (ASPAPPEL 2010).

El proceso con fibra virgen se inicia con trozos de madera que provienen de los bosques talados, los cuales entran a la fábrica en donde son sometidos a una separación de la cáscara y la corteza. Luego la madera es picada en pequeñas partes o astillas y se acumula en grandes pilas a la espera de ser utilizadas (Figura 1).

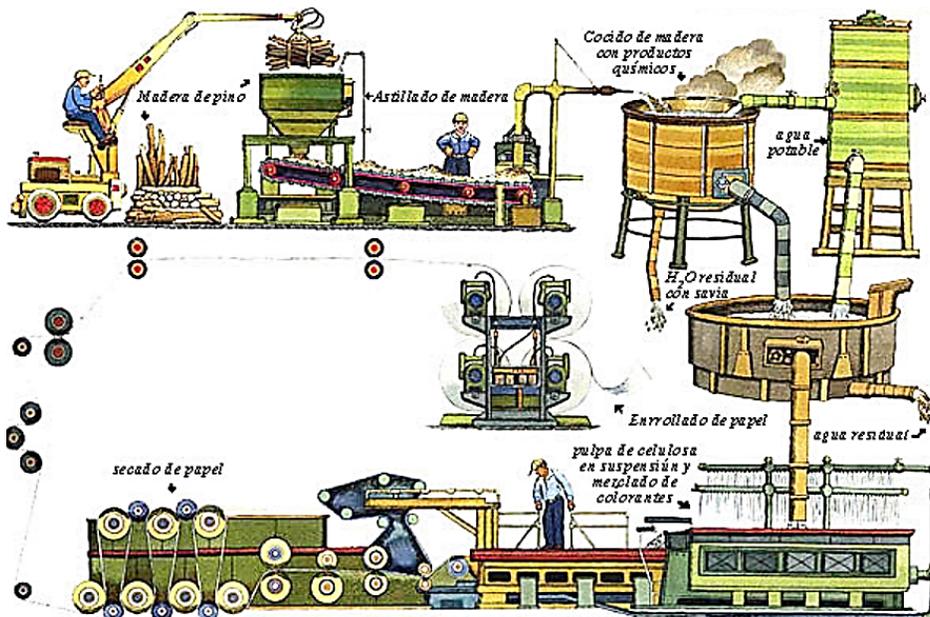


Figura 1. Proceso esquemático para la producción de papel (ASPAPPEL 2010).

Las astillas son sumergidas en un licor compuesto de agua y otros productos químicos, sulfitos o sosa cáustica para separar las fibras de la madera y obtener pasta de celulosa o pulpa química a alta temperatura (130°C y 179°C); a esta etapa se le conoce técnicamente como pulpeo. Aquí también se obtienen lignina y hemicelulosa, sustancias que se reciclan y se aprovechan en otras etapas del proceso (Sanjuán 2003). La lignina es un polímero con uniones tridimensionales cruzadas y para extraerla es necesario romper los enlaces covalentes que existen entre ella y las hemicelulosas; además, debe degradarse parcialmente a fragmentos de bajo peso molecular para ser soluble en el medio de pulpeo (deslignificación) (Ek 2009b).

Luego, la pasta de celulosa se deposita en otros tambores donde se agregan productos químicos para blanquearlas, tales como dióxido de cloro, oxígeno, peróxido, y sosa cáustica. Esto permitirá tener un papel más blanco, según el tipo de producto al que vaya destinado. Alternativamente existe el proceso Kraft o pulpeo al sulfato que emplea hidróxido de sodio (NaOH) y sulfuro de sodio (Na₂S) y que corresponde al proceso de producción más usado en la industria papelera mundial (Biermann 1996). La pulpa también puede ser producida a partir de papel de desecho y es usada mayoritariamente para hacer papel sanitario, de periódicos o material de embalaje.

La fabricación del papel se realiza en un sistema constituido por una tela sin fin que gira a gran velocidad, accionada por un conjunto de rodillos mecánicos. Sobre esta tela cae una mezcla de fibras que forman una capa que pasa por rodillos que la succionan y la secan, dando forma al papel; luego éste se rebobina y almacena (Figura 2).

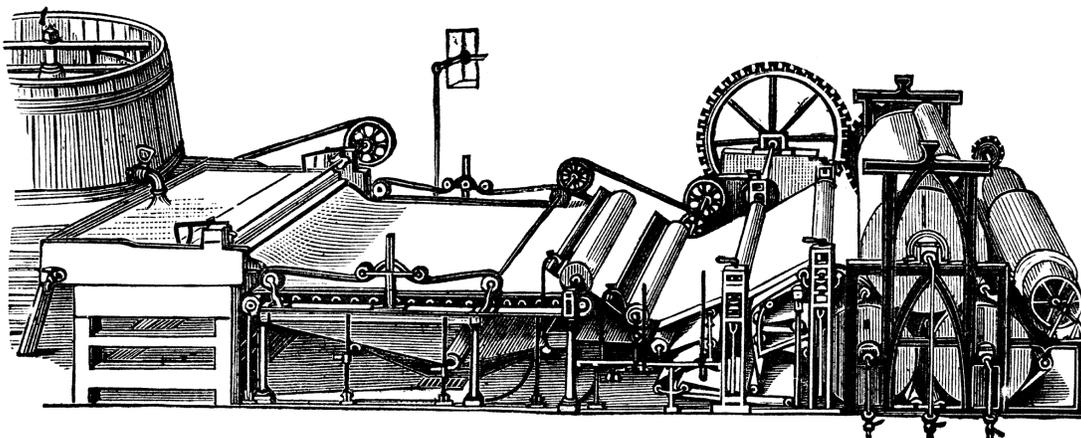


Figura 2. Fabricación de papel (Howard 1990)

A nivel de laboratorio, se fabrica papel en un formador de hojas isotrópico, como se muestra en la Figura 3.



Figura 3. Equipo para la fabricación de papel a escala de laboratorio

2.2. Principales componentes de las fibras naturales

La madera y los vegetales papeleros son materiales extremadamente heterogéneos cuya composición química, anatomía y propiedades físicas varían dentro de amplios límites. Los componentes químicos presentes en la madera y las fibras naturales se pueden clasificar en dos grandes categorías: (García Hortal, J., 1993)

- i) Constituyentes mayoritarios de la pared celular : Hidratos de carbono (celulosa y hemicelulosas) y lignina
- ii) ii) Constituyentes minoritarios de la pared y sustancias extraíbles: Insolubles (sustancias minerales, protéicas y pécticas) y extractivos (terpenos, ácidos resínicos, ácidos grasos, fenoles, insaponificables)

2.2.1. Celulosa

Es el componente principal de todas las células vegetales, el que determina el carácter de la fibra y permite su utilización en la fabricación de papel. Es un polímero completamente lineal cuya unidad monomérica es la D-glucosa que se

enlaza sucesivamente a través de un enlace glucosídico en la configuración beta. Estructuralmente, la unidad mas pequeña que se repite exactamente en la cadena es la celobiosa (García Hortal, J., 1993).

2.2.2. Hemicelulosas

Polisacáridos más complejos que la celulosa, químicamente heterogéneos, constituidos por combinaciones de monosacáridos diferentes (de cinco carbonos: xilosa, arabinosa; de seis carbonos: glucosa, manosa y galactosa). Las hemicelulosas actúan como matriz de soporte para las microfibrillas de celulosa en la pared celular.

En las hemicelulosas se encuentran los **xilanos** son un tipo de hemicelulosas y es un polisacárido constituido por una cadena lineal de residuos de xilosa y diversas ramificaciones y sustituciones. El xilano es el polisacárido más abundante después de la celulosa. La corteza de los árboles y la paja contienen hasta 30% de xilano, la madera de coníferas 7-12% y la de árboles de hojas caducas 20-25%. La cadena consta de 30-100 unidades de β -D-xilopiranosas con enlaces 1,4-glicosídicos. Algunos xilanos también presentan monómeros de arabinosa, glucosa, galactosa y glucuronato en ramas laterales unidas al C3 de la xilosa (Ek, Gellerstedt, & Henriksson, 2009).

El xilano es el componente mayoritario de la hemicelulosa. Las hemicelulosas consisten en polímeros de pentosas –xilosa, arabinosa–, hexosas –glucosa, manosa, galactosa–, o ácidos urónicos –glucurónico, galacturónico–. Son sustancias de soporte o de almacenamiento en las plantas.

El xilano es degradado más rápidamente que la celulosa. La β -1,4-endoxilanasas y la β -xilosidasas son las enzimas responsables de la hidrólisis de la cadena principal. Representan los principales componentes del sistema xilanolítico, produce xilosa, xilobiosa y oligómeros de 2 a 6 unidades. Muchos organismos producen exoenzimas capaces de degradarla. En los suelos neutros o alcalinos predominan *Bacillus*, *Sporocytophaga*, *Clostridium* y otras bacterias, y en los ácidos, los hongos filamentosos.

2.2.3. Lignina

La lignina es un polímero aromático y amorfo que se encuentra en la pared celular de las plantas leñosas. Es la responsable de la unión entre las fibras de celulosa y hemicelulosa. La Figura 4b muestra esquemáticamente la lignina (material de color rosa) y los filamentos de celulosa y hemicelulosa (color café).

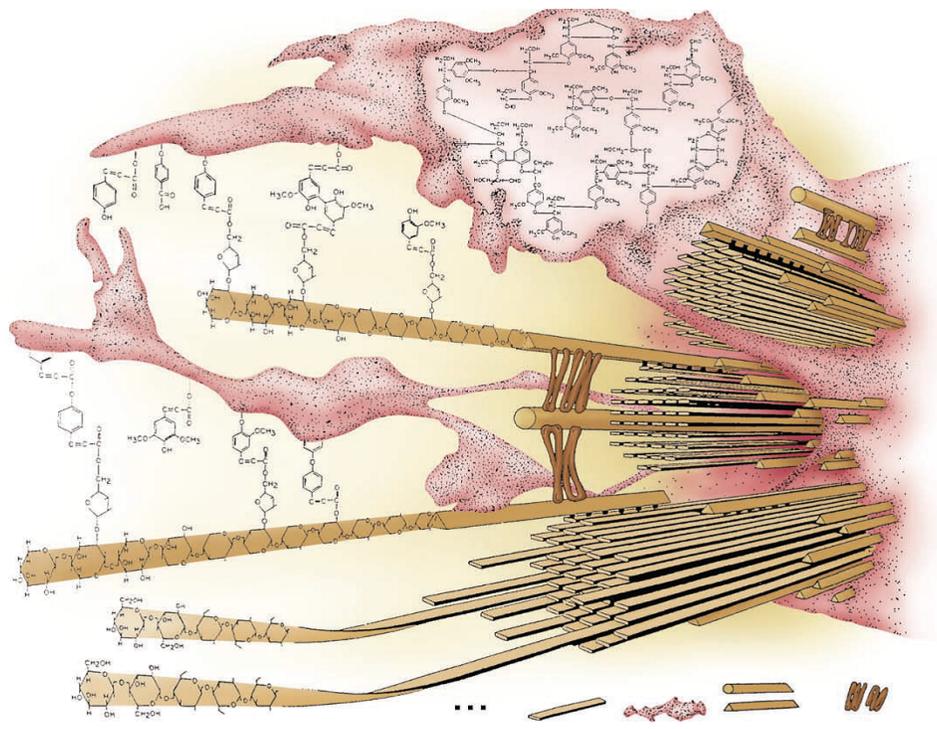
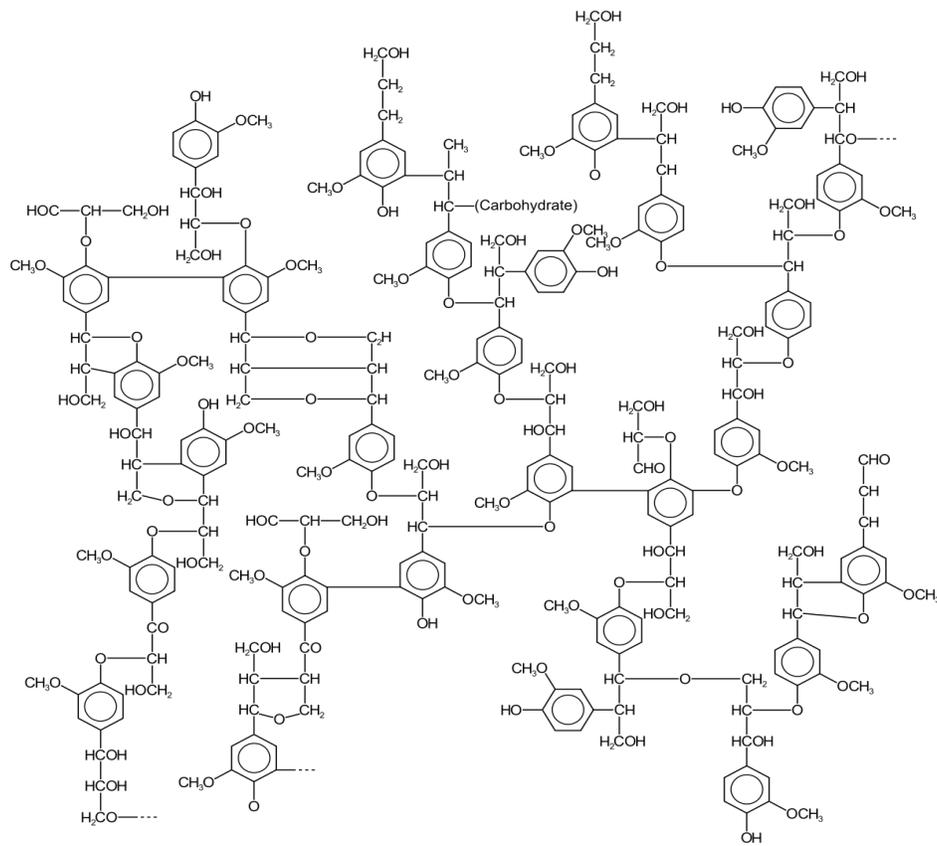


Figura 4a. Esquema de la lignina, 4b. Diagrama esquemático de la lignina (Ek et al., 2009)

La lignina es uno de los compuestos biológicos de más difícil biodegradación. Solo las bacterias y los hongos son capaces de biodegradarla (y solo después de mucho tiempo y en las condiciones adecuadas). Se caracteriza por ser un complejo aromático (no carbohidrato) del que existen muchos polímeros estructurales (ligninas). Resulta conveniente utilizar el término lignina en un sentido colectivo para señalar la fracción lignina de la fibra. Después de los polisacáridos, la lignina es el polímero orgánico más abundante en el mundo vegetal. Es importante destacar que es el único compuesto no polisacárido que se conoce (Ek et al. 2009).

La molécula de lignina presenta un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico). El acoplamiento aleatorio de estos radicales da origen a una estructura tridimensional, amorfa, característica del polímero de la lignina.

La lignina es bastante compleja en relación a su estructura y heterogeneidad, razón por la cual no es posible describir una estructura definida para ella; sin embargo, se han propuesto numerosos modelos que representan su estructura. Es insoluble en ácidos y soluble en álcalis fuertes como el hidróxido de sodio. Este polímero, que aumenta de manera ostensible en la pared celular de la planta con el curso de la maduración, es resistente a la degradación bacteriana, y su contenido en fibra reduce la digestibilidad de los polisacáridos fibrosos.

2.2.4. Factores que inciden en la degradación de componentes de la fibra y su posterior procesamiento

Durante la degradación de la pared celular de las plantas, las interacciones entre el polímero de la lignina y las enzimas o productos de bajo peso molecular implicados en su degradación no se producen al azar. En primer lugar, el ataque a la lignina en la pared celular se ve limitado por condicionantes físicos derivados de la estructura relativamente compacta de la matriz lignocelulósica y por condicionantes químicos derivados de las uniones covalentes entre los diferentes polímeros vegetales que limitan la penetración y la actividad de las enzimas y de los compuestos de bajo peso molecular involucrados en la degradación. En segundo lugar, resulta lógico imaginar que las enzimas que forman parte del sistema enzimático responsable de la degradación de la lignina, no se encuentran libres en el medio extracelular sino inmovilizadas en la vaina extracelular que rodea al micelio (Figura 5), de forma que su acción conjunta resulta optimizada

(Polef 2006). En este sentido el polisacárido extracelular secretado por el hongo parece desempeñar un importante papel al ser responsable de la inmovilización de las enzimas, tal como ha sido demostrado mediante inmunolocalización, así como de la fijación en forma de glicósidos de los productos aromáticos derivados de la degradación de la lignina que podrían repolimerizarse sobre la pared celular (Gutiérrez, Suárez & Martínez 1996). Finalmente, las enzimas intracelulares participan en reacciones rédox de productos aromáticos de bajo peso molecular.

Las deshidrogenasas miceliales parecen desempeñar un importante papel en la reducción de compuestos de tipo quinona que son tóxicos y muestran tendencia a la repolimerización. Por otra parte, el catabolismo de los productos aromáticos de bajo peso molecular en los basidiomicetos, tiene lugar a través de reacciones enzimáticas intracelulares.

A pesar del hecho que varios aspectos del esquema planteado requieren ser investigados, diferentes evidencias, en particular los pobres resultados obtenidos en los ensayos de despolimerización enzimática de la lignina en sistemas homogéneos, apoyan la existencia de un sistema natural complejo y compartimentado (incluyendo, al menos, la pared vegetal, la vaina miceliar, y el medio intracelular) que facilita la acción conjunta de las enzimas ligninolíticas y orienta las reacciones de oxidación de la lignina en el sentido de la degradación.

En este contexto el uso de hongos es una opción que ha sido usada en el pasado. No obstante, estos poseen un crecimiento lento (dos a cuatro semanas) y llevan consigo la pérdida del rendimiento debido a la degradación de los polisacáridos, además de la degradación de la lignina. Una alternativa para superar este inconveniente es el uso de enzimas aisladas. Los tratamientos enzimáticos solo tardan unas pocas horas, tiempo relativamente corto tomando como referencia el lapso de varios días requerido por los hongos. Esto hace que el proceso de biopulpeo pueda ser usado a escala industrial y económicamente factible (Zhao et al. 2002).

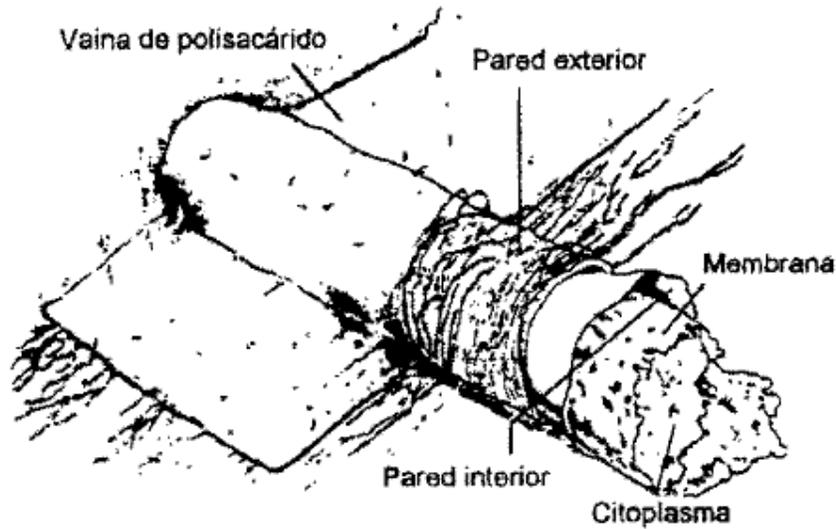
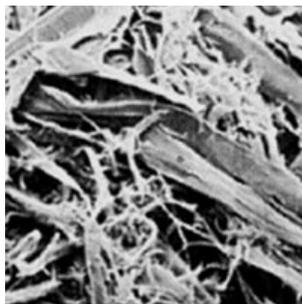


Figura 5. Esquema de una hifa fúngica, con su vaina de polisacárido creciendo sobre un sustrato sólido (Velázquez 2014).

2.3. Pulpeo

Las fibras de celulosa dan resistencia a la madera son separadas mediante el proceso de pulpeo. Esta dispersión puede lograrse de distintas maneras. La madera puede ser triturada mecánicamente y luego humedecida. Este tipo de pastas producidas mecánicamente se destinan a la producción de papeles que no tienen grandes requerimientos de resistencia, como papeles de periódico. También puede ser triturada usando vapor, generando las llamadas pulpas termomecánicas. Si además se agregan sustancias químicas, se obtienen las llamadas pulpas quimicotermeomecánicas (Figura 6).



a)



b)

Figura 6. Tipos de pastas obtenidas mediante pulpeo a) Pasta Mecánica. b) Pasta Química (Villar 1999)

Cualquiera que sea el método usado, el éxito del proceso (cocción satisfactoria o rechazo de la cocción) se mide a través de la impregnación y difusión de los materiales diluyentes al interior del material fibroso. La impregnación depende del tamaño de los poros del material fibroso y de las fuerzas capilares, mientras que la difusión está regulada sólo por el área total de los poros. Una vez concluida esta etapa, ocurre la adsorción de los iones del reactivo en la superficie de los constituyentes químicos del material fibroso (Ek 2009b).

Tal como se explicó en la sección 2.2.1, una vez se dan las condiciones para el desarrollo de la reacción, es posible fragmentar la macromolécula de la lignina a través de los enlaces éter de los carbonos α y β que la componen. Sin embargo, cuando hay una cocción en medio alcalino, las reacciones de deslignificación no son únicas, y de manera simultánea se llevan a cabo la despolimerización de los polisacáridos (hemicelulosas) y la saponificación de grasas y ceras (extraíbles). Al concluir la reacción los productos sufren una desorción ocurriendo un transporte de los productos de la reacción al exterior del material fibroso, quedando disueltos los componentes de la fibra en el licor (Baldrian, 2006).

Este líquido, llamado licor negro, está compuesto por los reactivos presentes en la cocción que no alcanzan a reaccionar, además de lignina, celulosa solubilizada, hemicelulosas, aceites vegetales y sales de ácidos grasos que se forman en el digestor, así como otras cargas inorgánicas (Ortíz 2009). Este licor presenta valores altos de pH (12 a 13) y además exhibe una alta DQO (Demanda Química de Oxígeno), alrededor de 70.000 mg O₂/L, lo que hace que sea un residuo altamente contaminante (Pérez, Delgado, & González 2011).

El rendimiento logrado en la degradación de las fibras a través de este proceso químico se mide estableciendo una relación entre la masa original de la fibra antes y después del tratamiento. Para ello, una vez finalizada la cocción, se separa la pulpa del licor residual. La pasta se lava con agua para eliminar el licor residual mientras que el licor negro se capta en evaporadores para su posterior utilización como subproducto del proceso (Baldrian 2006).

Las variables de este proceso, que tienen más influencia en las propiedades de la pulpa, son la cantidad de reactivos inorgánicos, el tiempo y la temperatura de cocción así como el tipo, tamaño y calidad de la materia prima fibrosa obtenida.

Por su parte, la cantidad de reactivos inorgánicos determina la cantidad de lignina removida. No obstante, una alta cantidad de reactivos puede degradar carbohidratos como la celulosa; por el contrario, si este valor es bajo, evidencia que

la disolución de lignina fue limitada. Es por esta razón que la dosificación de reactivos se establece en función de la cantidad de lignina que se desea eliminar.

Por otro lado, en el control y reacciones del proceso de cocción se tienen en cuenta el tiempo y la temperatura. Éstas pueden ser manejadas conjuntamente mediante el hidromódulo o "Factor H". Este valor indica la velocidad relativa de la disolución de lignina. La dependencia de la temperatura del factor H es bastante alta debido al efecto de ésta en la deslignificación. Aún una diferencia de un par de grados en la temperatura de cocción puede hacer una gran diferencia en la calidad de la pulpa. El factor H o Hidromódulo se define como la relación entre la cantidad de licor y el material fibroso (en base seca) que se alimenta al digestor (Sanjuán 2003).

2.3.1. Pulpeo mecánico

El pulpeo mecánico es un proceso de desfibrado únicamente mecánico. Por ello en este proceso se elimina poca cantidad de lignina y hemicelulosas por lo que se logran los rendimientos más elevados, superando el 90% (Aguilar-Rivera 2011). Existen dos tipos de procesos para obtener dicha pasta: el desfibrador de muelas y los refinadores de discos. En los desfibradores de muelas como se muestra en la Figura 7, los troncos o astillas de la madera se prensan con una rueda moledora. Esta abrasión separa los haces de fibras dando lugar a hilos individuales pero la lignina no se degrada y mantiene unidas dichas fibras por lo que se dan los altos rendimientos.

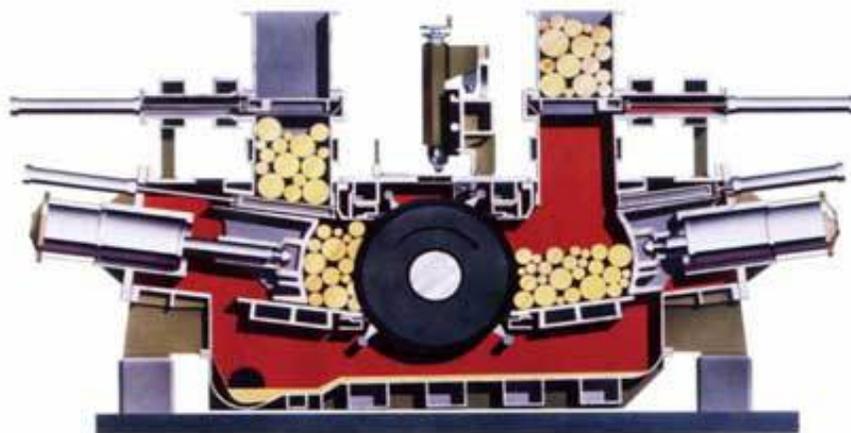


Figura 7. Desfibrador de muelas (Sandas & Lönnberg, 1990)

Por otra parte, en los refinadores de discos (Figura 8) las virutas de la madera, después de mezclarse con un gran volumen de agua, son introducidas entre dos discos giratorios para su separación. Aunque en este caso el rendimiento es ligeramente inferior que en el desfibrador de muelas, la pasta obtenida tiene una calidad superior respecto a las propiedades fisicomecánicas.



Figura 8. Desfibrador de discos (Sandas & Lönnberg, 1990)

Actualmente existe otro tipo de pulpeo que está tomando fuerza, es el pulpeo termo-mecánico (TMP, por sus siglas en inglés). En este proceso las virutas de la madera se introducen en un digestor, mezcladas con agua. En el digestor se realiza un tratamiento con vapor y presión que suaviza las fibras y facilita la desfibración mecánica posterior (Ek 2009a).

En la unidad de procesamiento termomecánico (Figura 9) las astillas de madera se someten a vapor de agua a presiones de entre 6 y 10kg/cm², lo que corresponde a una temperatura de entre 165 y 185°C. Si se consigue acoplar perfectamente la sección de vaporizado con el refinador mecánico, el proceso de refinado tendrá lugar a las mismas condiciones de presión y temperatura. En estas condiciones la lignina se debilita enormemente y las fibras quedan casi totalmente separadas. Las fibras separadas a estas temperaturas no solo no sufren daño alguno, sino que quedan recubiertas con una delgada capa de lignina, depositada tras el enfriamiento, que las endurece. Este recubrimiento crea una superficie suave en la fibra, lo que produce que cualquier intento de fibrilación resulte muy difícil, por lo que este proceso no es adecuado para la obtención de papel, pues la cohesividad

entre fibras es baja. No obstante la hace óptima para la fabricación de tableros para construcción, pues la resistencia individual de las fibras es muy alta, gracias a la resistencia transferida por la capa de lignina. Para la obtención de papel a partir de este proceso no puede sobrepasarse la temperatura de transición vítrea de la lignina (Matias 2005).

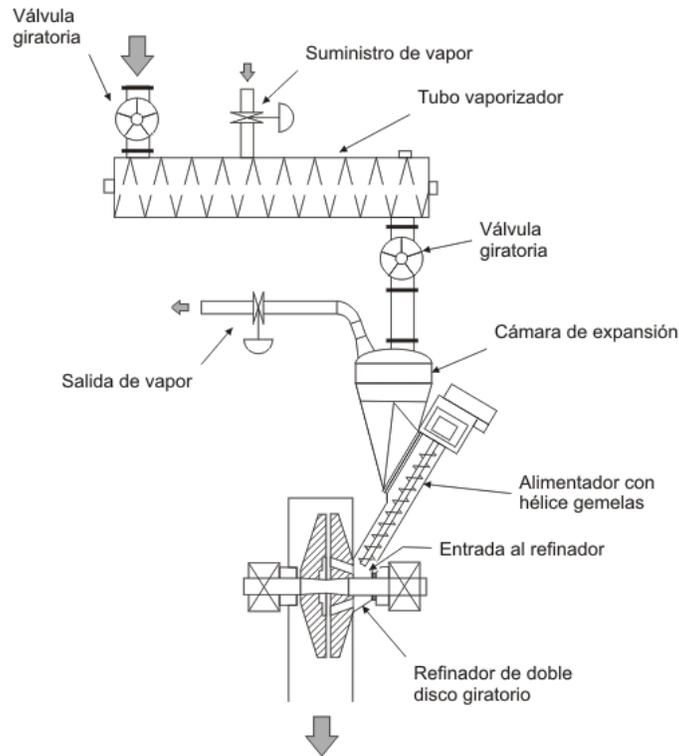


Figura 9. Sistema de producción termomecánica de pulpa (Zanutti 2006)

Los papeles que se obtienen por tratamiento mecánico se caracterizan por su tendencia a amarillear (debido a la presencia de lignina en las mismas), un elevado volumen específico y alta opacidad (Sandas & Lönnberg 1990).

2.3.2. Pulpeo químico

En el pulpeo químico la cocción de las fibras se desarrolla en dos etapas, la primera es una rampa de aumento de la temperatura donde se impregnan los reactivos y la segunda, a temperatura constante, en donde se genera la separación de los compuestos deseados. En la cocción, se da la penetración del licor en las cavidades porosas de la materia prima fibrosa y la difusión de los reactivos presentes en el

licor. La velocidad de penetración depende del gradiente de presión existente en el sistema y es comparativamente rápida, mientras que la difusión está controlada por la concentración de los reactivos disueltos y ocurre más lentamente (Urias 1996). Todo este proceso se lleva a cabo en recipientes llamados digestores.

El pulpeo químico puede realizarse por varias técnicas, en las que se emplea sosa cáustica (sosa), bisulfitos y sulfatos. El proceso a la sosa se utiliza generalmente para el pulpeo de materias primas no leñosas que por sus características requieren un menor tiempo de cocción que el de la madera, como por ejemplo el bagazo de caña, paja de cereales y sisal, entre otros (Sanjuán 2003). Este proceso consiste en someter la pulpa a un proceso de cocción con la sosa cáustica en una proporción entre el 10% al 15%, referido al material fibroso en base seca, vapor saturado a una temperatura de 160 a 170°C y tiempos de cocción entre 2 y 5 horas.

El procedimiento al sulfato (también llamado pulpeo Kraft), es de los más exitosos y usados en la industria por la notable fuerza que adquieren las pulpas respecto a otras tecnologías. Además, el pulpeo Kraft puede utilizarse tanto en maderas duras como suaves y tolera contaminantes como las resinas de la madera. Esta técnica consigue una reducción de los niveles de lignina hasta el 90% alcanzando así un alto nivel de blanqueado sin degradación de la pulpa. En él se utilizan agentes químicos como NaOH y Na₂S, compuestos que tienen la ventaja de ser económicos y ser fáciles de recuperar. Las temperaturas de los procesos Kraft oscilan entre los 140°C y 190°C y se desarrollan en rangos de tiempo entre las dos y tres horas.

De manera similar es posible emplear otra técnica química, procedimiento al bisulfito, que generalmente es utilizado para pulpas no resinosas. Este se basa en soluciones de ácido sulfuroso (H₂SO₃) y de ion bisulfito (HSO₃⁻) para degradar los enlaces de lignina de las fibras de la madera; se desarrolla en autoclaves verticales de gran capacidad donde se añade la solución de bisulfito a temperaturas entre los 110°C y 130°C y por un tiempo entre 12 y 16 horas.

Las maderas duras emplean concentraciones que van desde el 20% al 25% de NaOH, para el pulpeo de bagazo de caña se requieren valores entre el 2.5% y 10%. Esto se debe a que la lignina presente en el bagazo de caña es mucho más reactiva al tener más unidades de guayacilo e hidroxifenil y ser más sensible al ataque alcalino (Ek 2009a).

2.3.3. Biopulpeo

La industria papelera en su búsqueda de una producción sostenible que conserve el medio ambiente ha incluido la biotecnología para transferir conocimientos en la producción de pulpa (biopulpeo), blanqueo de pulpa Kraft (bioblanqueo), eliminación del pitch y de stickies. Algunas de estas aplicaciones, como la eliminación del pitch o el blanqueo mejorado con xilanasas, ya se han probado en la industria. Otras, como el biopulpeo plantean aún dudas sobre su viabilidad.

Se sabe que los principales responsables de la pudrición natural de la madera son los hongos. Sus diferentes especies pueden atacar la madera de formas variadas, pero se han identificado tres tipos de pudrición que se conocen como pudrición blanda, parda y blanca. La primera de ellas está producida principalmente por hongos ascomicetos y deuteromicetos; se da en condiciones de elevada humedad y se caracteriza por la aparición de micelio en la pared secundaria de la fibra de cavidades cilíndricas. El nombre deriva del reblandecimiento producido en la superficie de la madera. Los hongos degradan la celulosa y hemicelulosas y su modo de actuación es el ataque superficial de las fibras y su penetración hacia el interior una vez destruida la primera capa (Ek 2009b).

La pudrición parda es causada por hongos de los géneros *Lentinus* y *Phellinus*, entre otros. Degradan la celulosa y las hemicelulosas y dejan casi inalterada la lignina o provocan en ella degradaciones como la desmetoxilación de sus anillos fenólicos. El enriquecimiento en lignina hace que la madera tome el color pardo que da nombre a esta clase de pudrición. Las hifas de estos hongos se encuentran en el lumen de la fibra desde donde pueden penetrar a otra fibra contigua a través de las punteaduras o por perforaciones causadas por su efecto. El modo de ataque es por tanto desde la pared secundaria hacia la primaria y es más frecuente en las especies coníferas (Villar 2008).

La pudrición blanca, causada principalmente por hongos basidiomicetos, afecta a todos los componentes mayoritarios de la madera: celulosa, hemicelulosas y lignina y con preferencia a las maderas de especies frondosas (angiospermas). Este tipo de pudrición es la que centra el mayor interés del biopulpeo, en especial con aquellos hongos que muestren un comportamiento más selectivo, degradando lignina y dejando lo más inalteradas posible las cadenas de polisacáridos.

La principal conclusión a extraer de este proceso natural es la posibilidad de que los hongos de pudrición blanca degraden la lignina, aunque se habrá de procurar que el ataque se produzca de forma selectiva para no dañar la estructura de la celulosa y permitir su uso papelero. Por ello conviene diferenciar entre los hongos

de podredumbre blanca que degradan a la vez la celulosa y la lignina, como *Phanerochaete chrysosporium* y aquellos otros que degradan preferentemente lignina. Entre estos últimos se encuentran especies de los géneros *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Phellinus* e *Inonotus*. Este tipo de hongos degrada la lignina a través de reacciones oxidativas cuyo resultado final es la despolimerización. Los productos de bajo peso molecular que se liberan pueden a su vez ser metabolizados hasta el máximo grado de oxidación: CO_2 y H_2O (Gonçalves, Moriya & Saad 2008).

Su selectividad para degradar lignina ha despertado el interés de los que buscan un pulpeo o blanqueo por medios biológicos, ya que ésta se debe a la producción de las enzimas Mn peroxidasa y lignina peroxidasa. En la naturaleza la lignina es degradada por enzimas como las lacasas, celulasas, xilanasas, entre otras, que son producidas por los hongos de podredumbre blanca, algunos de ellos son: *Coriolus hirsutus*, *Coriolus pubescens*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta* y *Phellinus hirsutus*; este proceso de degradación con microorganismos o con enzimas comerciales se conoce como biopulpeo (Ramos, Young & Zúñiga 2001).

La mayoría de los hongos en su ataque a la lignina también degradan la celulosa y hemicelulosa, pero ciertas especies y bajo ciertas condiciones presentan selectividad hacia la degradación de lignina (Sampedro, Carbajo & Villar 2011), donde ésta es catalizadora de la oxidación de fenoles y polifenoles a aminas aromáticas.

Este proceso, que ocurre de forma natural, ha sido aprovechado en la producción de pulpa para papel, facilitando el proceso de pulpeo por la capacidad de estos microorganismos para despolimerizar la lignina y degradar extractivos lipofílicos, dejando la celulosa y hemicelulosa intactas; en el caso del uso directo de enzimas, las más usadas son las xilanasas, éstas tienden a degradar los enlaces químicos que unen la lignina a las fibras facilitando así su remoción (Villar 2008).

El biopulpeo, puede mejorar las condiciones de las pastas en cuanto a blancura, índice de rasgado, entre otras propiedades. Akhtar y colaboradores realizaron estudios donde trataron material lignocelulósico de pino con hongos de pudrición blanca bajo condiciones controladas, facilitando la etapa de pulpeo, y encontraron que usando *Coriolus hirsutus* alcanzaron un porcentaje de blancura del 41.4% con respecto al control del 45% (el control es material lignocelulósico sin tratamiento por microorganismos). Del mismo modo se logró un índice de desgarrado de $3\text{mNm}^2/\text{g}$ con respecto al control de $4\text{mNm}^2/\text{g}$ (Akhtar & Kirk 1995).

Las ventajas del biopulpeo incluyen la reducción de energía en la refinación de la pasta de hasta un 66% para maderas de especies frondosas, entre el 30% y el 35%

para especies coníferas y hasta un 27% para especies no maderables. Con relación al tiempo de proceso y el número Kappa se logra una disminución de hasta el 40% y el 55.25% respectivamente, lo que reduce el impacto ambiental en la elaboración de pulpa y los costos de fabricación (Ramos et al. 2001). Otros efectos positivos del biopulpeo son el aumento de la deslignificación y la reducción del tiempo de cocción posterior al biopulpeo (Villar 2008).

2.3.4. Blanqueo

La etapa de blanqueo se aplica para eliminar las sustancias cromóforas que puedan dar color a las fibras, con el fin de conseguir un índice de blanco superior. Esta transformación se hace con el fin de mejorar la apariencia física del papel y se puede hacer de tres formas diferentes. La primera de ellas supone el uso de cloro elemental, siendo por tanto el sistema más tóxico. Está prohibido en la Unión Europea y se ha reducido mucho en el resto del mundo: en 1990 se usaba en un 94.5% de pasta química blanqueada y en 2005 en un 10.5%. Por otra parte se emplea dióxido de cloro siendo la técnica más usada en la actualidad, esto es, en 84% de la pasta química a nivel mundial, y se identifica por las siglas ECF. Finalmente el procedimiento sin cloro, en el cual el agente blanqueador suele ser agua oxigenada e hidrosulfito sódico (un químico no tóxico). Se identifica por las siglas TCF en el caso del papel virgen y PCF en el caso del reciclado. Aún es el sistema más minoritario: 5.5% en todo el mundo. Los fabricantes dedicados exclusivamente a fabricar papel reciclado suelen blanquear sin cloro, o bien no blanquear (Zanutti 2006).

Mayoritariamente, la industria papelera considera que el método ECF genera un nivel de contaminantes suficientemente bajo como para ser considerado no peligroso. Además de evitar el uso de cloro, el método TCF requiere menos agua, esta agua se puede reutilizar dentro del proceso y es más fácil (y menos costoso energéticamente) tratar las aguas residuales. Quizás la industria es reticente a abandonar del todo el cloro en parte para ahorrarse el coste de reconvertir las instalaciones y en parte por presiones de la industria química (Urias 1996).

Según la plataforma PulpWatch, una iniciativa formada por las organizaciones Environmental Paper Network y Borealis Centre for Environment and Trade Research, en los países mediterráneos se encuentran ubicadas diez empresas papeleras, concretamente en Marruecos, Portugal, Andorra, España y Francia. De todas ellas, sólo dos utilizan procesos totalmente libres de cloro (TCF o PCF); tres

utilizan técnicas ECF mejoradas, y las cinco restantes siguen utilizando antiguas tecnologías ECF para blanquear la pasta (Pulp Watch 2014).

2.4. Enzimas empleadas en el biopulpeo

Como se describió en la introducción, las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posibles: una enzima hace que una reacción química que es energéticamente posible, pero que transcurre a una velocidad muy baja, sea cinéticamente favorable, es decir, transcurra a mayor velocidad (Stryer 1998).

Otras enzimas empleadas en el biopulpeo son las **endoglucanasas** (1,4- β -D-glucan 4-glucanohidrolasas), que producen una disminución en el grado de polimerización de la celulosa, por cortes al azar de la cadena glucosídica, produciendo glucosa, celobiosa (disacáridos) y celotriosa (trisacáridos). Los sustratos sobre los que actúan las endoglucanasas incluyen carboximetilcelulosa, celulosa amorfa, celooligosacáridos; que no atacan de forma significativa a la celulosa cristalina (Barreto 2008), dado que estas enzimas reducen el grado de polimerización de la celulosa y se puede utilizar para simular la acción del pulpeo, de ahí el nombre de biopulpeo.

La celulosa es atacada inicialmente por la endoglucanasa, la cual se liga al azar sobre las microfibrillas de celulosa en regiones amorfas, produciendo hidrólisis de los enlaces β -1,4-glucosídicos, generando así múltiples sitios de ataque para las exo-1,4- β -D-glucanasas, las que actúan sobre los extremos no reductores de la cadena, rompiendo una unidad de celobiosa. Existe una cooperación continuada entre la acción de ambas enzimas y la de la β -glucosidasa, la cual actúa sobre la celobiosa o también sobre pequeños oligómeros, produciéndose así moléculas de glucosa.

2.5. Parámetros básicos de las propiedades de la pulpa y el papel

Las normas TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry), son normas desarrolladas de los estándares ANSI (American National Standards Institute) que aseguran que los productos cumplen con las mejores prácticas de la industria de Pulpa y Papel.

En la Tabla 1 se muestran las normas TAPPI empleadas en la caracterización de las fibras, pulpa y papel que se realizaron en esta investigación.

Tabla 1. Descripción de las normas TAPPI

Medio de Análisis	Análisis	Norma Tappi No.	Descripción
Fibras	Extraíbles orgánicos	T-264-om-97	Retira con solventes las sustancias orgánicas de las fibras
	Extraíbles acuosos	T-207-om-93	Retira con agua caliente las sustancias solubles de las fibras
	Lignina Klason	T-207-om-88	Determina la lignina insoluble en ácido presente en las fibras
	Porcentaje de cenizas	T-211-om-93	Determina el material inorgánico no combustible presente en las fibras
	Número Kappa	T-236-om-85	Es una indicación del contenido residual de lignina en las fibras
Pulpa	Grado Schopper Riegler	T-227-om-94	Es el grado de drenabilidad de las pulpas
	Longitud de ruptura	T-404-om-87	Es la longitud máxima, de área de la sección transversal, que puede ser suspendida sin ruptura bajo su peso en tensión
Papel	Factor de estallido	T-403-om-85	Es la presión hidrostática necesaria para producir la ruptura del papel
	Factor de rasgado	T-414-om-88	Es la capacidad de un papel para resistir a la ruptura cuando se somete a un jalón
	Porosidad Gurley	T-460-om-11	Es el tiempo en el que un volumen de aire (100mL) atraviesa el papel a una presión controlada y en un área determinada
	Cohesión interna	T-569-om-09	Se mide la resistencia de adhesión al cizallamiento de una probeta, de área definida, unida al equipo mediante un adhesivo

2.6. Rendimientos típicos en la fabricación del papel

La industria de la pulpa y el papel utiliza sobrantes de los aserraderos, ramas, copas de árboles y materiales descartados en los procesos de criba. La madera talada del bosque incluye dos partes bien diferenciadas: una interna, compuesta por fibra de celulosa de gran utilidad, y una capa externa de corteza. La corteza reduciría la calidad del papel si se mantuviera en el proceso de fabricación de pasta, por lo que se extrae antes de iniciar este proceso. La corteza constituye un importante biocombustible (Robles 2012).

A partir de aquí, la madera descortezada puede seguir distintas rutas en la producción de pulpa papelera. La pulpa mecánica puede elaborarse siguiendo

diferentes métodos que emplean aproximadamente el 98% del volumen de la madera en la producción de una pulpa de alta opacidad. La pasta química se elabora, como se mencionó anteriormente, extrayendo la lignina de la madera. Al eliminar la lignina, el rendimiento del volumen de madera disminuye entre el 45% al 65% resultando en fibras de buena resistencia y baja opacidad en papel (Robles, J., 2012). Esto significa que para elaborar una tonelada de pulpa química blanqueada se requieren 120.000 litros de agua, alrededor de 20 árboles de una plantación o su equivalente, 4.8 metros cúbicos de madera, y 1.2Megavatios/hora de electricidad (Andi 2010). Los rendimientos de acuerdo a los diferentes procesos de manufactura se pueden ver en la Figura 10.

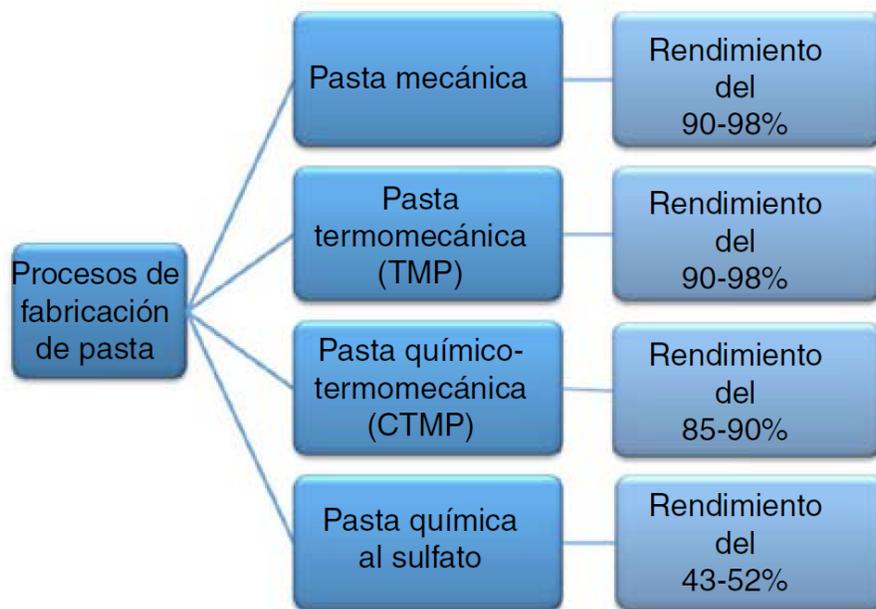


Figura 10. Rendimientos típicos en el procesamiento de papel (Grant 1996)

2.7. Impacto ambiental

Las fábricas de pulpa y papel emplean grandes cantidades de agua durante el proceso de preparación de la madera mediante la remoción húmeda de la corteza. Esta es la manera más eficiente de quitar la corteza, disminuir las pérdidas de madera y mitigar la cantidad de tierra. Los parámetros más importantes que se relacionan con el control de la contaminación durante la remoción húmeda de la corteza son los sólidos totales suspendidos, la demanda bioquímica de oxígeno(DBO), el pH, el color, y la toxicidad (Banco Mundial 1991).

Al utilizar fibras no ligníferas, como paja, rafia brava y bagazo, se elimina el problema de la corteza, pero se requiere un pretratamiento de lavado para eliminar la tierra, arena, y la médula del bagazo. Todos los diferentes procesos de reducción a pulpa generan corrientes sustanciales de aguas servidas, que tienen que ser tratadas y tanto como sea posible, recicladas; la mayoría de los procesos producen contaminación atmosférica (Grant 1996).

Los impactos negativos sobre el medio ambiente (ej. la degradación de los bosques naturales y tropicales), como resultado del uso de los recursos ligníferos para alimentar las fábricas, ha causado graves problemas de erosión del suelo, manejo de cuencas hidrográficas y pérdida o degradación del hábitat forestal. Al convertir los bosques al monocultivo, las plagas pueden expandirse incontrolablemente. Este método requiere pesticidas y/o herbicidas, los mismos que causan efectos toxicológicos en los organismos beneficiosos (Banco Mundial 1991). Una alternativa emergente que permitiría reducir la deforestación supone el uso de residuos agroindustriales, es decir incluir en la elaboración de las pulpas fibras de cereales, pajas o bagazo de caña (Carrere 2008).

El bagazo de caña de azúcar (Figura 11) es un material lignocelulósico constituido principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Se obtiene como subproducto o residuo agroindustrial en los ingenios, después de la extracción del jugo de la caña de azúcar y representa aproximadamente entre el 25% y el 40 % del total de la materia procesada (Triana et. al. 1992).

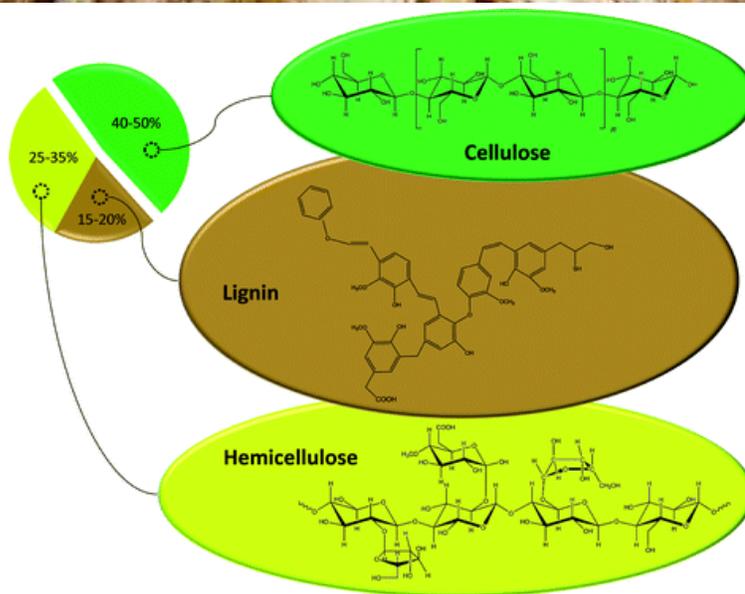


Figura 11. Bagazo de caña de azúcar. a) Residuo agroindustrial. b) Composición (Alonso, Bond, & Dumesic 2010).

En Colombia, en el año 2013 se obtuvieron 6.47 millones de toneladas de bagazo de caña (Asocaña 2014), que es usado principalmente para la obtención de energía, la realización de suplementos nutricionales para rumiantes y la elaboración de pulpas en la industria papelera.

Su procesamiento para la producción de papel se hace de manera análoga al de la madera y también trae consigo la formación de residuos que afectan al medio ambiente (Asocaña 2011). El tratamiento enzimático realizado en las fibras de bagazo de caña, previo al pulpeo químico, pretende reducir la carga contaminante

en un 40% y los tiempos de residencia en el pulpeo químico en un 33.5%. Este proceso mitiga las cargas contaminantes de los efluentes e indirectamente la deforestación y extinción de las especies (Carrere 2008).

La inclusión de fibras alternativas en la industria papelera, como las provenientes de bagazo de caña, constituyen un importante factor en el área ambiental. Al ser estas fibras residuos de otros procesos, se estaría dando valor agregado a los mismos, evitando su disposición en rellenos o sitios inapropiados y la contaminación de fuentes subterráneas o emisiones de gases, generados por la descomposición de dichos residuos que se producen al estar en contacto con el ambiente (Pachón, Tovar & Martínez 2005).

2.8. Caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una gramínea tropical, un pasto gigante emparentado con el sorgo y el maíz en cuyo tallo se forma y acumula un jugo rico en sacarosa. La sacarosa es sintetizada por la caña a partir de la fotosíntesis, constituye el cultivo de mayor importancia desde el punto de vista de la producción azucarera, además representa una actividad productiva y posee varios subproductos, entre ellos la producción de energía eléctrica derivada de la combustión del bagazo, alcohol de diferentes grados como carburante o farmacéutico (Triana et. al. 1992).

La parte esencial para la producción de azúcar lo constituye el tallo, dividido en nudos y entrenudos. El largo de los entrenudos cambia según las variedades y el desarrollo de la planta. El tallo está compuesto por una parte sólida llamada fibra y una parte líquida, el jugo, que contiene agua y sacarosa, Figura 12.

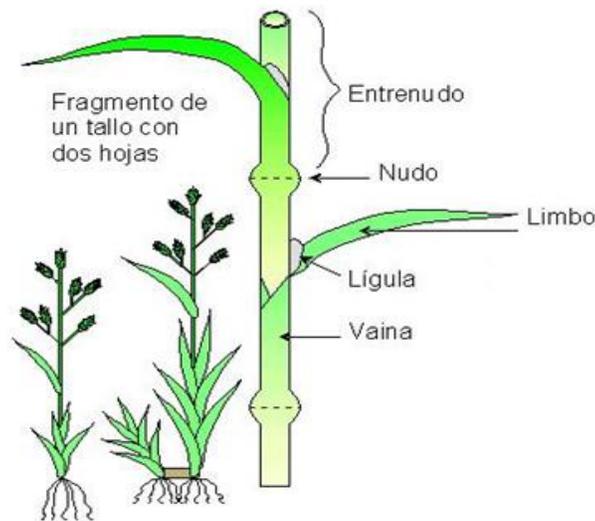


Figura 12. Tallo de caña de azúcar (Portocarrero, E., 2002).

En la fibra y en el jugo también se encuentran otras sustancias como agua, sacarosa y fibra tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales componentes del tallo de caña de azúcar.

Componente	% del tallo
Agua	73-75
Sacarosa	8-15
Fibra	11-16

Fuente: (Portocarrero 2002)

La proporción de cada componente varía de acuerdo con la variedad de la caña, edad, madurez, clima, suelo, método de cultivo, abonos, lluvias, riegos, etc. La sacarosa del jugo es cristalizada en el proceso industrial como azúcar y la fibra constituye el bagazo una vez molida la caña. Otros constituyentes en cantidades menores se encuentran en la Tabla 3 (Portocarrero 2002)

Tabla 3. Otros constituyentes de la caña presentes en el jugo.

Componente	% del jugo
Glucosa	0.2-0.6
Fructosa	0.2-0.6
Sales	0.3-0.8
Ácidos orgánicos	0.1-0.8
Otros	0.3-0.8

Fuente: (Portocarrero 2002)

En Colombia, para el año 2011 se estimó un rendimiento de 92 toneladas de caña por hectárea plantada (ASOCAÑA. Asociación de Cultivadores de Caña de Azúcar de Colombia, 2011b); el área total cultivada de caña de azúcar fue de 171.421 hectáreas, 78% de las cuales se encontraron en el departamento del Valle del Cauca, el 19% en Cauca, 1.6% en Risaralda y 1.3% en Caldas (CENICAÑA, 2011). Se observó un crecimiento sostenido entre 2.8% y el 3.8% en las hectáreas plantadas de caña de azúcar (OBSERVATORIO AGROCADENAS, 2011) y el país ocupó el puesto 11 entre los mayores productores de azúcar del mundo con 1.05 millones de toneladas exportadas por año; adicionalmente, la introducción de cultivos de caña de azúcar para la producción de etanol carburante convierte al país en el cuarto productor de bioetanol de América luego de Estados Unidos, Brasil y Canadá. La mezcla promedio de gasolina y etanol para Colombia llega al 8,5%; si adoptaran medidas similares a las de Brasil, país donde la mezcla obligatoria para la gasolina está entre 20% y 25% de etanol (Embajada de Brasil en Colombia 2011), y se cuentan con vehículos que utilizan únicamente el etanol como combustible, se podría tener una industria alcoholera con una capacidad 6 veces mayor a la actual (Asocaña, 2011).

En Colombia el principal uso de esta planta va dirigido a la producción de azúcar. Dentro de los productos que pueden ser obtenidos a partir de la caña de azúcar están: azúcar crudo, refinado y blanco, empleados en el consumo directo, la industria de alimentos y sucroquímica, producción de alcoholes, entre otros. Como productos intermedios están: bagazo, cachaza, melaza entre otros, destinados a la producción de papel, como abono de plantas y alimentación animal respectivamente (Fernández 2000).

2.9. Bagazo de caña de azúcar

De los subproductos de la caña, el bagazo es de los de mayor interés debido a su utilización como combustible (poder calorífico de 18.322 kJ/kg) y la posibilidad de obtener otros productos de alto valor agregado, como en la producción de pulpa para papel. En Colombia, de las seis millones de toneladas de bagazo producidas al año por los ingenios, un 85% es utilizado como combustible y el restante 15% es materia prima para la industria productora de papeles local. Se espera, que con el desarrollo de nuevas tecnologías para calderas que queman bagazo y las buenas prácticas de manufactura se pueda obtener hasta un 30% de bagazo excedente si se compara con el bagazo necesario para abastecer de energía a las plantas de producción de azúcar y etanol (Asociación de Cultivadores de Caña de Azúcar de Colombia, 2011).

El bagazo de caña está compuesto químicamente por celulosa 45%, pentosanos 25%, lignina Klason 20.7% y otros componentes que se encuentran en bajas concentraciones como los extraíbles (en solventes 2.7%) y sustancias inorgánicas (cenizas 2.6%) (Sanjuán 1997).

En las Tabla 4 y Tabla 5 se presenta la composición química para el bagazo integral y para sus dos principales fracciones constituyentes, la fracción fibrosa y la médula.

Tabla 4. Composición química porcentual del bagazo de caña

Constituyente	Bagazo Integral (%)	Fracción Fibrosa (%)	Fracción Médula (%)
Celulosa	45	47.7	41.2
Pentosanos	25	25	25
Lignina Klason	20.7	19	21.7
Extractos alcohol-benceno	2.7	2.4	2.9
Solubles agua caliente	4.1	3.4	4.3
Solubles agua fría	2.2	2.2	3
Solubles NaOH al 1%	34.9	32	36
Cenizas	2.6	1.4	5.5

Fuente: (Sanjuán 2003)

Tabla 5. Componentes del bagazo de caña

Componentes	% de bagazo (base seca)	
Polisacáridos fácilmente hidrolizables	28.8 ± 0.4	
Furfural potencial	15.2 ± 0.4	
Polisacáridos difícilmente hidrolizables	43.9 ± 1.3	
Lignina	20.3 ± 1.4	
Humedad	10.2 ± 0.2	
Cenizas	2.13 ± 0.07	
Cenizas activas	0.46 ± 0.03	
Extraíbles con alcohol-benceno	2.76 ± 0.13	
Reductores solubles en agua caliente	0.5	
Análisis de los monosacáridos	(%)	
Polisacáridos fácilmente hidrolizables	Xilosa	85
	Arabinosa	6
	Glucosa	6
	Galactosa	2
Polisacáridos difícilmente hidrolizables	Glucosa	90
	Xilosa	10

Fuente: (Sanjuán 2003)

El contenido de holocelulosa (celulosa y hemicelulosa) en el bagazo desmedulado, fracción fibrosa, es similar al de las maderas duras, exhibiendo rendimientos similares en la producción de pulpa. Los polisacáridos presentes en el bagazo de caña son altos debido a la presencia de un gran contenido D-xilanas, formadas por unidades de D-xilosas, sustituidas por grupos acetilos y ácidos urónicos metilados.

El bagazo tiene un contenido de aproximadamente el 75% de la lignina de las maderas duras y esta característica hace apto el material para la industria papelera (Sanjuán 2003). Además exhibe rendimientos similares en la producción de pulpa como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición química de algunas maderas

Cultivo	Extraíbles en agua caliente	Extraíbles EtOH/ Benceno	Cenizas	Lignina Klason	Holocelulosa	Pentosanos	Alfa celulosa
Bagazo	3.78	2.7	2.6	20.7	-	25	45
Arce Rojo (Hardwood)	3	2	0.4	21	77	18	47
Abedul							
Amarillo (Hardwood)	2	2	0.7	21	73	23	47
Eucalipto (Hardwood)	7	4	0.2	22	72	14	49
Olmo americano (Hardwood)	3	2	0.4	22	73	17	50
Abeto Subalpino (Softwood)	3	3	0.5	29	67	9	46
Picea Engelman (Softwood)	2	2	0.2	28	69	10	43
Cedro blanco del norte (Softwood)	5	6	0.5	30	59	14	44
Pino blanco del este (Softwood)	4	4	0.2	27	68	8	45

Fuente: (Rowell 1984)

2.10. Biopulpeo de bagazo de caña

El biopulpeo del bagazo de caña pretende atacar a las moléculas de la fibra con microorganismos y/o enzimas para modificar su estructura molecular. Dependiendo del tipo de especie de microorganismo o de enzima empleado y de su comportamiento, se han obtenido diversos resultados en el pasado.

Suchada Ujjin trató bagazo fresco con dos especies de hongos de pudrición blanca (*Phanerochaete sordida* y *Ganoderma sp*) a temperatura ambiente durante cuatro semanas. En su investigación encontró que el bagazo cuenta con los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo de los hongos, por lo que los niveles de lignina se reducen en un 30.7% para la fibra tratada con *Phanerochaete*. Comparativamente encontró que la actividad de este hongo fue mayor para el *Ganoderma* (Suchada 2011).

De manera similar, Ramos y colaboradores trataron bagazo con *Ceriporiopsis subvermispora* y xilanasa durante 2 semanas a 27°C con un 70% de humedad relativa. Posteriormente, realizaron una cocción con NaOH al 5% a 130°C durante 20 minutos. Luego se realizó un desfibrado a un 7% de consistencia hasta 60°SR (Grados Schopper-Riegler) en un refinador de discos de 30 cm (Ramos, González & Zúñiga 2001). Esta investigación reportó una mejora en el rendimiento del proceso, evidenciado en una reducción en un 4% en el tratamiento con el hongo (85%) y un 6% en el procedimiento con la enzima (83%), comparado respecto a la muestra de control (89%). Adicionalmente, se analizó el contenido de lignina antes y después del tratamiento con el hongo y ésta presentó una reducción de 23.4% mientras que los extraíbles disminuyeron 18.6%. Esto se debe a que el hongo produce manganeso peroxidasa (MnP) y Lacasa (Lac), dos fenoloxidasas que inician el ataque al polímero de lignina por una sola etapa de oxidación de electrones, lo que ocasiona también, el descenso en el rendimiento. Por otra parte, en el caso del tratamiento con la enzima, el rendimiento se redujo aproximadamente un 2%, comparado con el tratamiento del hongo. Los autores además no reportan reducción en el contenido de lignina por lo que el tratamiento de la enzima y el hongo combinados, reducen solo el contenido de xilano. Este resultado se puede atribuir a la acción de la enzima, que al eliminar el xilano de la superficie de las fibras, consigue una mayor permeabilidad para degradar los enlaces lignina-carbohidrato.

Asimismo, las propiedades papeleras de la pulpa, índice de tracción (38mN/g) e índice de rasgado (4.3 mN.m²/g), fueron comparativamente más altas cuando el bagazo se trató previamente con el hongo.

A modo de comparación, otros índices de tracción obtenidos para la fabricación de pasta biomecánica han sido reportados en la literatura. Materiales como el Yute arrojaron valores de 18 mN/g mientras que el Kenaf alcanzó los 17 nM/g, el pino 30 mN/g y el álamo 32 mN/g (Sanadi, Caulfield & Rowell 1995).

Igualmente Ramos y colaboradores midieron índices generales de tracción en pulpa obtenida a partir de álamo biomecánico, reportando valores superiores a los obtenidos usando madera triturada de pino (Ramos et al., 2001). La inclusión de etapas de biopulpeo permite reducir el consumo de energía para la pulpa tratada con el hongo hasta un 28% y para la pulpa procesada con enzima se logra una reducción de hasta el 33%, comparado los resultados con la muestra de control. Este resultado se ve reflejado en las operaciones de desfibrado y refinado como se muestra en las siguientes investigaciones.

Sabharwal y colaboradores lograron un ahorro de energía del 27.7% para la fabricación de pasta biomecánica de kenaf y un 25.0% de ahorro para la fabricación de pasta biomecánica de yute con pretratamiento en ambos casos con hongo. En el caso de la madera, los ahorros energéticos se situaron en un rango entre el 20.0% y el 37.0% para las diferentes especies de madera y diversos tratamientos de hongos (Bajpai, 1999).

Por su parte, el biopulpeo de bagazo de caña y la acción de las enzimas sobre las fibras trae consigo reducciones de reactivos en las digestiones y consumos energéticos menores. El autor Saad y sus colaboradores reportaron una reducción de reactivos de digestión (21.5 % en peso), durante el proceso de fabricación de pulpas papeleras a partir de bagazo de caña de azúcar, empleando micelio fúngico.

De igual manera Gonçalves y sus colaboradores trabajaron con cepas de *Panus tigrinus* en bagazo de caña de azúcar durante diez días en una fermentación en estado semisólido a 30°C. La producción de manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP) y lacasa (Lac) por hongos se correlacionaron con la eficiencia del proceso de deslignificación en bagazo después de la fabricación de pasta organosolv con ácido acético. Los análisis de FTIR en las pulpas de bagazo indicaron una correlación entre la modificación de la lignina y las propiedades de la pulpa, de tal manera que cuanto más modificación de lignina hay, las propiedades de la pulpa mejoran. El efecto del tratamiento fue evaluado por la relación entre la viscosidad y el número Kappa, cuanto mayor sea el valor, mejores

las propiedades papeleras de las pulpas. Esto se debe a la acción de las MnP y Lac ya que a mayor acción de éstas menor número Kappa, reduciendo el contenido de lignina y aumentando la viscosidad de las pulpas por el incremento de protección de la fibra (Gonçalves & Benar 1998).

En relación a la aplicabilidad de xilanasa en pulpas de bagazo de caña de azúcar y la posibilidad de recuperar esta enzima, Gonçalves y coinvestigadores evaluaron una xilanasa comercial (*Pulpzyme HC*) sobre la pulpa, la recuperaron y la aplicaron en tres ciclos de proceso. Además, analizaron un proceso combinado de fabricación de pulpas, como el pretratamiento de hongos en la fibra y la fabricación de pasta acetosolv. La cantidad de la enzima recuperada en el primer tratamiento fue de aproximadamente 7% de la carga inicial de la enzima, después del segundo tratamiento no fue posible la recuperación de la enzima. Varios factores interfirieron en la recuperación de la xilanasa, tales como tipo de pasta, medio de tratamiento (tamponado o acuoso) y la metodología empleada en la recuperación de la enzima. Una etapa de extracción alcalina se llevó a cabo para verificar la acción de *Pulpzyme* en pulpas enzimáticas tratadas, debido a la concentración de NaOH (3% NaOH, 65°C y 30 minutos) utilizado en las etapas no se observó ningún cambio en los números de Kappa y viscosidad de las pulpas (Gonçalves et al. 2008).

3. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS

Enzimas de diferentes tipos son las encargadas de la degradación de los componentes de la madera. Así, el comportamiento de los hongos que degradan la madera, como de pudrición blanca o parda está relacionado con su capacidad para producir distintos tipos de enzimas.

3.1. Xilanasa

Las hemicelulosas son los polisacáridos más abundantes tras la celulosa y dentro de ellas, los xilanos son los predominantes aunque su proporción difiere mucho según las especies y en particular si se trata de especies coníferas (del 7 al 12% del peso de la madera) o de latifoliadas (del 15% y el 30%) (Kumar, Verma & Satyanarayana 2013).

3.1.1. Estructura del xilano

Los xilanos están formados predominantemente por grupos de β -D-xilopiranosas, unidos mediante enlaces entre los carbonos 1 y 4 de dos unidades consecutivas. Añadidos a esta cadena lineal, y anclados en los carbonos C2 o C3, se encuentran grupos acetilo, unidades de arabinosa y ácido β -metilglucurónico. La presencia de estos sustituyentes difiere de unas especies a otras. En las angiospermas (glucuronoxilanos) hay abundancia de grupos acetilos, presencia de unidades de ácido β -metilglucurónico pero no se encuentra arabinosa. En las gimnospermas, los xilanos (arabinoglucuronoxilanos) carecen de grupos acetilos pero tienen sustituyentes de arabinosa y ácido β -metilglucurónico. El resultado final es una cadena ramificada con un eje compuesto de unidades de xilosa.

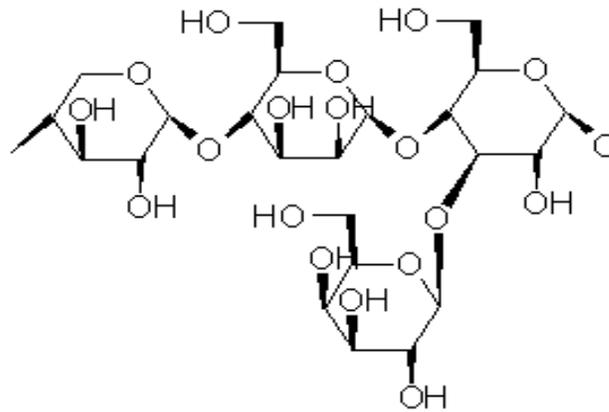


Figura 13. Hemicelulosa: -xilosa- $\beta(1,4)$ -manosa- $\beta(1,4)$ -glucosa- $\alpha(1,3)$ -galactosa

3.1.2. Enzimas xilanodegradantes

La compleja estructura de los xilanos hace que su degradación enzimática no pueda realizarse por un único tipo de enzimas. Un grupo de ellas realizan una labor sinérgica para llevar estos polisacáridos hasta compuestos de bajo peso molecular. Las endoxilanasas (endo-1,4- β -xilanasas) rompen los enlaces glicosídicos en el interior de la estructura principal del xilano, de forma análoga a cómo actúan las endoglucanasas sobre las moléculas de celulosa. A diferencia de éstas, las endoxilanasas no operan de forma aleatoria sino dependiendo de factores como el grado de ramificación del xilano, su grado de polimerización y la presencia de sustituyentes (Kondo & Sakai 1994). Cuando el xilano ha reducido su grado de polimerización, las β -D-xilosidasas pueden actuar, ya sea sobre oligómeros o sobre unidades de xilobiosa, liberando un monómero de xilosa (β -D-xilopiranosas). Cuanto mayor sea el peso molecular del sustrato mayores serán las dificultades para las xilosidasas, pero si en el medio hay presentes endoxilanasas, las xilosidasas pueden conseguir, aunque indirectamente, la degradación de xilanos de alto peso molecular. Esto es así porque la degradación de los xilanos por las endoxilanasas está inhibida por la presencia de oligómeros de bajo peso molecular. Estos últimos, pueden a su vez ser hidrolizados por xilosidasas, activándose entonces la degradación de los xilanos de alto peso molecular por las endoxilanasas. Los oligómeros que dejan en el medio las endoxilanasas son ya sustratos adecuados para las xilosidasas (Ek 2009b).

Las xilanasas se encuentran en una amplia variedad de organismos: bacterias, hongos, algas marinas y animales, siendo los hongos los que más producen xilanasas extracelulares (Villar 2008).

Por otro lado, ciertas endoxilanasas, escinden la cadena principal, pero lo hacen sólo después de la liberación previa de arabinosa; estas enzimas, endoxilanasas, se han diferenciado según los productos finales que se liberan de la hidrólisis de xilano por ejemplo, xilosa, xilobiosa y xilotriosa, y/o arabinosa. Por lo tanto, las xilanasas pueden clasificarse como no desramificadora (sin liberación de arabinosa) o desramificante (liberación de arabinosa). Muchos organismos son capaces de producir ambos tipos de xilanasas, dando como resultado la máxima eficiencia de la hidrólisis de xilano (Bastawde 1992).

3.1.5. Fuente de producción de xilanasas

Cada tipo de xilanasas se ha encontrado en una amplia variedad de organismos, incluyendo bacterias marinas y terrestres, las bacterias del rumen, hongos, algas, protozoos, caracoles, crustáceos, insectos, plantas terrestres marinos y sus semillas. Sin embargo, los hongos filamentosos son productores particularmente interesantes de xilanasas desde un punto de vista industrial, ya que pueden excretar enzimas xilano-degradantes en el medio, eliminando la necesidad de disrupción celular antes de la purificación (Sunna & Antranikian 1997) (Polizeli et al. 2005).

Además, los niveles de xilanasas a partir de cultivos de hongos filamentosos son típicamente mucho más altos que los de la levadura o bacterias. Por otra parte, además de las xilanasas, los hongos producen varias enzimas auxiliares requeridas para la degradación del xilano sustituido.

La mayoría de los fabricantes producen estas enzimas mediante fermentación sumergida (SMF) generando alrededor del 90% de las xilanasas que se venden en todo el mundo (Polizeli et al. 2005).

Las preparaciones de xilanasas comerciales de fuentes fúngicas son fabricadas por empresas de todo el mundo, como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Ejemplos de preparaciones comerciales que contienen xilanasa

Compañía	Producto	Cepa	Aplicaciones
Altech (USA)	Allzym PT	<i>Aspergillus niger</i>	Alimentación animal
Altech (USA)	Fibrozyme	<i>Aspergillus nigerand</i>	Alimentación animal
Amano Farmaceutical (Japón)	Amano 90	<i>Aspergillus niger</i>	Industria farmacéutica y alimentación
Ingredientes Danisco (Dinamarca)	Grindazym PF	<i>Aspergillus niger</i>	Suplementos para aves del corral y cerdos
Gamma Chemie (Alemania)	Gammafeed X	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Producción de harina de trigo, panadería y fabricación de cerveza
Genecor International (Finlandia)	Multifect XL	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Industria de alimentación
Ciba-Geiby (Suiza)	Irgazyme 40	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Industria de pulpa y papel y alimentación animal
Bioindustria Hankyo (Japón)	Xylanase 250	<i>Trichoderma viride</i>	Panadería y macerado de frutas y verduras
Iogen (Canadá)	Xylanase GS35	<i>Trichoderma reesei</i>	Blanqueo y limpieza de pulpa y alimentación animal
Novozymes (Dinamarca)	Bio-Feed-Plus	<i>Humicola insolens</i>	Alimentación animal
Primalco Biotecnología (Finlandia)	Ecopulp X-200	<i>Trichoderma reesei</i>	Mejoras en el blanqueo de pulpas Kraft
Quest International (Irlanda)	Bioxylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	Producción de cerveza y alimentación animal
Röhm GmbH (Alemania)	Rohalasa 7118	<i>Aspergillus sp. And Tricoderma sp.</i>	Reducción de la viscosidad en el procesado de almidón
Seikagaku Corporation (Japón)	Sin nombre comercial	<i>Trichoderma sp.</i>	Estudios de la estructura de los carbohidratos
Shin Nihon Chemical (Japón)	Sumizyme X	<i>Trichoderma koningii</i>	Manufactura de extractos de setas y vegetales.
Enzimas Solvay (Alemania)	Solvay pentosana	<i>Trichoderma reesei</i>	Panadería
Stern-Enzym GmbH (Alemania)	Stemzym HC 46	<i>Trichoderma reesei</i>	Panadería

Fuente: (Loera Corral & Villaseñor-Ortega, 2006)

3.1.6. Aplicaciones de la xilanasa

Entre las aplicaciones importantes de los sistemas de enzimas xilanolíticas está la elucidación de las estructuras de xilanos complejos, como, furfural y xilitol; productos finales de la degradación del xilano muy apreciados para aplicaciones comerciales (Parajó & Domínguez 1998).

Algunas aplicaciones actuales se han mencionado en la Tabla 7. Las xilanasas pueden ser aplicadas en la industria de pulpa y papel para blanqueo (eliminación de la lignina) de la pulpa kraft, para la modificación de pulpa en la fabricación de papel y para el reciclaje de papel. Todos estos son ejemplos de lo que se considera la aplicación biotecnológica más importante de estas enzimas hoy en día, de hecho, el 30% de las patentes concedidas en EE.UU. están relacionadas con xilanasas que se utilizan en procesos de bioblanqueo ((OPA), 2015).

La mayoría de los estudios sobre el efecto de xilanasas en preblanqueo de pulpa se han llevado a cabo con enzimas preparadas a partir de *Trichoderma* sp. Los preblanqueos de pulpa enzimática resultaron en una reducción de 20% a 30% de cloro requerido (Viikari, Kantelinen & Linko 1994). Otro producto químico que puede ser disminuido o eliminado por tratamiento con xilanasas es hipoclorito, esto es importante ya que el cloroformo es un subproducto del uso de hipoclorito (Farrell & Skerker, 1991).

Las xilanasas, en conjunción con las enzimas celulolíticas, pueden considerarse para la conversión de materiales lignocelulósicos, especialmente residuos producidos por la agricultura y la silvicultura, para generar productos de mayor valor, como combustibles y otros productos químicos. Aunque para esta finalidad son más empleados los tratamientos con ácido.

Las xilanasas se han utilizado para propósitos hidrolíticos más específicos, tales como la producción de oligosacáridos aislados de xilanos que luego se utilizan como aditivos alimentarios funcionales o edulcorantes alternativos con propiedades beneficiosas (Pellerin, Samain & Debeire 1991).

La hidrólisis de xilanos también puede ser importante en la industria cervecera y la producción de zumos de frutas. Un resumen de las aplicaciones reportadas de enzimas xilanolíticas tomadas de (Sunna & Antranikian 1997) y (Polizeli et al. 2005) se enumeran a continuación:

- La extracción de jugos, sabores, especias, aceites y pigmentos.
- Aclarado de zumos y vinos.
- Producción de xilanos modificados como agentes de carga para el procesamiento de alimentos.
- Conversión de xilanos en productos monoméricos para su conversión en edulcorante (xilitol) o sabores.
- Modificación de harina de cereal a fin de aumentar el volumen, textura y endurecimiento propiedades del pan.

- Disolución de los tejidos celulares y las pectinas de lino, cáñamo, yute, sisal y estopa.
- Refinación de pulpas de disolución para la producción de rayón viscosa, celulosa ésteres y éteres de celulosa.
- Sacarificación de desechos y residuos agrícolas y forestales para fermentación para la producción de combustibles y materias primas químicas.

Cabe señalar que la mayoría de las aplicaciones no requieren enzimas altamente purificadas. De hecho, algunas aplicaciones se ven reforzadas por la presencia de otras actividades enzimáticas, a excepción de algunas aplicaciones en el industria del papel y la pulpa, donde la existencia de celulasas puede dañar las fibras de la pulpa (Wong & Saddler 1993; Subramaniyan & Prema 2002).

Diferentes autores proponen dosis y tiempos para los tratamientos de biopulpeo, en la Tabla 8 se muestran diferentes estudios con xilanasas, sus dosis y sus resultados.

Tabla 8. Estudios de tratamientos realizados con xilanasas

Autores	Tipo de enzima	Dosis empleada	Tiempo	Resultados	Título
Soltanali, S. Ziaie-Shirkolaee, Y.	Cartazyme	6 a 18 UI/g	2 a 3 horas	Longitud de ruptura: 5902m; Índice de estallido: 3.66kN/g; Índice de rasgado: 6.00mNm ² /g	Blanqueo de pulpa de bagazo con enzimas y peróxido de hidrógeno (Soltanali & Ziaie-Shirkolaee, 2007).
Ramos, J. González, M. et al.	Irgazyme 40-X4 xilanasas	15 UI/g* xilanasas comercial	2 semanas	Índice de tracción: 34.3Nm/g; Índice de estallido: 1.75kN/g; Índice de rasgado: 4.2mNm ² /g	Pulpeo biomecánico y bioquímico en bagazo con el hongo <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> y tratamiento con xilanasas comercial (Ramos et al., 2001).
Zhao, J. Li, X. et al.	Xilanasas del microorganismo <i>Aspergillus niger</i>	4 UI/g	6 a 8 horas	Índice de tracción: 39.92 Nm/g; Índice de estallido: 2.9 kPa m ² /g; Índice de rasgado: 6.92mNm ² /g	Incremento en las propiedades de pulpa de paja de trigo usando xilanasas (Zhao et al., 2002).
Chauhan, S. Choundhury, B. et al.	Xilanasas del microorganismo <i>Bacillus coagulans</i>	20 UI/g	3 horas	Paja de trigo: Índice de tracción: 37.0 Nm/g; Índice de rasgado: 10 mNm ² /g. Paja de arroz: Índice de tracción: 41.5 Nm/g; Índice de rasgado: 7.2 mNm ² /g.	Aplicación de xilanasas como agente de blanqueo en pulpas no maderables (Chauhan, Choudhury, Singh, & Ghosh, 2006).

3.2. Lacasa

Las lacasas ofrecen mayor estabilidad y la posibilidad de utilizar la enzima en su forma inmovilizada. La mayor parte de los sustratos de lacasa son una variedad de compuestos fenólicos, y su reactividad puede ampliarse por medio de mediadores tales como 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6 sulfonato) (ABTS) y 1-hidroxibenzotriazol (HBT), estos mediadores modifican la reactividad hacia otros sustratos que la lacasa sola no puede oxidar.

La producción de lacasa puede ser estimulada considerablemente por la presencia de inductores (principalmente compuestos aromáticos o fenólicos relacionados con lignina o lignina derivados) como alcohol veratrílico (Mansur, Suárez & González 1997), 2,5-xilidina (Eggert, Temp & Eriksson 1996), guayacol (Skorobogat, Stepanova & Yaropolov 1996), ácido gálico y ácido ferúlico (Fortina, Manachini & Gennaro, 1996), el etanol (Battan, Sharma & Kuhad 2007) y el cobre (Palmieri, Giardina & Sannia 2000).

Además, las lacasas pueden utilizarse en una gran variedad de procesos, principalmente relacionados a la biorremediación tales como deslignificación de pulpas (Bourbonnais, Paice & Yaguchi 1995), decoloración y la desintoxicación de colorantes textiles (Kandelbauer, Maute & Gübitz, 2004), biorremediación de compuestos xenobióticos (Mougin, Kollmann & Jolivald 2002), el tratamiento de las aguas residuales (Raghukumar 2000) y tratamiento de otros contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Rama et al. 1998).

3.2.1. Estructura de la lignina

Los hongos ligninolíticos hacen uso de una gama completa de hidrolasas, éstas son capaces de producir monosacáridos en grandes cantidades a partir de los polisacáridos de la madera. Sin embargo, cuando estos componentes forman un complejo con la lignina, son resistentes a la ruptura hidrolítica (Leonowicz et al., 1999). La lignocelulosa es compacta, en el complejo de la parte cristalina. Los componentes de polisacáridos forman microfibras y están densamente empaquetados en capas de lignina, lo que les protege contra la actividad hidrolítica de enzimas y otros factores externos y también sirve como un estabilizador de la compleja estructura (Fengel 1971).

Al estar ampliamente distribuido en la naturaleza, la lignina es el segundo polímero natural (después de la celulosa) más abundante presente y el material

aromático más abundante que representa aproximadamente el 40% de la energía solar almacenado en las plantas.

3.2.2. Enzimas que degradan la lignina

Para la degradación de la lignina los grupos de enzimas involucrados son diferentes a los que provocan la degradación de las cadenas de polisacáridos, peroxidasa y lacasa. Las lacasas (Lac), enzimas de tipo fenol oxidasa, usan el oxígeno molecular como sustrato y lo reducen hasta agua. En cambio, las peroxidasa: lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) emplean el peróxido de hidrógeno como aceptor final de electrones. En la degradación de la lignina por peroxidasa es esencial la presencia en el medio de peróxido de hidrógeno, que a su vez es generado por la actividad de enzimas glioxal oxidasa, glucosa oxidasa y aril alcohol oxidasa (Tkacz & Lange 2004). La LiP es una enzima oxidante inespecífica que cataliza la oxidación de compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos. En la lignina provoca la oxidación del anillo bencénico, que continúa con la evolución de la forma oxidada hacia la ruptura de enlaces C-C, apertura del anillo aromático, desmetilación o la formación de quinonas. La MnP tiene un efecto similar al de la LiP, pero se trata de una enzima oxidante más suave que solo actúa sobre unidades fenólicas. En principio se consideró que jugaba un papel secundario en la degradación de la lignina; sin embargo, tiene una ventaja añadida ya que el oxidante que entra en contacto con la lignina es el manganeso en su forma oxidada, que puede llegar hasta zonas inaccesibles para las enzimas (Ek 2009b).

Análogamente, las lacasas (*p*-difenol oxígeno reductasa) son enzimas de tipo fenoloxidasa, que contienen generalmente cuatro átomos de cobre en su estructura. Se encuentran particularmente en los hongos de podredumbre blanca. Éstas se incluyen dentro del grupo de las “oxidasa azules” (el cobre les confiere un color azul intenso) que incluye, además de la lacasa, la ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina. De entre las más de doscientas enzimas (oxigenasa y oxidasa) que usan oxígeno molecular como sustrato, solo seis son capaces de reducir el O₂ a agua, entre las que se incluye la lacasa (Bajpai, 2011). La oxidación de sustratos por parte de las lacasas es un proceso en el que se toman, secuencialmente, cuatro electrones para reducir una molécula de O₂ a agua. La enzima toma esos electrones de una amplia variedad de compuestos fenólicos, e incluso no fenólicos. Los distintos átomos de cobre de la enzima son los aceptores intermediarios de los electrones en su paso desde el sustrato hacia la molécula de oxígeno. Se produce,

además, un complejo intercambio de electrones entre los distintos tipos de cobre (denominados I, II y III).

El volumen de la enzima lacasa es un condicionante para su ataque sobre la madera. Se ha supuesto entonces que dicho ataque solo tiene lugar en la superficie de las fibras, la única zona accesible a la enzima. En la degradación natural, este ataque ocurre además en la superficie del lumen de las fibras, ya que esta región es la vía de avance de los hongos de pudrición blanca. Otro modo de actuación propuesto es la cooperación de la enzima con mediadores, compuestos de bajo peso molecular que accederían y oxidarían la lignina fuera del alcance de la enzima. La presencia de estos mediadores puede ser el resultado de procesos metabólicos del hongo o proceder del exterior del sistema tal y como ocurre en el proceso de bioblanqueo conocido como LMS (laccase mediator system). Entre los mediadores naturales cabe citar el alcohol veratrílico, oxalato, malato o fumarato, entre el segundo grupo se ha probado con éxito el uso de 2-hidroxibenzotriazol (HBT) o el del ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin sulfónico (ABTS) (Saad et al. 2008).

3.2.3. Fuente de producción de lacasa

Las lacasas se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas superiores, tales como *Rhus vernicifera*, *Rhus succedáneos*, *Lactarius piperatus* y *Prunus persica*. También están presentes en hongos tales como *Polyporus versicolor* A, B, *Pleurotus*, *Pholiata*, *Podospora anserina*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* y *Pyricularia oryzae* (Gardiol & Harte 1998). Aunque las enzimas lacasas están ampliamente distribuidas en las plantas y los hongos, la actividad de lacasa se ha reportado sólo en algunas bacterias, incluyendo *lipoferum* *Azospirillum*, *Marinomonas mediterranea*, *Streptomyces griseus*, y *Bacillus subtilis* (Givaudan et al. 1993)(Hullo & Verstraete 2001).

En las plantas superiores, las lacasas están involucrados en la lignificación de los tejidos del xilema (LaFayette, Eriksson, & Dean 1999); sin embargo, varias funciones se han reportado para lacasas fúngicas.. En los basidiomicetos de pudrición blanca *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes*, y *Pleurotus ostreatus*, las lacasa están implicadas en la degradación de la lignina (Crestini & Argyropoulos, 1998).

La lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* funciona tanto en degradación de la lignina como en la biosíntesis de ácido cinnabárico, un antimicrobiano con actividad en contra de especies bacterianas (Eggert, Temp & Eriksson 1997).

Las isoenzimas de lacasa producidas por hongos son del tipo extracelular e intracelular. Hay esencialmente tres posibles funciones que le hayan sido atribuidas a lacasas fúngicas (1) la formación de pigmentos, (2) degradación de la lignina, y (3) la desintoxicación (Solomon, Sundaram & Machonkin 1996).

3.2.4. Mecanismo (sitio activo, reacción, ciclo catalítico)

La lacasa contiene cuatro átomos de cobre, los cuales han sido clasificados de acuerdo con sus características de resonancia paramagnética electrónica en: tipo 1 (T1) o azul, tipo 2 (T2) o normal y tipo 3 (T3) o sitio de cobre binuclear (acoplado), donde los cobres se acoplan antiferromagnéticamente a través de un puente. La Figura 18 muestra el sitio activo de la lacasa. El cobre tipo 1 es coordinado con dos enlaces de histidina y dos azufres, uno de la metionina y otro de la cisteína. El centro tipo 2 es tri-coordinado con dos enlaces con histidinas y agua. El tipo 3 está tetra-coordinado, teniendo tres enlaces con histidinas y puentes de hidrógeno

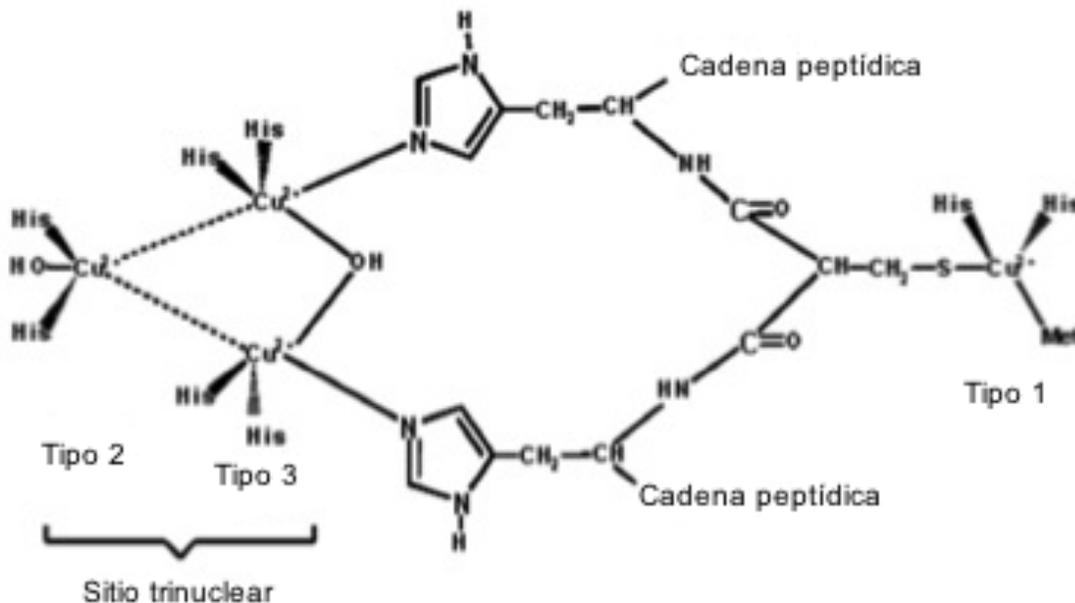


Figura 15. Sitio activo de lacasa (Satyanarayana, Johri, & Prakash 2012).

La enzima lacasa oxida sustratos mediante la eliminación de un electrón cada vez, lo que genera radicales libres que se pueden polimerizar. La enzima guarda

electrones de sus reacciones de oxidación individuales y llega a su estado reducido con cuatro electrones por lo que la enzima puede transferir estos electrones al oxígeno molecular para formar agua.

El cobre T1 es el aceptor de electrones primario, y al menos uno de los dos electrones requeridos para reducir el sitio T3, aceptor de un par electrónico, proviene de este sitio. La velocidad de reacción de Cu T1 es el paso limitante de la velocidad de reacción total. El cobre T2 es necesario para la oxidación aerobia del sitio reducido de T3, además permite a T3 actuar como un aceptor de dos electrones. El papel del Cu T2 no se especifica en detalle, tal vez participa en la transferencia de uno de los electrones necesarios para reducir el sitio T3.

En el mecanismo catalítico de las lacasas, se ha sugerido que el cobre Tipo 2 estabiliza un intermediario en la reducción de O_2 a H_2O ; esto indica que el tipo 2 de cobre es parte del sitio reducción de O_2 en la enzima. Se ha sugerido que la inhibición de la enzima a un valor de pH elevado, es debido a la formación de un complejo de cobre T2-OH. Este ion cobre no puede permitir la reducción del cobre T3 hasta que el OH⁻ se ha disociado o se convierta en una molécula de agua. A valores de pH bajos, una de las moléculas de agua formadas en la enzima reducida de re-oxidación parece estar unida al sitio de cobre T2. Estudios de lacasas fúngicas muestran que el agua es un aglutinante intercambiable para el sitio T2.

En la Figura 16 se presenta el ciclo catalítico de lacasa, que muestra el mecanismo propuesto para la reducción y reoxidación de los sitios de cobre. El sustrato reduce el sitio T1 en el "intermediario nativo", que luego transfiere el electrón al clúster trinuclear. Se muestran dos posibles mecanismos para la reducción de la agrupación trinuclear: A) los sitios de T1 y T2 juntos para reducir el par de T3 y B) cada uno de los sitios de cobre en el clúster trinuclear se reducen secuencialmente por la transferencia de electrones desde el sitio T1, en cuyo caso el sitio T3 ya no actúa como un aceptor de dos electrones. Una reducción lenta del "Intermediario nativo" conduce a la forma completamente oxidada (Satyanarayana, Johri & Prakash 2012).

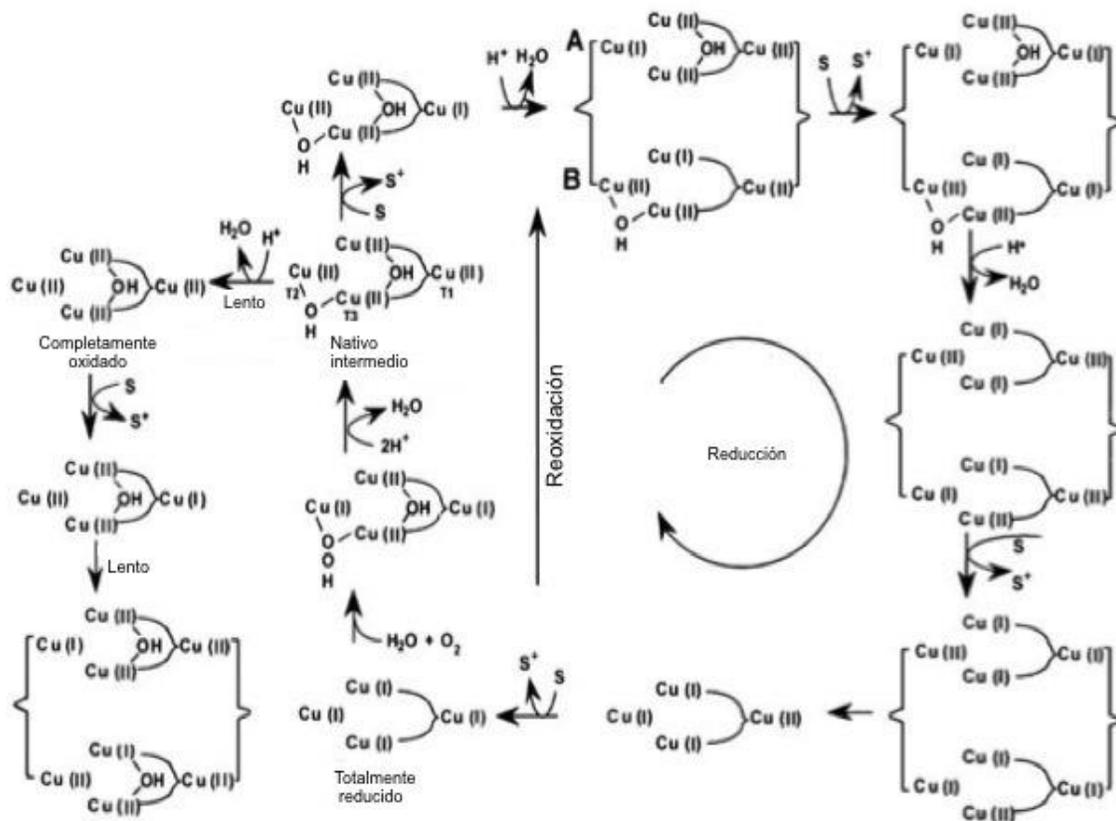


Figura 16. Mecanismo de lacasa (Satyanarayana et al. 2012)

3.2.5. Mediadores que amplían el rango de acción de la enzima

Algunos mediadores son 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), 1 hidroxibenzotriazol (HBT), benzotriazol (BT), Remazol brillante azul (RBB), clorpromazina (CPZ), promazina (PZ), 1-nitroso-2-naftol-3,6- ácido disulfónico (NNDS) y ácido-naftalenosulfónico-3-nitroso-1 4-hidroxi (HNNs). Sus estructuras se muestran en la Figura 17.

Los mediadores ABTS y HBT son aquellos que se han usado más en procesos tales como deslignificación de la pulpa (Bourbonnais, Paice, Freiermuth, Bodie, & Borneman, 1997), decoloración y desintoxicación de tintes textiles (Reyes, Pickard, & Vazquez-Duhalt, 1999), la degradación de contaminantes orgánicos recalcitrantes como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Mansur et al. 1997).

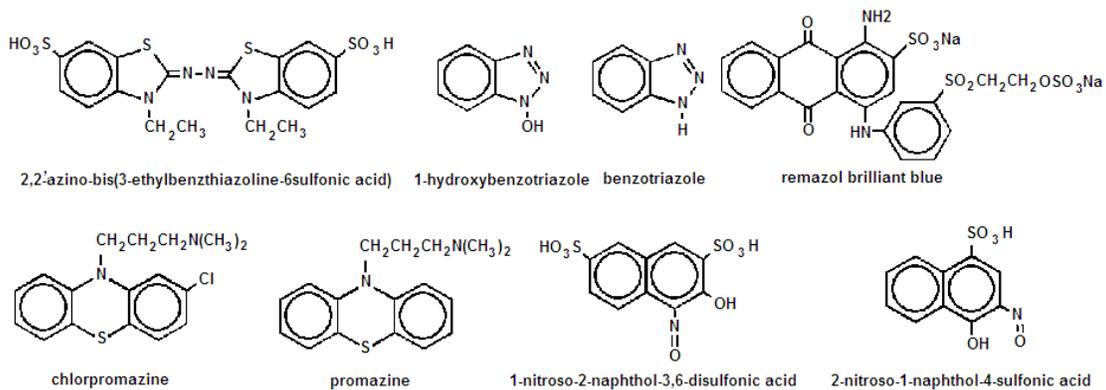


Figura 17. Estructuras de algunos mediadores de lacasa (Bourbonnais et al. 1997)

El sistema lacasa mediador (LMS) podría desempeñar un papel importante a la vista de procesos de blanqueo alternativos en la industria de pulpa y papel. Bourbonnais y colaboradores encontraron que el rango de sustrato de la lacasa puede extenderse a subunidades no fenólicas de la lignina mediante la inclusión de un mediador, como ABTS.

La deslignificación de pasta Kraft se ha reportado con lacasa y 1-hidroxibenzotriazol (HBT), después del tratamiento repetido con lacasa-ABTS seguido por extracción alcalina. Bourbonnais y otros han encontrado diferencias significativas en la reactividad entre las lacasas de diferentes hongos cuando son probadas para la deslignificación de pulpa en presencia de los mediadores ABTS y HBT. Sin embargo, todas las lacasas fueron capaces de deslignificar pulpa en la presencia de cualquier mediador, aunque la extensión de la deslignificación y desmetilación eran bastante variable. En general, la desmetilación de pulpas por lacasas en presencia de HBT fue mucho menor que la desmetilación de pulpas por lacasas en presencia de ABTS. Sin embargo, la tendencia general que surgió es que todas las lacasas fúngicas probadas son más susceptibles a la desactivación en presencia de HBT que en presencia de ABTS. Sus resultados muestran que ABTS y HBT tienen una capacidad similar para promover la deslignificación de la pulpa kraft.

(Majcherczyk, Johannes, & Hüttermann 1998) usan lacasa de *Trametes versicolor* en presencia de HBT para oxidar hidrocarburo policíclico aromático (PAH). Los autores obtiene que el grado de oxidación fue bajo pero de aproximadamente el 10% y se encontró para ocho PAH adicionales: acenafteno, fluoranteno, pireno, benzo [a] antraceno, criseno, benzo [b] fluoranteno aumento de la oxidación de la

HAP: acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, benzo [a] pireno, perileno y se eliminaron casi completamente de la mezcla de reacción. La oxidación de pireno y benzo [a] antraceno aumentó de un 8% y 6% sin un mediador a 48% y 53% en presencia de HBT.

Reyes y colaboradores examinaron el hongo inmovilizado *Coriolopsis gallica* durante ciclos repetidos de decoloración del tinte y el efecto de HBT, como un mediador radical, se utilizó para ampliar el número de decolorado del tinte en textiles. Los colorantes empleados tenían diferentes estructuras químicas, incluyendo antraquinonas, oxazinas, ftalocianinas y compuestos azoicos.

3.2.6. Aplicaciones de la lacasa

Las lacasas pueden emplearse en deslignificación de pulpa (Bourbonnais et al. 1995) (Eriksson, Blanchette, & Ander 2012), blanqueo de tintes textiles (Wong & Yu 1999), la desintoxicación de aguas residuales (Raghukumar, 2000), la desintoxicación de xenobióticos (Mougin et al., 2002), la fabricación de detergentes y la transformación de antibióticos y esteroides (Cohen, Persky, & Hadar 2002).

Diferentes autores proponen dosis y tiempos para los tratamientos de biopulpeo, en la Tabla 9 se muestran diferentes estudios con lacasas, sus dosis y sus resultados:

Tabla 9. Estudios de tratamientos realizados con lacasa

Autores	Origen	Dosis empleada	Tiempo	Resultados	Título
Bourbonnais, R. Paice, M.	<i>Trametes versicolor</i>	5 UI/g, 1% ABTS	2 horas	Longitud de ruptura: 5000m; Índice de estallido: 3.45kN/g; Índice de rasgado: 22.45mNm ² /g	Deslignificación enzimática de pulpa Kraft usando lacasa y ABTS (Bourbonnais 1996).
Suurnakki, A. Oksanen, T.	<i>T. hirsuta</i>	5 a 20 UI/g	5 a 60 minutos	Porcentaje de lignina oxidado: 5.7% en pulpa Kraft ; Dosis óptima: 15UI/g tiempo óptimo: 30 min	Factores que afectan la activación de pulpas con lacasa (Suurnäkki et al. 2010).
Chen, Y. Wan, J. et al.	<i>Trametes versicolor</i>	40 a 240 UI/g	4 a 20 horas	Dosis óptima: 160UI/g; tiempo óptimo: 20 horas; Índice de tracción: 125 mN/g; Índice de estallido: 0.449 kPa m ² /g; Índice de rasgado: 7.32mNm ² /g	Modificación de pulpa de papel corrugado reciclado con el sistema lacasa mediador(HBT) (Chen et al. 2012).
Oudia, A. Mészáros, E. et al.	<i>Polyporus pinsitus</i>	15UI/g	2 horas	Número Kappa: 14.5; Lignina klason: 0.9% Blancura ISO: 50.7%	Estudio de la biodeslignificación de pulpa raft con lacasa (ABTS) (Oudia, Mészáros & Jakab 2007).

3.3. Endoglucanasa

Las endoglucanasas (endo-1,4- β -D-glucanasa) son capaces de actuar sobre la estructura cristalina de la celulosa fragmentando en dos la cadena mediante un ataque que se puede producir en cualquier posición de la cadena lineal. Las exoglucanasas (exo-1,4- β -D-glucanasa) atacan las cadenas de celulosa pero exclusivamente por uno de sus extremos. Liberan una molécula de celobiosa, por lo que reducen en dos unidades la longitud de la cadena. La acción previa de las endoglucanasas, fragmentando las moléculas de celulosa, hace que las exoglucanasas tengan más grupos terminales por donde atacar esa cadena de celulosa. Por último, cada molécula de celobiosa liberada por las exoglucanasas se puede romper por las β -1,4-glucosidasas en dos moléculas de glucosa (Villar 2008).

3.3.1. Mecanismo

Los hongos de pudrición blanca producen un complejo de enzimas celulolíticas que consta de: endoglucanasa, exoglucanasa y celobiasa, las cuales trabajan sinérgicamente (Bégum & Lemaire, 1996).

- Endoglucanasas (1,4- β -D-glucan 4-glucanohidrolasas), que producen una disminución en el grado de polimerización de la celulosa, por cortes al azar de la cadena glucosídica, produciendo glucosa, celobiosa (disacáridos) y celotriosa (trisacáridos). Los sustratos sobre los que actúan las endoglucanasas incluyen carboximetilcelulosa, celulosa amorfa, celooligosacáridos; que no atacan de forma significativa a la celulosa cristalina (Barreto, S., 2008).
- Exoglucanasas, producen principalmente rupturas secuenciales en la molécula de celulosa a partir de un extremo no reductor liberado y están representadas por dos grupos de enzimas: exocelobiohidrolasas o celobiohidrolasas (CBH) (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas) que liberan unidades de celobiosa a partir de un extremo no reductor y exoglucohidrolasas (1,4- β -D-glucan glucohidrolasas) que liberan unidades de glucosa a partir del extremo no reductor liberado e incluyen también actividad de las celobiohidrolasas produciendo celobiosa por ataque en el extremo no reductor del polímero. Las celobiohidrolasas son las que se hallan más frecuentemente (Angelo 2004).

- β -glucosidasas (β -D- glucósido glucohidrolasas), que hidrolizan celobiosa y otros β -1,4-oligoglucósidos de cadena corta, para formar glucosa (Moore, D., 1998).

La celulosa es atacada inicialmente por la endoglucanasa, la cual se liga al azar sobre las microfibrillas de celulosa en regiones amorfas, produciendo hidrólisis de los enlaces β -1,4-glucosídicos, generando así múltiples sitios de ataque para las exo-1,4- β -D-glucanasas, las que actúan sobre los extremos no reductores de la cadena, rompiendo una unidad de celobiosa. Existe una cooperación continuada entre la acción de ambas enzimas y la de la β -glucosidasa, la cual actúa sobre la celobiosa o también sobre pequeños oligómeros, produciéndose así moléculas de glucosa. El resultado de la acción de estas tres actividades enzimáticas es la degradación sinérgica de la celulosa como se muestra en la Figura 18.

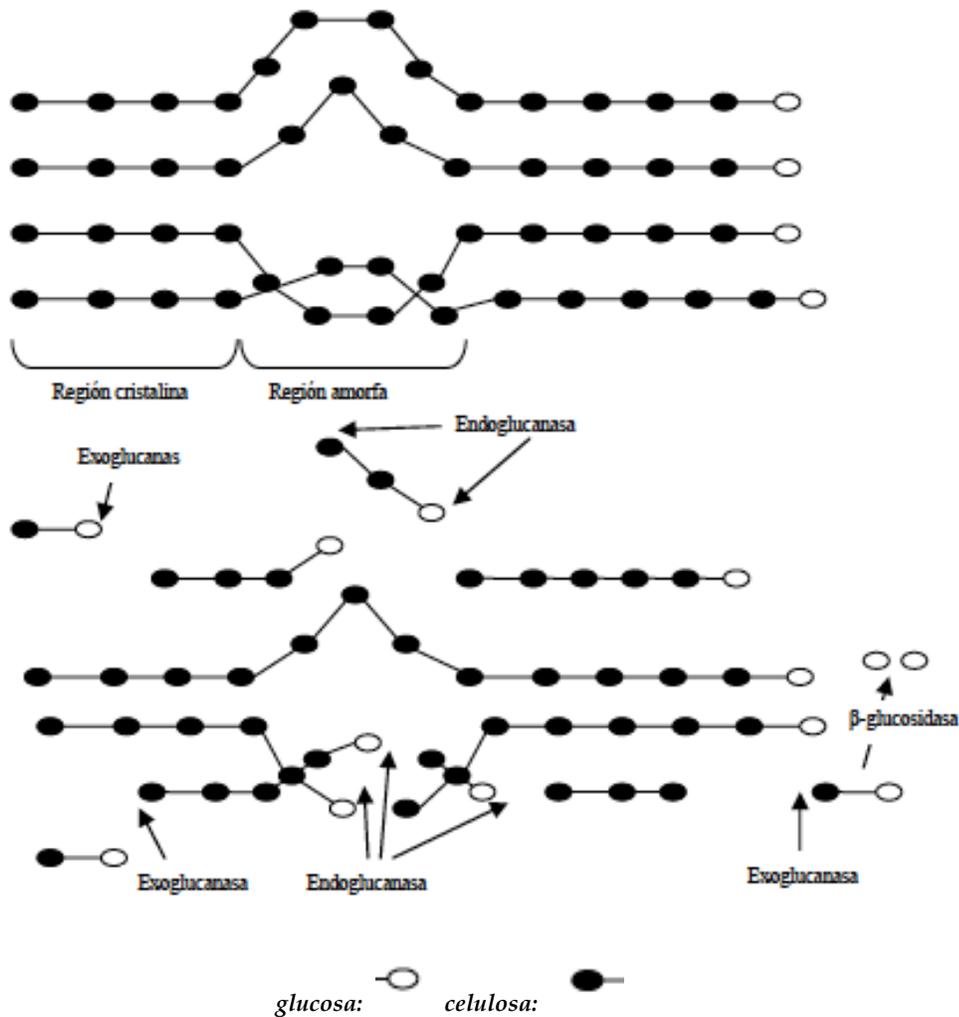


Figura 18. Acción de las celulasas (Barreto, S., 2008)

Los hongos de pudrición marrón utilizan un sistema celulolítico bien diferenciado del sistema hidrolítico de los hongos de pudrición blanca. Éstos pueden depolimerizar celulosa rápidamente a través de un mecanismo que involucra a la endoglucanasa y a factores no proteicos, entre ellos H_2O_2 y Fe^{+2} , ya que producen endoglucanasas y β -glucosidasas, pero aparentemente no producen exoglucanasas (Coughlan & Ljungdahl 1998).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 19 se presenta un diagrama en el cual se muestra la metodología utilizada en este trabajo. A continuación se realiza la descripción de cada etapa del proceso.

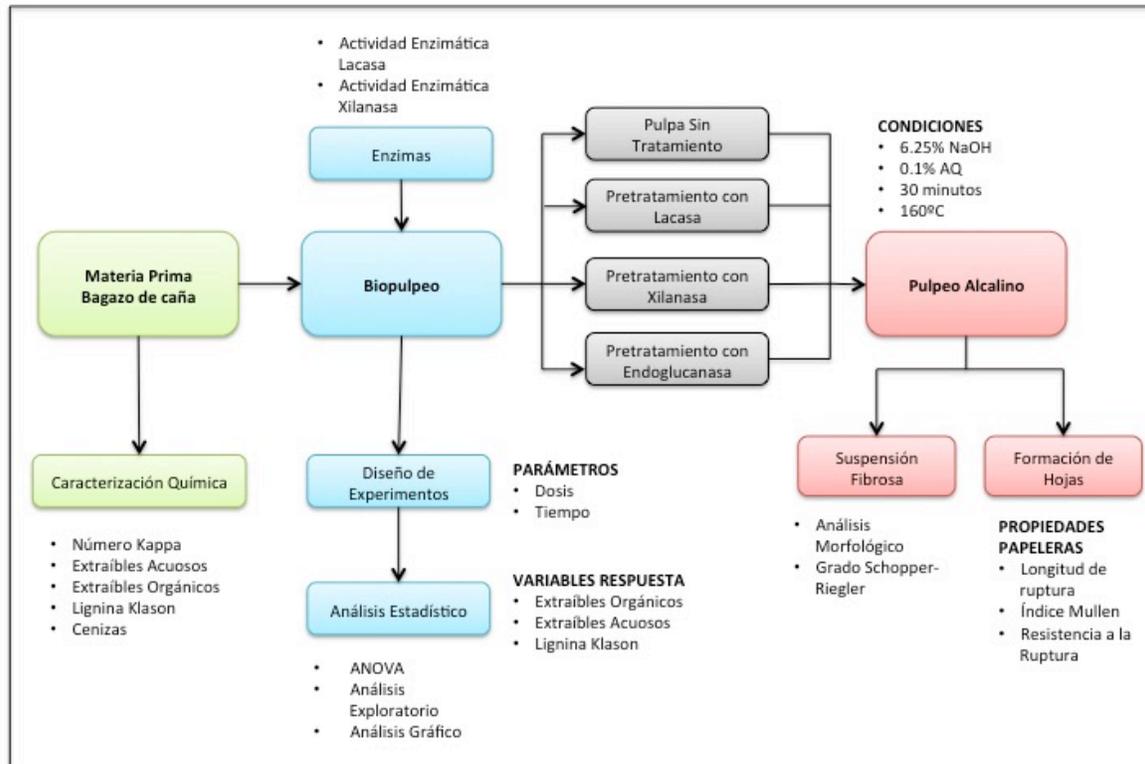


Figura 19. Diagrama del proceso realizado

4.1. Caracterización química de la materia prima (bagazo de caña)

Se caracterizó el bagazo de caña desmedulado mediante normas estandarizadas TAPPI, cuantificando: extraíbles orgánicos (TAPPI T-264-om-97), extraíbles acuosaos (TAPPI T-207-om-93), lignina Klason (TAPPI T-207-om-88), porcentaje de cenizas (TAPPI T-211-om-93) y número Kappa (TAPPI T-236-om-85). La caracterización se realizó a la materia prima antes y después del proceso de pulpeo alcalino, para establecer los rendimientos de las pulpas.

4.2. Actividades enzimáticas

Se determinaron las actividades enzimáticas por medio de ensayos químicos para cuantificar las cinéticas enzimáticas. Este procedimiento se realizó con el fin de saber la actividad real de las enzimas empleadas en el ensayo, con los valores de actividad obtenidos se calcularon las cantidades de enzimas requeridas en cada tratamiento.

Para la **lacasa**, se determinó la actividad monitorizando la oxidación de ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazoline-6-sulphonico) a 420 nm. La cuantificación se realizó adicionando 10 μL de la solución que contiene la enzima, 5 μL de solución tampón de acetato de sodio 100 mM y pH 4 y 400 μL del reactivo ABTS 1 mM. La reacción se realizó durante 1 minuto. La oxidación del ABTS se siguió por el incremento en la absorbancia a 420 nm y 25 °C. La actividad enzimática de la lacasa está definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar una micromol de ABTS por minuto a 25°C y pH 4 (Agudelo & Muñoz 2013).

Para la **xilanasa**, se determinó la actividad midiendo azúcares reductores por la reacción con ácido dinitrosalicílico (DNS, por sus siglas en inglés), a 540 nm. La cuantificación se realizó diluyendo 10 μL de la solución que contiene la enzima en un volumen final de 2000 μL en solución de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.6 y 0.5% (w/v). La actividad enzimática de la xilanasa está definida como la cantidad de enzima requerida para producir una micromol de azúcar reductor por minuto a 50 °C y pH 7.6. (Bendl et al., 2008).

4.3. Biopulpeo

El biopulpeo se realizó evaluando dos enzimas comerciales sobre el bagazo de caña, lacasa y xilanasa. Se cuantificó la actividad de las enzimas utilizando el método propuesto por (Bendl & Woolridge 2008) como se mencionó en el numeral anterior.

De acuerdo a la bibliografía revisada se tomaron dos valores (máximo y mínimo) para las dosis y los tiempos de duración del biopulpeo, como se muestra en la Tabla 10 (Rico Campos, 2010) (Zhao et al., 2002).

Tabla 10. Dosis y tiempos del biopulpeo para cada enzima

Enzima	Dosis mínima (UI/g)	Dosis máxima (UI/g)	Tiempo mínimo (min)	Tiempo máximo (min)
Lacasa	3.0	15.0	60.0	240.0
Xilanasa	5.0	20.0	60.0	240.0

Se realizó, un análisis estadístico de los datos para lacasa y xilanasa como se explica en detalle en el siguiente numeral.

En el biopulpeo, además de la lacasa y la xilanasa se evaluaron las propiedades papeleras con endoglucanasa comercial proporcionada por LC Paper. Las condiciones fueron proporcionadas por el grupo de investigación LEPAMAP (González et al., 2013).

4.4. Análisis estadístico y gráfico de los datos

Se realizó, inicialmente, un diseño de experimentos de selección 2^2 con punto central y tres repeticiones y sus variables respuesta, extraíbles orgánicos (%), acuosos (%) y lignina Klason (%). De este diseño se obtienen las tablas ANOVA y las R^2 para cada variable respuesta.

Debido a que no se logró el ajuste esperado de los datos se realizó una comparación de los datos usando el software Codapack mediante un análisis exploratorio de datos (Pawlosky, Egozcue & Tolosana 2015). Este análisis se llevó a cabo con la colaboración del Departamento de informática y matemática aplicada de la Universidad de Girona.

En el análisis se empleó el diagrama *biplot*, que es una representación gráfica de datos multivariantes, que muestra la distribución conjunta de tres o más variables. El *biplot* aproxima la distribución de una muestra multivariante en un espacio de dimensión reducida, normalmente de dimensión dos, y superpone sobre la misma, representaciones de las variables sobre las que se mide la muestra. Las representaciones de las variables son normalmente vectores, y coinciden con las direcciones en las que mejor se muestra el cambio individual de cada variable (Varela & Blazquez 2002). En lugar de considerar cada una de las variables separadamente (análisis univariado), se construye un número (generalmente reducido) de nuevas variables sintéticas de tal manera que estas nuevas variables

contengan una alta proporción de la información contenida en el conjunto de variables originales (Pinzón, L.M., 2012).

Para realizar el diagrama *biplot* se requiere modificar los datos a una transformación log-cociente, donde, dada una composición con D partes, la transformación log cociente centrada (clr) de $X \in S^D$ a $Z \in \mathfrak{R}^D$ se define como:

$$Z = clr(X) = \left(\ln\left(\frac{x_1}{g(X)}\right), \ln\left(\frac{x_2}{g(X)}\right), \dots, \ln\left(\frac{x_D}{g(X)}\right) \right)^t$$

donde $g(X)$ es la media geométrica de las D componentes de X (Casceres 2015).

Finalmente se realizó el **análisis gráfico** donde se presenta un gráfico de pirámides que relaciona las tres variables del efecto de las dosis de lacasa (UI/g) y los tiempos (minutos) sobre los extraíbles orgánicos (%), extraíbles acuosos (%) y lignina Klason (%), respectivamente.

Se busca con estas gráficas observar los efectos del tratamiento y analizarlos para cada una de las enzimas de acuerdo al efecto que producen en las fibras.

4.5. Pulpeo alcalino

Las fibras pretratadas se introdujeron en un digestor con NaOH 6.25% a una temperatura de 160°C durante 30 minutos. Luego se llevó la pulpa a una suspensión al 1% aproximadamente, se procedió a la formación y secado de hojas de pasta. Posteriormente se evaluaron en las hojas factores como el rendimiento del pulpeo alcalino, el grado Schopper-Riegler (TAPPI T-227-om-94), el número Kappa (TAPPI T-236-om-85), la longitud de ruptura (TAPPI T-404-om-87), el factor de estallido (TAPPI T-403-om-85), el factor de rasgado (TAPPI T-414-om-88), la porosidad Gurley (TAPPI T-460-om-11), la cohesión interna o *internal bond strenght* (TAPPI T-569-om-09) y el análisis morfológico de las fibras para obtener el diámetro, la longitud y el porcentaje de finos de las fibras.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En primer lugar se realizó una caracterización previa de la fibra, una cuantificación de las actividades enzimáticas y la determinación de las condiciones de operación. Posteriormente, se realizó el biopulpeo y el pulpeo químico con las enzimas comerciales lacasa, xilanasa y endoglucanasa sobre el bagazo de caña. Finalmente, para constatar su efecto, se evaluaron las propiedades papeleras de las pulpas obtenidas.

5.1. Caracterización química del bagazo de caña

La composición química de la madera y desechos agrícolas es principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina, y pequeñas cantidades de otros componentes químicos tales como resina, ácidos grasos, triglicéridos, esteroides y ésteres generalmente clasificados como extractivos (Johansson, 2002).

El bagazo de caña desmedulado se caracterizó mediante Normas TAPPI, en la Tabla 11 se reportan los resultados obtenidos y la comparación con los valores reportados por otros autores para la fracción fibrosa del bagazo o bagazo desmedulado, la médula representa del 18% al 20% del bagazo de caña.

Tabla 11. Caracterización química del bagazo de caña

Composición Química	Bagazo desmedulado experimental	Fracción fibrosa*	Fracción médula*
Cenizas totales (%)	1.84	1.4	5.5
Extraíbles orgánicos (%)	11.9	2.4	29
Extraíbles acuosos (%)	15.9	9.02	7.3
Lignina Klason (%)	17.1	19	21.7
Holocelulosa (%)	53.26	68.18	36.5

Fuente: (Sanjuán & Patt 2001)

Como se refleja en la Tabla 11 el bagazo desmedulado presenta una composición similar a los valores obtenidos en la literatura, siendo el contenido de extraíbles orgánicos y acuosos mayor para el bagazo experimental, esto puede deberse a que la fibra experimental puede contener trazas de médula; comparando con otros autores el valor de cenizas para el bagazo desmedulado es 0.44% más con respecto a la fracción fibrosa y 3.66% mayor para la fracción médula, en extraíbles orgánicos el valor experimental está 9.5% por encima del reportado para la fracción fibrosa y 17.1% por debajo comparado con la médula; para extraíbles acuosos el valor experimental se sitúa 6.88% y 8.6% por encima de la fracción fibrosa y la médula, respectivamente; en cuanto a la lignina Klason experimentalmente se obtiene un valor 1.9% por debajo de la fracción fibrosa y 4.6% de la médula.

5.2. Actividades enzimáticas

Se determinaron las actividades enzimáticas de las enzimas, lacasa y xilanasas, de acuerdo a la metodología propuesta por Daza (2013).

Las principales desventajas del pretratamiento con hongos, es el lento crecimiento de los éstos (2 a 4 semanas) y la pérdida del rendimiento debido a la degradación de los polisacáridos, junto con la degradación de la lignina durante el tratamiento con hongos. Para superar estos problemas es de interés utilizar enzimas aisladas. Una de las ventajas del tratamiento enzimático es que se tarda sólo unas pocas horas, un menor tiempo comparado con los tiempos requeridos en el tratamiento con hongos. Esto hace que el biopulpeo industrial pueda ser económicamente factible (Zhao et al. 2002).

La dosis de enzima debe buscarse para cada caso particular. En este caso se tiene una actividad de 28 UI/ g de enzima para la lacasa y de 13.5 UI/ g de enzima para la xilanasas, estas actividades se emplearon en el cálculo de los gramos de enzima utilizados en los tratamientos de las fibras. Este dato permite saber cuántos gramos de enzima se deberán pesar para garantizar que la actividad enzimática esté en un intervalo de 1 a 5 UI por gramo de pulpa (de acuerdo a especificaciones del fabricante) y además garantizar consistencias de la pulpa en torno al 10%, asegurando una mezcla eficaz de las pulpas con los reactivos.

5.3. Determinación de las condiciones de operación

Se realizó, inicialmente, un diseño de experimentos de selección 2^2 con punto central y tres repeticiones para la lacasa y xilanasa, las variables respuesta fueron, extraíbles orgánicos (%), acuosos (%) y lignina Klason (%). De este diseño se obtuvieron las tablas ANOVA y las R^2 para cada variable respuesta.

La endoglucanasa se evaluó únicamente en las propiedades papeleras debido a que las dosis y tiempos de tratamiento fueron halladas en investigaciones anteriores por el grupo LEPAMAP y están establecidas (González et al., 2013a).

Analizando las tablas ANOVA y los valores de R^2 para cada variable respuesta, se obtiene que el 79.22% (que es el R^2 máximo obtenido) del modelo explica la variabilidad de los datos, por lo que se propone su análisis de forma gráfica.

En la Tabla 12 se muestran las tablas ANOVA realizadas en el diseño de experimentos usando el software Statgraphics.

Tabla 12. Análisis ANOVA y R^2 para lacasa y xilanasa

Análisis de varianza para extraíbles orgánicos en Lacasa					
Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Dosis	1.728	1.000	1.728	21.770	0.002
B:Tiempo	0.213	1.000	0.213	2.690	0.145
AB	0.212	1.000	0.212	2.670	0.146
Falta de ajuste	0.041	1.000	0.041	0.520	0.494
Error puro	0.556	7.000	0.079	'---	'---
Total (corr.)	2.748	11.000	'---	'---	'---
R-cuadrada (%)	78.282	'---	'---	'---	'---

Análisis de Varianza para Extraíbles Acuoso en Lacasa					
Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Dosis	2.174	1.000	2.174	2.930	0.138
B:Tiempo	2.590	1.000	2.590	3.500	0.111
AB	7.331	1.000	7.331	9.890	0.020
Falta de ajuste	0.183	1.000	0.183	0.250	0.637
Error puro	4.446	6.000	0.741	---	---
Total (corr.)	16.387	10.000	---	---	---
R-cuadrada (%)	71.751	---	---	---	---

Tabla 12: Continuación
Análisis de Varianza para Lignina Klason en Lacasa

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Dosis	8.371	1.000	8.371	7.940	0.031
B:Tiempo	9.158	1.000	9.158	8.680	0.026
AB	7.437	1.000	7.437	7.050	0.038
Falta de ajuste	0.826	1.000	0.826	0.780	0.410
Error puro	6.327	6.000	1.055	---	---
Total (corr.)	2.232	10.000	---	---	---
R-cuadrada (%)	67.956	---	---	---	---

Análisis de Varianza para Extraíbles Acuosa en Xilanas

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo	0.949	1.000	0.949	1.260	0.299
B:Dosis	20.638	1.000	20.638	27.330	0.001
AB	3.233	1.000	3.233	4.280	0.077
Falta de ajuste	0.975	1.000	0.975	1.290	0.293
Error puro	5.287	7.000	0.755	---	---
Total (corr.)	30.137	11.000	---	---	---
R-cuadrada (%)	79.223	---	---	---	---

Análisis de Varianza para Extraíbles Orgánicos en Xilanas

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo	4.521	1.000	4.521	5.980	0.040
B:Dosis	7.423	1.000	7.423	9.810	0.014
AB	0.286	1.000	0.286	0.380	0.556
Falta de ajuste	4.435	1.000	4.435	5.860	0.042
Error puro	6.053	8.000	0.757	---	---
Total (corr.)	21.297	12.000	---	---	---
R-cuadrada (%)	50.754	---	---	---	---

Análisis de Varianza para Lignina Klason en Xilanas

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo	27.121	1.000	27.121	8.540	0.019
B:Dosis	0.410	1.000	0.410	0.130	0.729
AB	4.066	1.000	4.066	1.280	0.291
Falta de ajuste	0.005	1.000	0.005	0.000	0.970
Error puro	25.401	8.000	3.175	---	---
Total (corr.)	56.760	12.000	---	---	---
R-cuadrada (%)	55.240	---	---	---	---

De acuerdo a lo observado en las tablas ANOVA y sus R cuadrados, se puede decir que las regresiones no se aproximan lo suficiente al 100%, esto se debe a que los datos no se ajustan satisfactoriamente a los modelos por lo que se aplican otras exploraciones estadísticas para estudiar el experimento caso de estudio.

5.3.1. Análisis estadístico:

En la Figura 20 y la Tabla 13 se muestran el gráfico biplot y el análisis de componentes principales para los datos obtenidos, usando el software Codapack (Egozcue & Tolosana 2011), allí se muestra el análisis de variabilidad de los tratamientos, por medio de la matriz de varianzas de los logcocientes simples, el *biplot* que muestra una proyección de los datos y de las variables clr (definición en el numeral 4.4 del documento) centradas (Egozcue & Pawlowsky 2011).

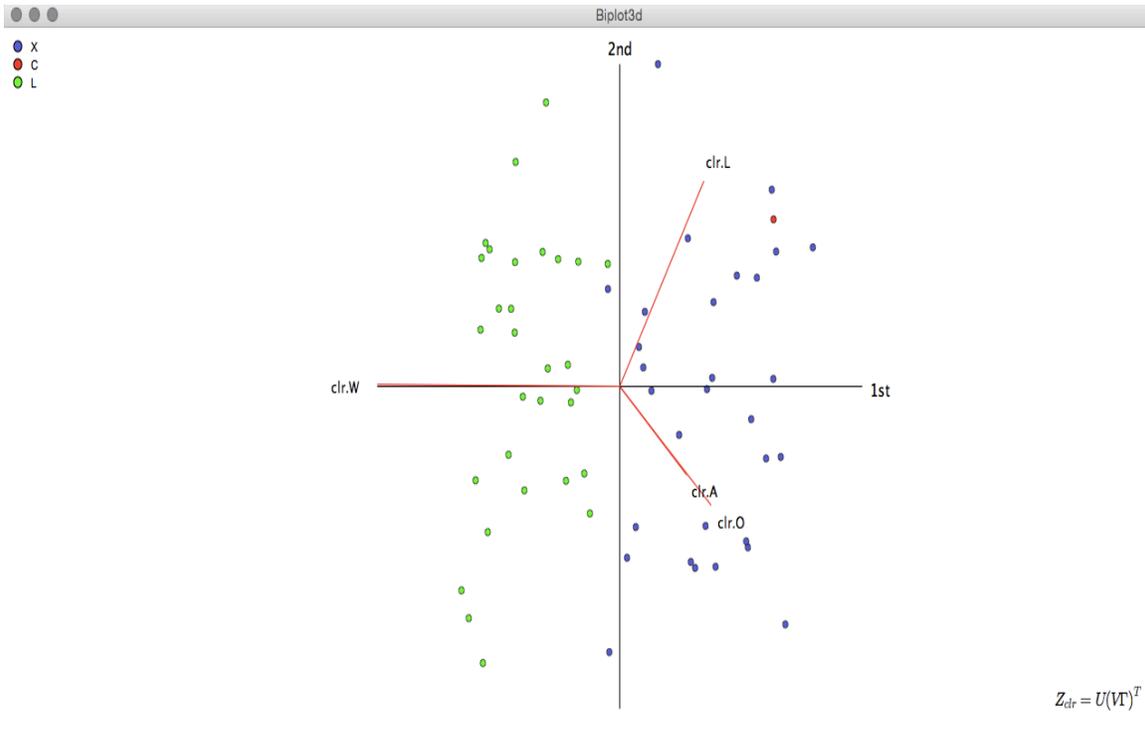


Figura 20. Gráfico biplot

Código	Descripción
X	Xilanasa
L	Lacasa
C	Control
clr O	Clr E. Orgánicos
clr A	Clr. E. Acuosos
clr L	Clr. Lignina Klason
clr W**	'=100-A-O-L

**Se creo la variable solo para efectos estadísticos

Tabla 13. Componentes principales de los tratamientos

	clr.O	clr.A	clr.L	clr.W	Cum. Prop. Exp.
PC1	0.3259	0.2386	0.2997	-8643	0.6386
PC2	-0.4694	-0.3493	0.8109	0.0078	0.9332

El gráfico muestra la proyección XY de los datos, ya que es la que más varianza aporta con respecto a las otras proyecciones, XZ, YZ; hay diferencias de W con la media geométrica de las demás variables O, A y L. La independencia de los rayos, es decir que no se presente superposición, es importante en este tipo de gráfico lo que se ve reflejado en la tabla con valores adecuados para las variables.

Las dispersiones de las medias en el gráfico pueden reunirse en dos subgrupos, unos a la izquierda, correspondientes a la xilanasas y otros a la derecha de lacasa. Esto confirma que las dos enzimas actúan de manera diferente. Mientras que la xilanasas realiza su actividad enzimática atacando a los xilanos, las lacasas intervienen los enlaces correspondientes a la lignina (Rico Campos, 2010).

La superposición de los ejes clr.A y clr.O en la proyección XY sugiere que las líneas en el gráfico están asociados entre sí, comportamiento que se debe a que estas dos extracciones se realizan de manera secuencial, esto es, primero se realiza la extracción con orgánicos y luego con acuosos.

La Tabla 13 por su parte, muestra las componentes principales donde se observa un 93.32% de variabilidad representada, lo que indica la adecuada confiabilidad de los datos. Asimismo, la tabla presenta la partición de los datos observada entre los valores cercanos a cero y los signos de cada valor.

Se puede obtener del análisis realizado que los datos tienen una alta variabilidad debido a que el tratamiento se realiza directamente sobre la fibra, sin tratamientos previos, por lo que el acceso de la enzima en ellas es más tortuoso y también que el tratamiento podría requerir una agresividad mayor que la estudiada (Wang et al., 2014).

La ubicación y dispersión de los puntos en el gráfico *biplot* refleja una alta variabilidad en los resultados de cada tratamiento. El uso de enzimas de manera directa sobre las fibras del bagazo, sin realizar en ellas un tratamiento previo (como un blanqueo o un refinado), limita el acceso de la enzima a su estructura química, haciendo más tortuoso su accionar (Martín-Sampedro, Eugenio, & Villar, 2012).

5.3.2. Análisis gráfico:

El análisis gráfico busca evaluar de manera analítica los resultados obtenidos directamente del tratamiento con enzimas. Este tratamiento con enzimas busca que se reduzcan las concentraciones de extraíbles orgánicos y acuosos; esto se logra

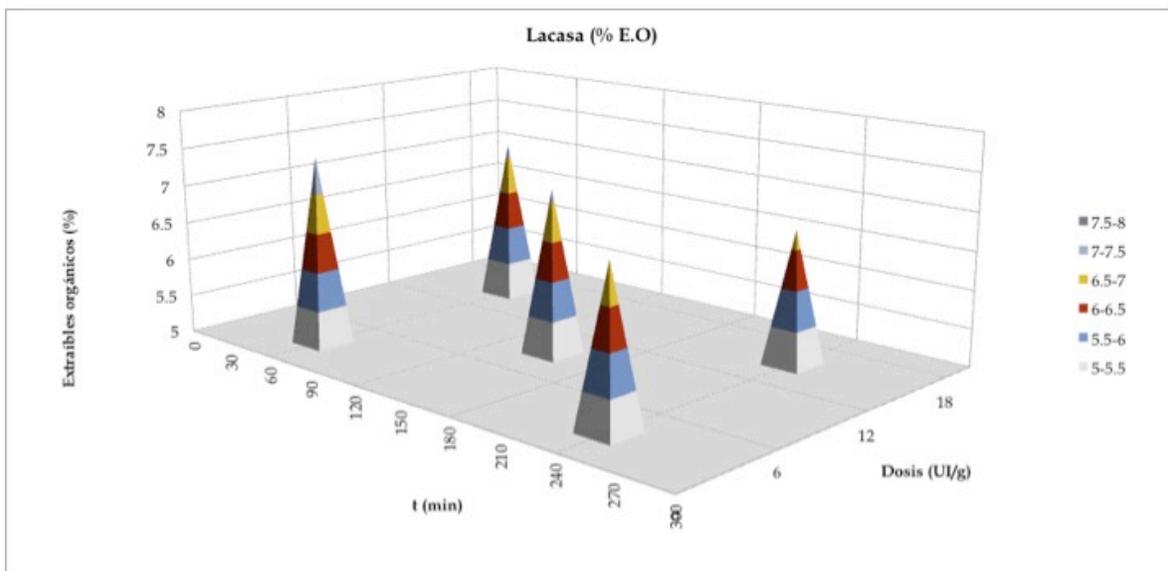
gracias a que la xilanasas rompe los enlaces glicosídicos internos del heteroxilano que se encuentra en las fibras liberando estos compuestos (Bastawde, 1992).

La lignina Klason también se ve afectada, se reduce, ya que la lacasa oxida los compuestos fenólicos presentes en la lignina degradando la misma.

Se caracterizó químicamente el bagazo desmedulado (ver apartado 4.1.) obteniendo como valores experimentales de control: extraíbles orgánicos 11.9%, extraíbles acuosos 15.9% y lignina Klason 17.1%. Estos valores serán usados como valores de referencia para el análisis.

Lacasa

En la Figura 21 se presenta el gráfico de pirámides en tres dimensiones que relaciona las tres variables del efecto de las dosis de lacasa (profundidad del gráfico) y los tiempos (sobre el ancho del gráfico) sobre los extraíbles orgánicos (EO), extraíbles acuosos (EA) y lignina Klason (LK) obtenidos, respectivamente. Queda representado así de manera gráfica el valor de la variable (EO, EA o LK) de acuerdo a las condiciones de operación (dosis y tiempo), buscando la combinación de condiciones que favorezcan la reducción en la variable (E.O., E.A. o L.K.).



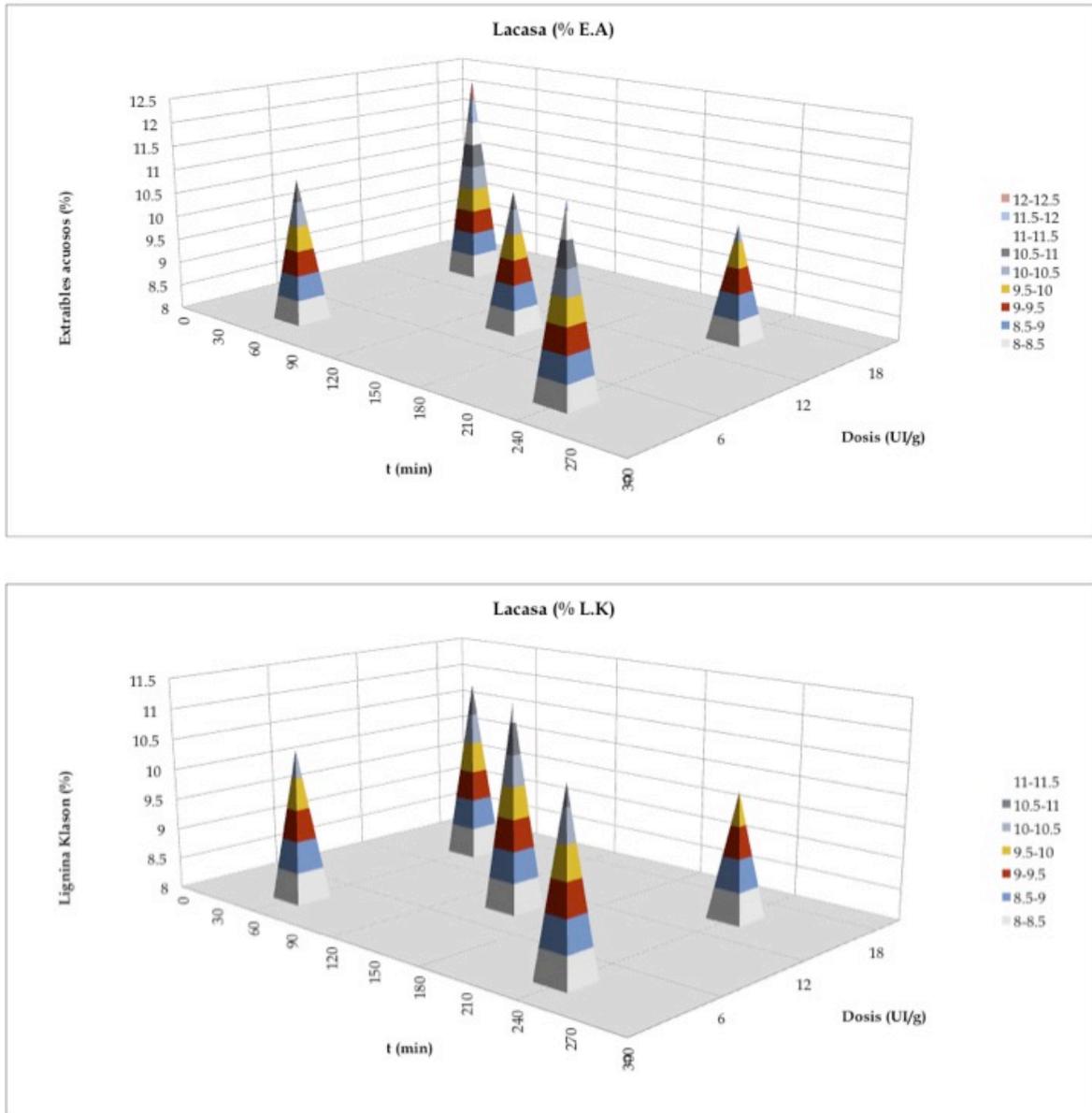


Figura 21. Evaluación de lacasa sobre las fibras

El gráfico de extraíbles orgánicos muestra que para la mayor dosis (15UI/g) y el mayor tiempo (240 min) se presenta un 5.14%, 5.55% y 7.07% menos de extraíbles orgánicos, acuosos y lignina Klason, respectivamente, comparado con el control.

El volumen de la enzima lacasa es un condicionante para su ataque sobre materiales lignocelulósicos. Se ha supuesto entonces que dicho ataque sólo tiene lugar en la superficie de las fibras, la única zona accesible a la enzima. En la degradación natural, este ataque ocurre además en la superficie del lumen de las

fibras, ya que esta región es la vía de ataque de la enzima. Otro modo de actuación es la cooperación de la enzima con mediadores, compuestos de bajo peso molecular que accederían y oxidarían la lignina fuera del alcance de la enzima lo que hace que se amplíe el rango de funcionamiento de la misma; este modo de actuación se debe también a que a mayor tiempo de tratamiento se garantiza la acción del mediador y existe una mayor oxidación de compuestos fenólicos por acción de la lacasa; es por esto que se obtiene una reducción del 7.07% para la lignina Klason para el mayor tiempo de contacto y la mayor dosis de enzima (Saad et al. 2008; Corral & Villaseñor 2006).

Se sabe que el tratamiento enzimático elimina la mayoría de los triglicéridos, ésteres de esteroides y glicosídicos esteroidales. También el sistema lacasa-mediador elimina en gran parte, los ácidos grasos, que son eliminados en menor medida que los otros compuestos lipofílicos, estos compuestos pertenecen a los extraíbles orgánicos que se reducen un 5.14% con respecto al control (Rico Campos, 2010).

En la Figura 22 se presentan las barras de error de los datos obtenidos.

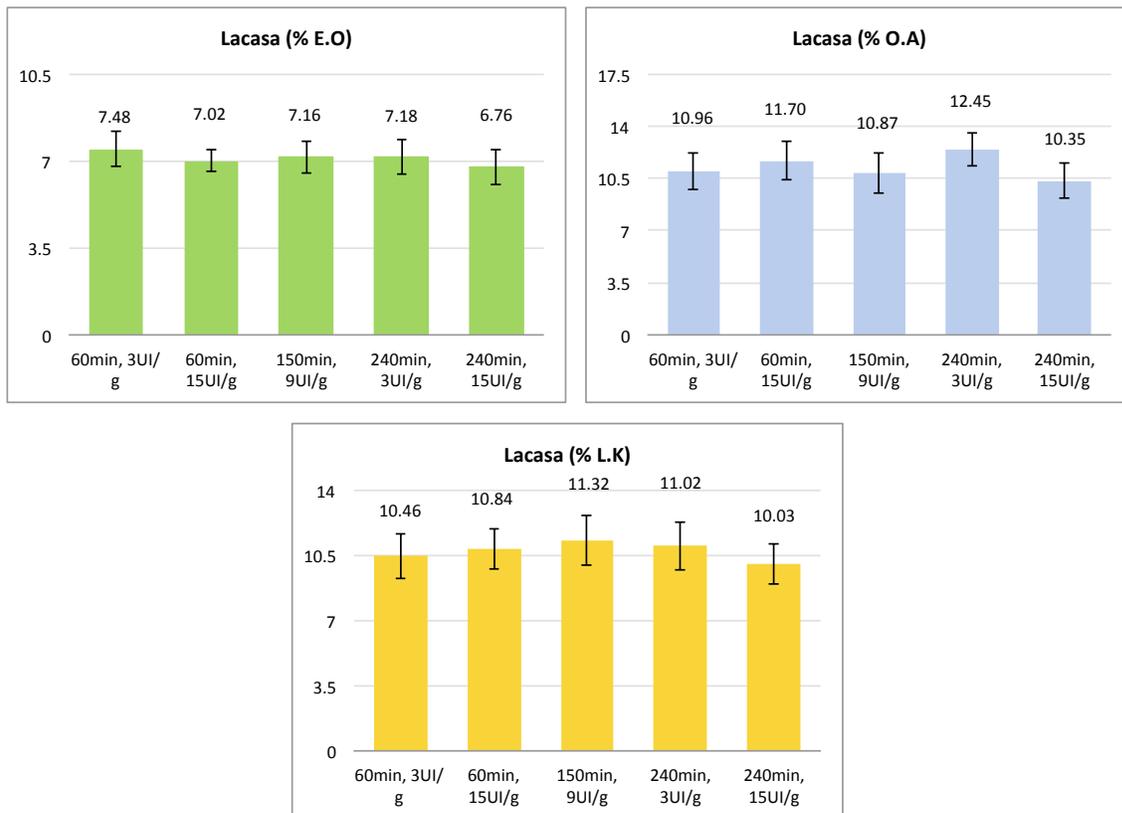
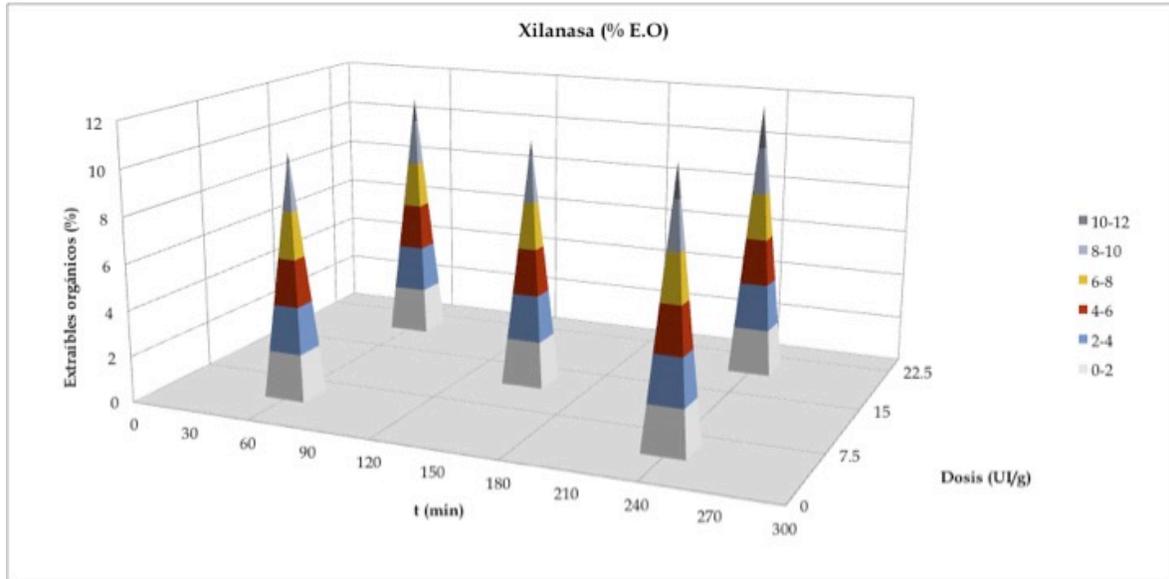


Figura 22. Barras de error para lacasa

Las barras representan las desviaciones estándar de los datos obtenidos, donde los cambios entre datos de las diferentes dosis y tiempos son reducidos debido a que la acción de las enzimas sobre la fibra sin tratamientos previos puede ser de difícil acceso para las enzimas, por lo que la literatura emplea microorganismos y/o tratamientos previos a la pulpa (como pulpeos químicos, blanqueos por etapas, entre otros) lo que hace que las fibras sean más accesibles y se logre la penetración de las enzimas (Ramos et al. 2001).

Xilanasa

En la Figura 23 se presenta el gráfico de pirámides en tres dimensiones que relaciona las tres variables del efecto de las dosis de xilanasa (profundidad del gráfico) y los tiempos (sobre el ancho del gráfico) sobre los extraíbles orgánicos (EO), extraíbles acuosos (EA) y lignina Klason (LK) obtenidos, respectivamente. Queda representado así de manera gráfica el valor de la variable (EO, EA o LK) de acuerdo a las condiciones de operación (dosis y tiempo), buscando la combinación de condiciones que favorezcan la reducción en la variable (E.O., E.A. o L.K.).



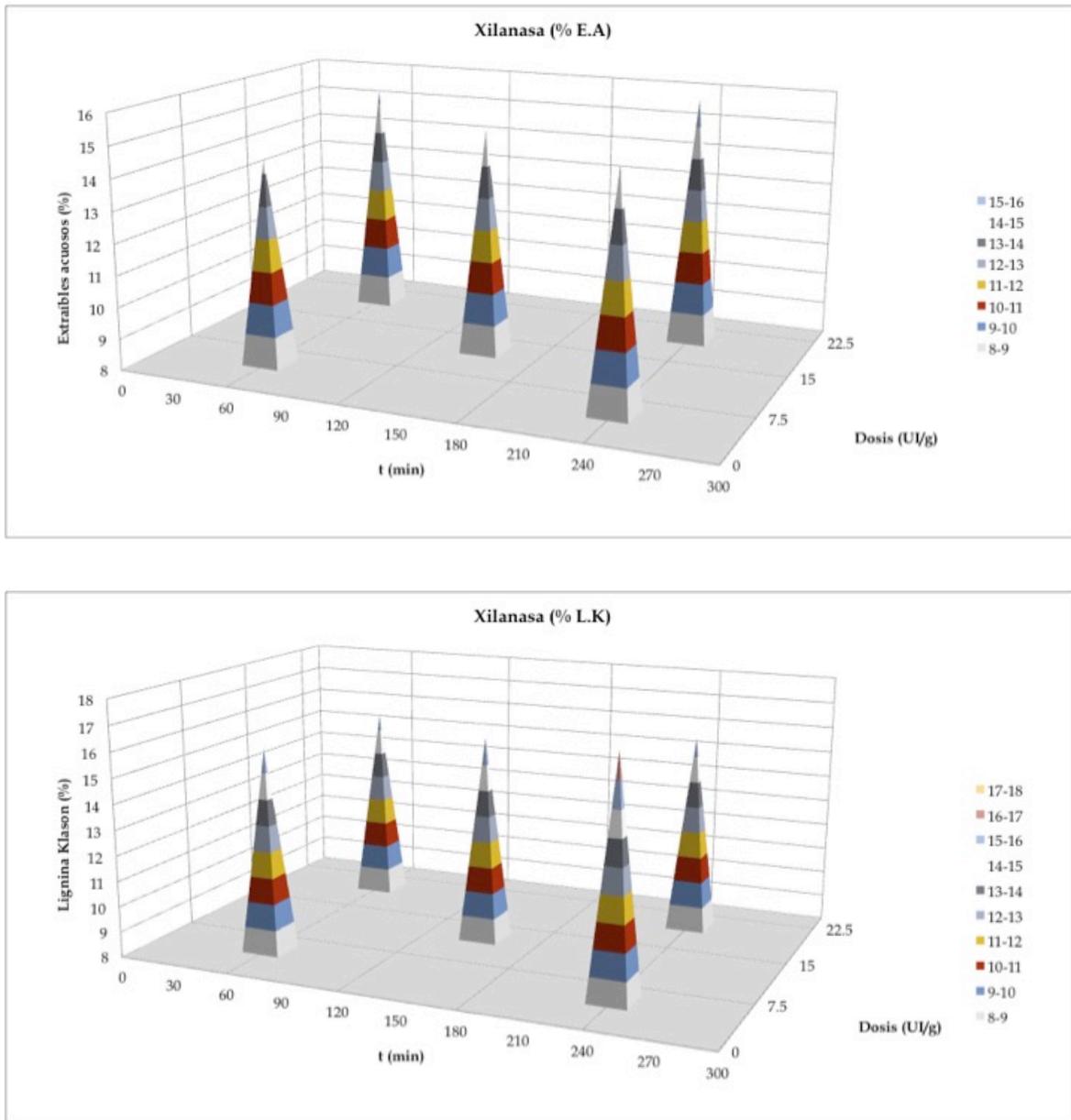


Figura 23. Evaluación de xilanasa sobre las fibras

El gráfico de extraíbles orgánicos muestra que para la menor dosis (5UI/g) y el menor tiempo (60 min) se presentan un 1.41%, 1.45% y 1.18% menos de extraíbles orgánicos (EO), acuosos (EA) y lignina Klason (LK), respectivamente, comparado con el control. Se seleccionó este tratamiento debido a que fue el que presentó la mayor reducción de EA, EO y LK con respecto a los demás.

Este efecto se debe a que se rompen enlaces glucosídicos internos de la columna vertebral del heteroxilano por acción de la xilanasas formando oligómeros o azúcares de bajo peso molecular que pueden ser extraídos en agua, tal como se describió en el mecanismo del numeral 3.1.5 de la enzima. Las xilanasas atacan la unión lignina-carbohidrato haciendo que pequeñas fracciones de lignina sean solubles en los extraíbles orgánicos y en la lignina Klason (Corral & Villaseñor 2006).

El ataque del sustrato por la xilanasas no es aleatorio y depende de la duración y el grado de ramificación del mismo o la presencia de sustituyentes específicos, ahí las hemicelulosas, que se definen como la fracción de las paredes celulares vegetales que permanecen después de la eliminación de celulosa y pectina, pueden removerse del material fibroso o del tejido deslignificado por extracción con álcali o agua. Aunque las endo-enzimas (xilanasas) actúan sólo en secuencias ininterrumpidas, estas también escinden la cadena principal sólo en la proximidad inmediata de una región sustituida (Corral & Villaseñor 2006).

Las barras de error de la Figura 24 representan las desviaciones estándar de los datos obtenidos, donde los cambios entre datos de las diferentes dosis y tiempos son, al igual que para lacasa, reducidos debido a que la acción de las enzimas sobre la fibra sin tratamientos previos puede ser de difícil acceso para las enzimas, por lo que la literatura emplea microorganismos y/o tratamientos previos a la pulpa (como pulpeos químicos, blanqueos en etapas, entre otros) lo que hace que las fibras sean más accesibles y lograr la penetración de las enzimas (Ramos et al. 2001).

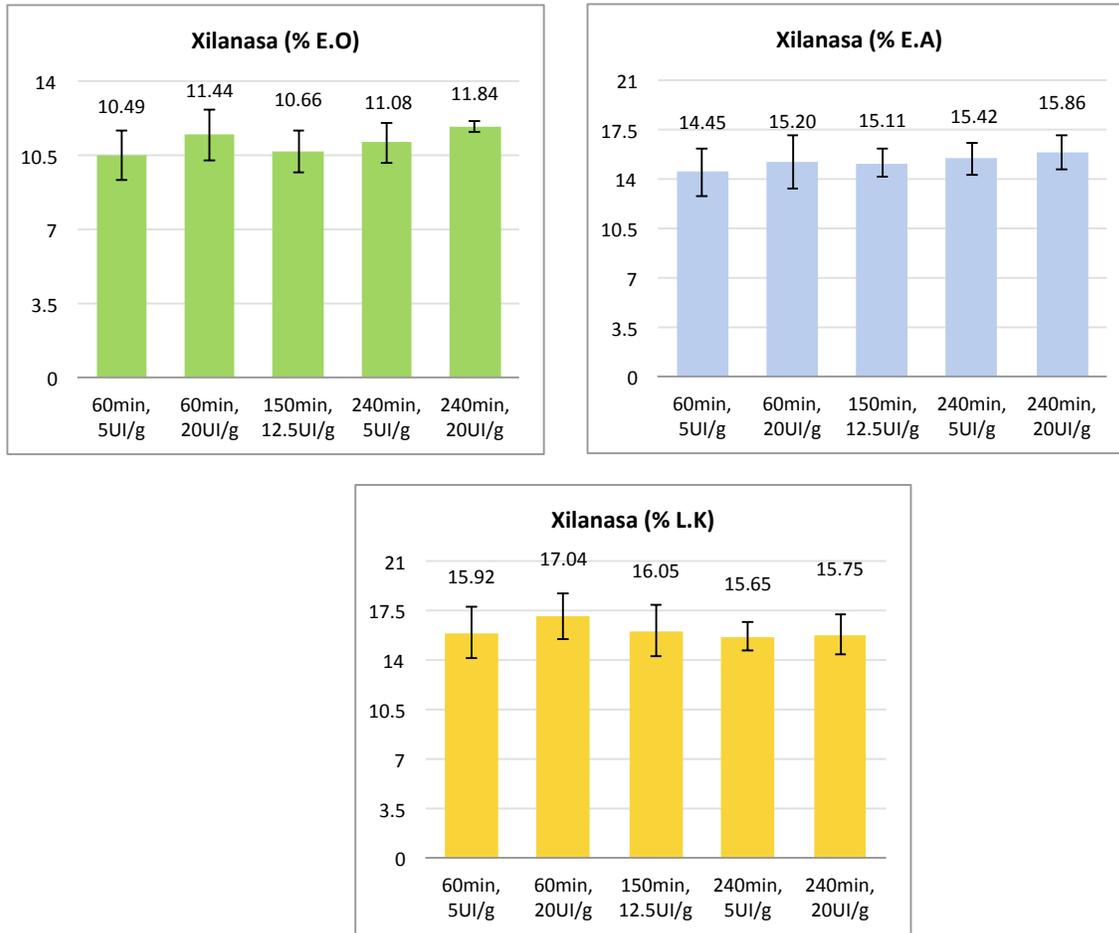


Figura 24. Barras de error para xilanasa

5.4. Biopulpeo y pulpeo químico

Es bien sabido que los extractivos de madera, resinas y grupos acetilo son responsables de consumo de álcali en la fase inicial de la fabricación de pasta Kraft. La alta eliminación de extractivos durante la biodegradación debe proporcionar cierta reducción en el álcali necesario para la cocción. La eliminación de extractivos puede resultar en canales de resina sin obstáculos, facilitando la penetración del licor y la reducción del consumo de álcali activo por componentes que no son lignina. En realidad se ha reportado beneficio para astillas de madera, así como para las virutas de madera en un tratamiento con hongos no degradadores de lignina (Ferraz & Mendonça 2002).

En este estudio, se aplicó un biopulpeo a las fibras y seguidamente un pulpeo a la sosa; como tratamiento enzimático además de la lacasa y la xilanasa se evaluó la

endoglucanasa proporcionada por LC Paper con las condiciones escogidas por el grupo LEPAMAP (González et al. 2013b).

En la Tabla 14 se muestran las condiciones seleccionadas para el tratamiento con cada una de las enzimas basadas en el diseño de experimentos. Las dosis obtenidas se hallaron de acuerdo al análisis de datos experimental realizado y a la bibliografía encontrada de biopulpeo para lacasa y xilanasa (Bendl et al. 2008), y en el caso de la endoglucanasa se siguieron las recomendaciones del proveedor.

Tabla 14. Condiciones de operación

Enzima	Dosis	Tiempo	Temperatura	pH
Lacasa	15 UI/g*	240 minutos	30°C	4
Xilanasa	5 UI/g*	60 minutos	50°C	7.6
Endoglucanasa	84 UI/g*	30 minutos	60°C	4.8

*Gramos de pulpa seca

5.4.1. Condiciones de pulpeo y rendimientos

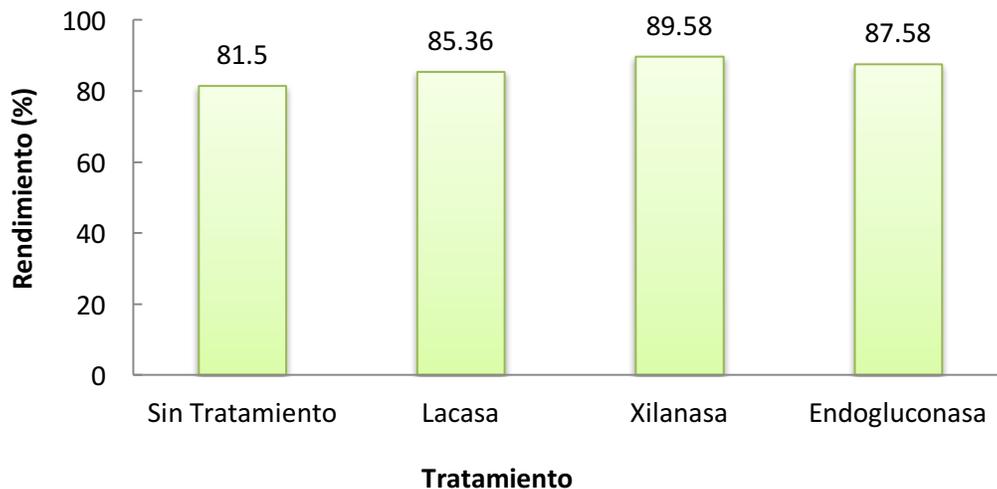
Se muestran en la Tabla 15 las condiciones del tratamiento químico realizado en todas las pulpas tratadas con las enzimas comerciales, lacasa, xilanasa y endoglucanasa, y otra pulpa como control para determinar los efectos de las enzimas. Estas son condiciones típicas para obtención de pulpas quimitermomecánicas, comúnmente usadas para residuos agroindustriales (Mutjé, Pèlach & Jiménez 2005).

Los residuos agroforestales normalmente se emplean para la producción de papeles de embalaje o tipo flutting y se intenta obtener el máximo rendimiento para evitar otros residuos y evitar la contaminación. Con el uso de enzimas se intenta aumentar el rendimiento de las cocciones y mantener o mejorar las propiedades papeleras de los mismos.

Tabla 15. Condiciones del pulpeo químico

Tipo de cocción	Químico-termo-mecánica
Hidromódulo	6:1
Temperatura (°C)	160
Tiempo (min)	30
%NaOH	6.25
%Antraquinona	0.1

Los resultados de los rendimientos obtenidos del tratamiento enzimático y el pulpeo químico se muestran en la Figura 25.


Figura 25. Rendimientos del pulpeo

Otros autores (Akhtar, Attridge & Kirk 1995) emplean en los tratamientos hongos de pudrición blanca que producen enzimas como manganoso peroxidasa, ligninoperoxidasa y lacasa por lo que los resultados de los tratamientos pueden ser diferentes al utilizar solo una enzima como en esta investigación. Los autores (Ramos et al., 2001) presentan un descenso del rendimiento a causa de las diferentes enzimas que atacan varias sustancias de las fibras y después de días de

tratamiento, en esta investigación, una única enzima actúa específicamente en una parte de la fibra por lo cual el rendimiento no cambia significativamente.

El rendimiento de la cocción y la propiedad de longitud de ruptura están muy asociados y generalmente cuanto menor es el rendimiento de la cocción mayor longitud de ruptura tendrá el papel ya que se degrada la lignina y quedan las fibras más libres para entrelazarse.

Al efectuar una cocción con agentes químicos se degradan los enlaces aril-éter, aril-alquil y alquil-alquil en las moléculas de lignina por lo que el rendimiento de la cocción es menor. En la Figura 26 se muestran dichos enlaces.

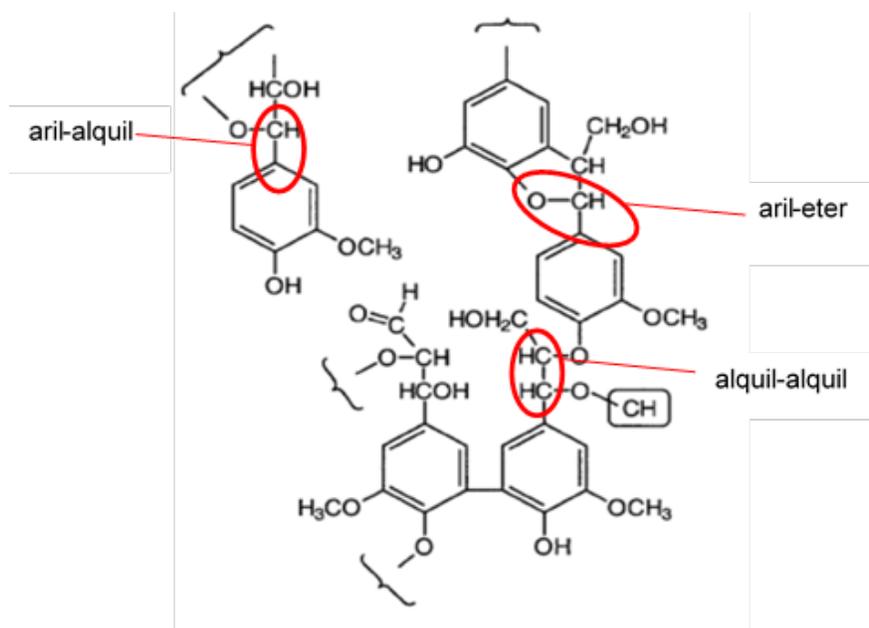


Figura 26. Principales enlaces presentes en las moléculas de lignina (Villar, 2008)

Se analizó cada tratamiento en función del número Kappa. El número Kappa indica la deslignificación de la pulpa, en esta investigación, todos los rendimientos de las pulpas están por encima del 80% por lo que la relación entre el número Kappa y la lignina residual no es lineal y solo da una aproximación sobre ésta (Li & Gellerstedt 1997).

La Figura 27 muestra el número Kappa de cada una de las pulpas.

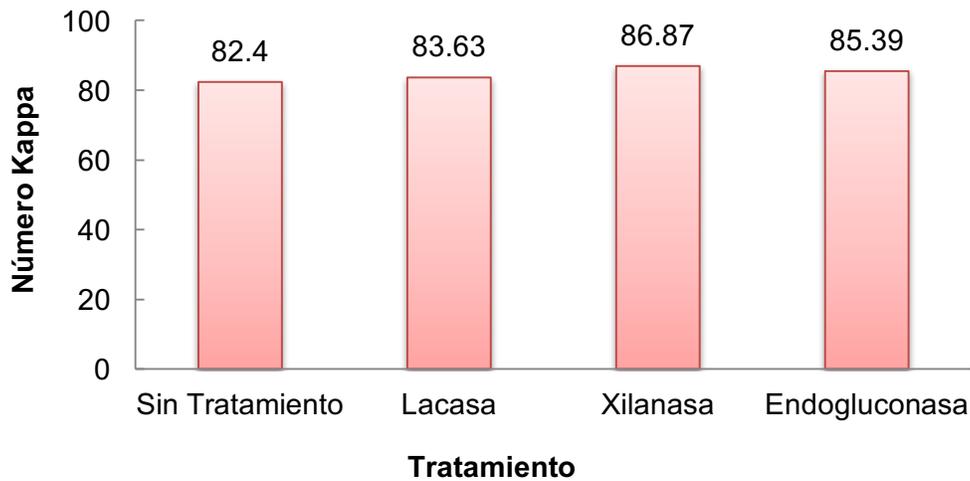


Figura 27. Números Kappa de pulpas tratadas

Para el número Kappa, cuanto menor sea el valor, menor es la cantidad de lignina presente en las pulpas; esto se debe a la acción de las manganoso peroxidadas (MnP) y lacasas (Lac), ya que a mayor acción de las enzimas se aumenta la deslignificación causada por éstas.

Los tratamientos con enzimas consiguen aumentar el rendimiento de la cocción respecto al de la cocción sin tratamiento pero no consiguen eliminar la lignina, debido a la complejidad de la molécula; se consigue atacar algunos enlaces y reducir su peso molecular aunque aún quede presente en la fibra.

Asimismo, la adición del sistema lacas-mediador en el material sin tratamientos previos puede causar un incremento en el número kappa, esto se puede evidenciar por la dificultad de permear las fibras (Sampedro, Eugenio & Villar 2012).

5.4.2. Propiedades de la pulpa obtenida en el biopulpeo.

Para la caracterización de las pulpas se determinaron las propiedades papeleras tales como, grado Schopper-Riegler, morfología de las fibras (longitud, diámetro y porcentaje de finos), resistencia a tracción (fuerza máxima y longitud de ruptura), ensayo de delaminación interna (Scott), índice Mullen, rasgado y porosidad Gurley. Los resultados obtenidos se muestran en la

Tabla 16.

Tabla 16. Propiedades papeleras de la pulpa para lacasa, xilanasa y Endoglucanasa

Muestra	Schopper (°SR)	Gramaje (g/m ²)	Espesor (μm)	Longitud (mm)	Finos (%)	Diámetro (μm)	Resistencia a la ruptura (N/15mm)	Resistencia a la ruptura (kN/m)
Sin Tratamiento	27.30±0.4	75.55±0.9	0.15±0.01	0.78±0.01	21.90±0.3	23.60±0.1	60.22±3.7	4.01±0.3
Lacasa	37.30±1.8	76.32±1.0	0.15±0.1	0.64±0.1	33.20±3.9	24.00±0.1	56.75±1.5	3.78±0.1
Xilanasa	26.8.0±1.8	76.84±0.62	0.15±0.1	0.76±0.1	24.30.±0.6	23.70.02	52.69±5.4	2.81±1.6
Endoglucanasa	21.50±0.7	75.94±1.1	0.15±0.1	0.82±0.1	17.70±0.4	24.00±0.1	61.50±3.4	4.10±0.2

Muestra	Índice de tracción (N.m/g)	Longitud de ruptura (m)	Estallido (kg/cm ²)	Índice Mullen (1000.(kg/cm ²)/(g/m ²))	Índice Mullen (kPa.m ² /g)	Rasgado (mN)	Rasgado (gF)	Índice rasgado (mN m ² /g)	Porosidad Gurley(s)
Sin Tratamiento	53.14±3.31	5417.00±337.6	1.76±0.1	23.35±0.2	2.29±0.1	356.50±10.9	36.40±1.1	4.70±0.2	73.00±12.6
Lacasa	49.82±1.4	5019.00±137	1.42±0.1	18.73±1.2	1.84±0.1	319.5±39.5	32.6±4.0	4.2±0.4	74.8±10.0
Xilanasa	37.01±21.1	4664.00±481.1	1.43±0.1	18.82±0.7	1.85±0.1	361.70±25.2	36.90±2.6	4.70±0.3	44.10±6.3
Endoglucanasa	53.99±2.9	5504.00±301.9	1.68±0.1	22.17±0.8	2.17±0.1	369.60±40.9	37.70±4.2	4.90±0.6	30.10±6.8

Se observa en la Figura 28 la evolución de los biopulpeos aplicados en cuanto a longitud de ruptura y grado Schopper.

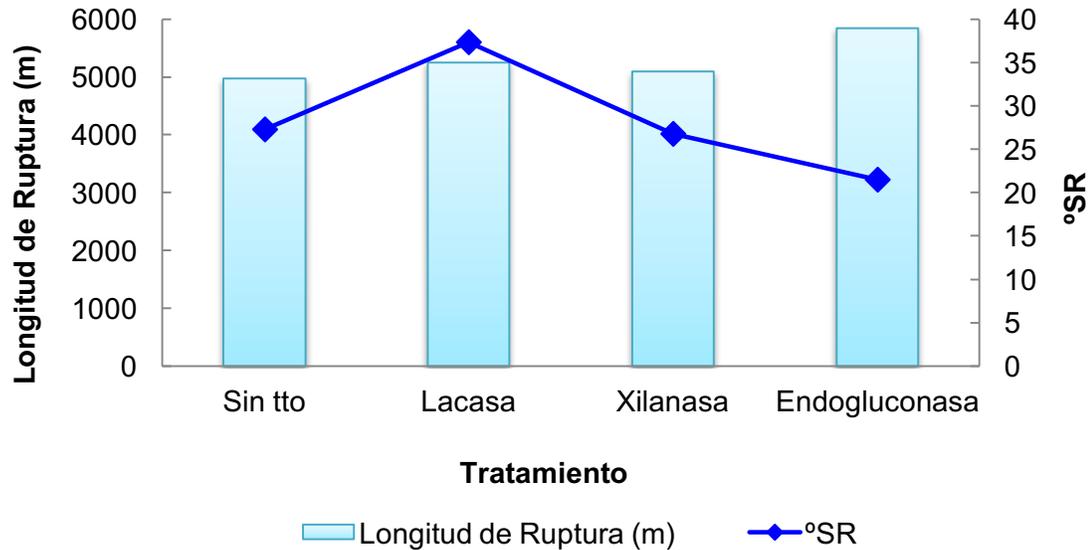


Figura 28. Longitud de ruptura y grado Schopper de las pulpas tratadas

A continuación se analizan las propiedades obtenidas para cada tipo de enzima aplicada en el biopulpeo

5.4.3. Propiedades de la pulpa obtenida en el ensayo con xilanasa.

El biopulpeo con xilanasa se usa principalmente para atacar las xilanas de las hemicelulosas de las fibras y degradar los enlaces químicos que unen la lignina a la madera. Las xilanas proporcionan la posibilidad de eliminar selectivamente hasta 20% de xilano en pulpa Kraft (Atik, Imamoglu & Bermek 2006).

La evaluación del efecto de la xilanasa respecto a la fibra sin tratamiento se realizó a partir de las propiedades papeleras mostradas en la Tabla 16.

La longitud de ruptura es una de las propiedades más importantes del papel y predice si el papel es o no apto para el uso que se le quiere dar. En este caso la longitud de ruptura del papel sin tratamiento es de 5417 m y una vez aplicado el tratamiento con xilanasa es de 4664 m. La reducción del 14% de la

longitud de ruptura, con respecto a la pulpa sin tratamiento, indica que si se quiere aumentar esa propiedad hasta los 5400 m se necesita o bien una cocción menos agresiva, ya que el uso de la enzima es limitada porque puede degradar en exceso la fibra, o bien un tratamiento posterior a la cocción; como la xilanasa actúa sobre las hemicelulosas de la pared primaria (más rica en xiloglucanos) puede que facilite un posterior tratamiento, ya sea con un refinado mecánico, la aplicación de nanofibras de celulosa (CNF) o un biorefinado. Al dejar más fácil la entrada a las capas internas de la fibra, éstas tienen más capacidad de hidratación lo que implica una mejora para el refinado mecánico o también para que diferentes enzimas traten las paredes interiores con un biorefinado posterior.

Por su parte, el grado Schopper no presenta variaciones significativas. En cuanto a las demás propiedades, índice Mullen, rasgado y porosidad, no se presentaron diferencias significativas.

Esto significa que el pretratamiento con xilanasa no sólo puede mejorar la aptitud al pulpeo de la fibra, sino también disminuir el consumo de sosa durante la cocción. Es decir, el tratamiento de la fibra con xilanasa antes de la fabricación de pastas podría reducir la carga de sosa requerida para lograr el mismo nivel de deslignificación (Zhao et al. 2002)

5.4.4. Propiedades de la pulpa obtenida en el ensayo con lacasa.

La aplicación del sistema Lacasa-Mediador promueve buenas propiedades de tracción que se debe al hinchamiento y la unión entre las fibras (Chen et al. 2012).

En esta investigación se tiene que la longitud de ruptura del papel tratado con lacasa es de 5053 m, 400 m inferior a la fibra sin tratamiento. El objetivo de la lacasa es romper la molécula de lignina en moléculas más pequeñas produciendo pérdidas en la resistencia mecánica y un abuso de ella ocasiona una disminución de las propiedades como la longitud de ruptura, entre otras.

Respecto el grado Schopper, aunque la longitud disminuya, éste aumenta hasta un valor de 37 puntos, 11 más que la fibra sin tratamiento provocando así una disminución de la drenabilidad de la suspensión fibrosa. Esta disminución puede ser provocada por el aumento del porcentaje de finos de la suspensión, diferente a lo que sucede con la xilanasa donde la formación de finos no es apreciable como efecto del tratamiento. Partiendo de un

porcentaje de 21.88% sobre la fibra sin tratar, una vez tratada estos llegan hasta el 33.23% con el correspondiente incremento del grado Schopper-Riegler.

Los tratamientos con la enzima lacasa y los mediadores naturales no mejoran, significativamente, las condiciones evaluadas en papel, este hecho podría deberse a que el mediador se queda unido o retenido en la pasta (Rico 2010).

5.4.5. Propiedades de la pulpa para el ensayo con endoglucanasa.

Se encontró que la longitud de ruptura se mantiene en los 5500 m (incluso sube 100 m), por lo que se puede decir que la aplicación de endoglucanasa consigue una reducción en los costes energéticos (por que se pueden bajar las condiciones de operación y mantener las propiedades papeleras) de la cocción de la pulpa manteniendo las propiedades papeleras más importantes.

Además la drenabilidad de la suspensión fibrosa aumenta considerablemente pasando de un grado Schopper de 27 hasta uno de 22, lo que mejora la fabricación de papel a nivel industrial. Comparándolo con el porcentaje de finos también se ve una disminución: 17.7% de finos con endoglucanasa respecto a los 21.88% de la pulpa sin tratamiento; esta es la característica principal por la cual se explica la reducción del °SR en esta pulpa. La endoglucanasa, a su vez, es capaz de actuar sobre la estructura cristalina de la celulosa reduciendo la cantidad de celulosa amorfa; el ataque se puede producir en cualquier posición de la cadena lineal produciendo un incremento de las propiedades mecánicas de la pulpa, viéndose reflejado en el leve aumento de la propiedad (Ek 2009b). La Endoglucanasa consigue aumentar el rendimiento y mantener la propiedad de la longitud de ruptura, que es uno de los objetivos de esta investigación.

5.4.6. Análisis estadístico de algunas propiedades papeleras.

Se realizó el análisis estadístico para observar el efecto del biopulpeo sobre las pulpas obtenidas, evaluando las propiedades papeleras de mayor relevancia, longitud de ruptura e índice Mullen.

Se observan los resultados para longitud de ruptura en la Figura 29.

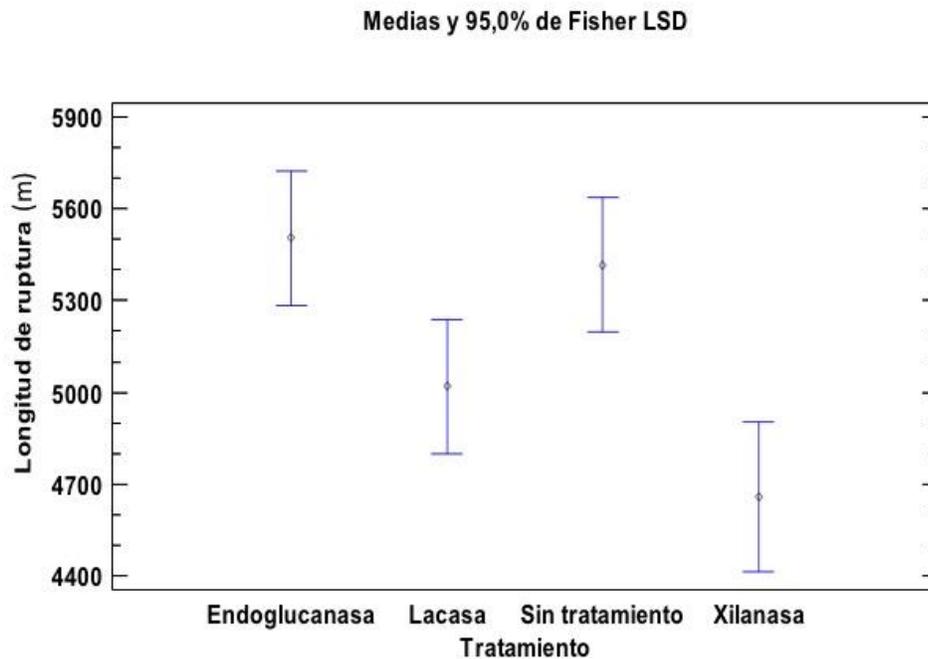


Figura 29. Gráfico de las medias para longitud de ruptura por tratamiento.

Este gráfico muestra diferentes estadísticos de longitud de ruptura para cada uno de los tratamientos. La intención principal del análisis de varianza de un factor es la de comparar las medias de los diferentes tratamientos. Se observa además, que tanto la xilanasas como la lacasa reducen la longitud de ruptura, comparados con el ensayo sin pretratamiento enzimático y la endoglucanasa mantiene estable la propiedad. Esto se debe a la acción de las enzimas presentes en cada tratamiento, en el caso de lacasa y xilanasas, éstas degradan enlaces de las fibras (fenólicos, no fenólicos y glucosídicos, respectivamente) lo que causa daño en la estructura de la misma y se ve en la reducción de la propiedad, la endoglucanasa a su vez, es capaz de actuar sobre la estructura cristalina de la celulosa reduciendo la cantidad de celulosa amorfa; el ataque se puede producir en cualquier posición de la cadena lineal produciendo un incremento de las propiedades mecánicas de la pulpa, viéndose reflejado en el leve aumento de la propiedad (Ek, M, 2009b).

El análisis estadístico descompone la varianza de la longitud de ruptura en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de

grupos. La razón F, que en este caso fue igual a 6.33, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos.

Los resultados para índice Mullen se observan en la Figura 30.

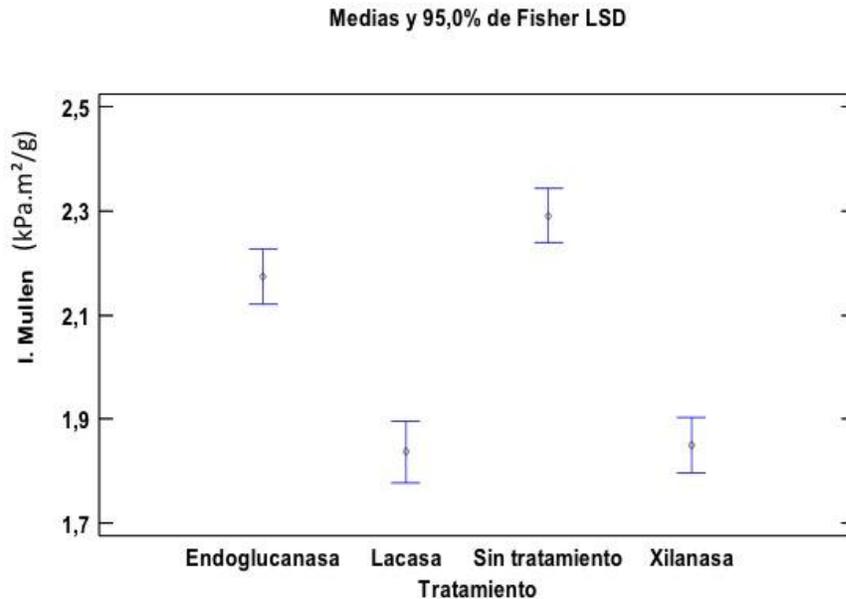


Figura 30. Gráfico de las medias para índice Mullen por tratamiento.

Este gráfico muestra las diferentes estadísticas del índice Mullen (resistencia al estallido) para cada uno de los cuatro tratamientos. El comportamiento del índice Mullen está relacionado con el comportamiento de la longitud de ruptura. En este caso, la lacasa y la xilanasa tienen una reducción de la propiedad de estallido similar a la reducción que sufren con la longitud de ruptura; y la endoglucanasa se mantiene cerca del valor de la pulpa sin tratamiento. Los valores del índice Mullen son más bajos, y una leve diferencia se ve reflejada en el análisis estadístico, ya que la longitud de ruptura de la endoglucanasa consigue subir levemente y que en ésta esté ligeramente por debajo.

6. CONCLUSIONES

- Se realizó la caracterización química del bagazo desmedulado obteniendo un valor para: cenizas totales 1.84%, extraíbles orgánicos 11.9%, extraíbles acuosos 15.9% y lignina Klason 17.1%. Las actividades enzimáticas obtenidas fueron de 28UI/ g para la lacasa y de 13.5UI/ g para la xilanasas.
- Los rangos seleccionados para las dosis y los tiempos están dentro de los valores de la literatura, la complejidad y el tamaño de la selección se determina de acuerdo a la cantidad de experimentos que se quiera realizar. Las dosis y tiempos del biopulpeo halladas mediante el análisis gráfico de los datos para lacasa son: 15UI/g por 240 minutos; para xilanasas: 5 UI/g por 60 min; y para endoglucanasa: 84UI/g por 30 minutos.
- El biopulpeo de la fibra con las enzimas xilanasas y lacasa consigue un aumento de los rendimientos del pulpeo químico en un 8.08% y 3.86% respectivamente aplicando las mismas condiciones de tiempo, temperatura y agentes químicos respecto al de la fibra sin tratamiento o control.
- Se realizó una evaluación de las propiedades papeleras obteniendo mayor rendimiento para la xilanasas (89.58%), una mayor longitud de ruptura para endoglucanasa (5839 metros) y un menor grado Schopper (21.5°); esta enzima, endoglucanasa, consigue con el biopulpeo aumentar el rendimiento respecto a la cocción sin tratamiento en un 6.08% y además mantener las propiedades físicas y mecánicas de la pulpa.
- La acción de las enzimas comerciales en el proceso de biopulpeo es apropiado ya que al verse la mejora en las propiedades papeleras, esto traduce que el biopulpeo hace más asequibles los reactivos químicos a la hora de la cocción, que representa un ahorro en tiempo y reactivos a la hora de realizar el pulpeo químico.

7. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

- Se propone para futuros trabajos realizar biopulpeos ampliando los rangos de tiempos y dosis, además probando la acción de otras casas comerciales en cuanto a las enzimas, lo que conlleva a un estudio más amplio que el que se requería en esta investigación a nivel de maestría.
- El tratamiento con enzimas podría mejorarse con tratamientos posteriores como refinado mecánico, la aplicación de CNF o un biorefinado con enzimas. La reducción de las propiedades fisicoquímicas no implica que la pulpa pierda utilidad, siendo necesario ampliar el estudio tanto en los tratamientos enzimáticos como las condiciones del pulpeo.

8. REFERENCIAS

- Agudelo, J. E., Merchán, Z. T. D., Zapata, N. J. G., & Muñoz, O. Y. M. (2013). Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 108–117.
- Aguilar-Rivera, N. (2011). Efecto del almacenamiento de bagazo de caña en las propiedades físicas de celulosa grado papel. *Ingeniería, Investigación Y Tecnología*, 12(2), 189–197.
- Akhtar, M., Attridge, M. C., Koning, J. W., Jr, & Kirk, T. K. (1995, October 24). Method of pulping wood chips with a fungi using sulfite salt-treated wood chips. Retrieved from <http://www.google.com/patents/US5460697>
- Aliaga Casceres, I. (2015). El Uso del Tiempo Aplicación de los Datos Composicionales Asimétricos. *Revista Varianza*, 1.
- Alonso, D. M., Bond, J. Q., & Dumesic, J. A. (2010). Catalytic conversion of biomass to biofuels. *Green Chemistry*, 12(9), 1493–1513. <http://doi.org/10.1039/C004654J>
- ÂNGELO, A. (2004). Enzimas hidrolíticas. *Fungos: Uma Introdução à Biologia, Bioquímica E Biotecnologia*, 263–285.
- ASOCAÑA. (2011). *Cogeneración: Ejemplo de energía alternativa, amigable y sostenible*. ASOCAÑA. Asociación de Cultivadores de Caña de Azúcar de Colombia. Retrieved from <http://www.eldulcesabordelprogreso.com/home/contentDetail/idCntnt/74>
- ASOCAÑA. (2014). *Informe del Sector Azucarero 2013-2014*.
- ASPAPEL. (2010). El papel, cómo se hace. Retrieved from <http://www.aspapel.es/el-papel/como-se-hace>

- Atik, C., Imamoglu, S., & Bermek, H. (2006). Impact of xylanase pre-treatment on peroxide bleaching stage of biokraft pulp. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58(1), 22–26. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.04.003>
- Banco Mundial. (1991). Lineamientos para la Evaluación Ambiental en Proyectos Energéticos e Industriales. Departamento de Medio Ambiente.
- Barreto, S. (2008). *Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto Grifola Frondosa*. Universidad Nacional de Colombia.
- Bastawde, K. B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(4), 353–368. <http://doi.org/10.1007/BF01198746>
- Battan, B., Sharma, J., Dhiman, S. S., & Kuhad, R. C. (2007). Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6–7), 733–739. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.06.006>
- Bégum, P., & Lemaire, M. (1996). The Cellulosome: An Exocellular, Multiprotein Complex Specialized in Cellulose Degradation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 31(3), 201–236. <http://doi.org/10.3109/10409239609106584>
- Bendl, R. F., Kandel, J. M., Amodeo, K. D., Ryder, A. M., & Woolridge, E. M. (2008). Characterization of the oxidative inactivation of xylanase by laccase and a redox mediator. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 149–156. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.010>
- Biermann, C. J. (1996). *Handbook of Pulping and Papermaking*. Academic Press.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Freiermuth, B., Bodie, E., & Borneman, S.

(1997). Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4627–4632.

Bourbonnais, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P., & Yaguchi, M. (1995). Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1876–1880.

BOURBONNAUS, R. (1996). Enzymatic Delignification of Kraft Pulp Using Laccase and a Mediator. *TAPPI J.*, 79, 199–204.

Carbajo García, J. M., & Carbajo García, J. M. (2015, August 5). *Utilización de hongos de podredumbre blanca en la producción de pasta de celulosa de alto rendimiento* (info:eu-repo/semantics/doctoralThesis). Universidad Complutense de Madrid, Madrid. Retrieved from <http://eprints.ucm.es/32794/>

Cárdenas, E., & Guadalupe, E. (2012, November 7). *Estudio de la generación de extractos enzimáticos con actividad celulolítica y ligninolítica, obtenidos durante la producción de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896 en rastrojo de maíz* (Thesis). QUITO/EPN/2012. Retrieved from <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/5157>

Chauhan, S., Choudhury, B., Singh, S. N., & Ghosh, P. (2006). Application of xylanase enzyme of *Bacillus coagulans* as a prebleaching agent on non-woody pulps. *Process Biochemistry*, 41(1), 226–231. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.06.003>

Chen, Y., Wan, J., Ma, Y., Tang, B., Han, W., & Ragauskas, A. J. (2012). Modification of old corrugated container pulp with laccase and laccase–mediator system. *Bioresource Technology*, 110, 297–301. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.120>

Cohen, R., Persky, L., & Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and

potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5), 582–594. <http://doi.org/10.1007/s00253-002-0930-y>

García Hortal, J. (1993). *Constituyentes fibrosos de pastas y papeles: morfología, análisis microscópico*. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=128605>

Corral, O. L., & Villaseñor-Ortega, F. (2006). Xylanases. <http://doi.org/81-7736-269-0>

Coughlan, M. P., & Ljungdahl, L. G. (1998). Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. *FEMS Symposium-Federation of European Microbiological Societies*.

Crestini, C., & Argyropoulos, D. S. (1998). The early oxidative biodegradation steps of residual kraft lignin models with laccase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6(11), 2161–2169. [http://doi.org/10.1016/S0968-0896\(98\)00173-4](http://doi.org/10.1016/S0968-0896(98)00173-4)

Eggert, C., Temp, U., & Eriksson, K. E. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1151–1158.

Eggert, C., Temp, U., & Eriksson, K.-E. L. (1997). Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS Letters*, 407(1), 89–92. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00301-3](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00301-3)

Egozcue, J. J., & Pawlowsky-Glahn, V. (2011). Análisis composicional de datos en Ciencias Geoambientales. Retrieved from <http://dugi-doc.udg.edu//handle/10256/8992>

Egozcue, Juan José, & Tolosana-Delgado, Raimon. (2011). Codapack 2.0: stand-alone, multiplatform compositional software.

Ek, M., Gellerstedt, G., & Henriksson, G. (2009). *Volume 1 Wood Chemistry and Wood Biotechnology*. Berlin, Boston: De Gruyter. Retrieved from <http://www.degruyter.com/view/product/40488>

Eriksson, K.-E. L., Blanchette, R., & Ander, P. (2012). *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*. Springer Science & Business Media.

Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar | Daza Merchan | Revista Colombiana de Biotecnología. (n.d.). Retrieved August 3, 2015, from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/30844/41968>

Farrell, R. L., & Skerker, P. S. (1991). Chlorine-free bleaching with cartazyme HS treatment. *Progress in Biotechnology*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301767585>

Fengel, D. (1971). Ideas on the ultrastructural organization of the cell wall components. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia*, 36(1), 383–392. <http://doi.org/10.1002/polc.5070360127>

Ferraz, A., Guerra, A., Souza-Cruz, P. B., & Mendonça, R. (2002). Attempts to correlate biopulping benefits with changes in the chemical structure of wood components and enzymes produced during the wood biotreatment with *Ceriporiopsis subvermispora*. In L. V. and R. Lantto (Ed.), *Progress in Biotechnology* (Vol. 21, pp. 73–80). Elsevier. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921042302800090>

Fortina, M. G., Acquati, A., Rossi, P., Manachini, P. L., & Gennaro, C. D. (1996). Production of laccase by *Botrytis cinerea* and fermentation studies with strain F226. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(2), 69–72. <http://doi.org/10.1007/BF01570044>

Gardiol A.E., Hernandez R.J., & Harte B.R. (1998). Device for detecting oxygen with oxidase.

Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M.-L., & Bally, R.

(1993). Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters*, *108*(2), 205–210. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06100.x>

González, I., Vilaseca, F., Alcalá, M., Pèlach, M. A., Boufi, S., & Mutjé, P. (2013a). Effect of the combination of biobeating and NFC on the physico-mechanical properties of paper. *Cellulose*, *20*(3), 1425–1435. <http://doi.org/10.1007/s10570-013-9927-1>

González, I., Vilaseca, F., Alcalá, M., Pèlach, M. A., Boufi, S., & Mutjé, P. (2013b). Effect of the combination of biobeating and NFC on the physico-mechanical properties of paper. *Cellulose*, *20*(3), 1425–1435. <http://doi.org/10.1007/s10570-013-9927-1>

Grant, J. (1996). *A laboratory handbook of pulp and paper manufacture* (México Cotinental).

Gutiérrez Suárez, A., & Martínez, Á. T. (1996). Mecanismos de biodegradación de la lignina. Retrieved from <http://digital.csic.es/handle/10261/71580>

Howard, R. C. (1990). The effects of recycling on paper quality. *Journal of Pulp and Paper Science*, *16*(5), J143–J149.

Hullo, M.-F., Moszer, I., Danchin, A., & Martin-Verstraete, I. (2001). CotA of *Bacillus subtilis* Is a Copper-Dependent Laccase. *Journal of Bacteriology*, *183*(18), 5426–5430. <http://doi.org/10.1128/JB.183.18.5426-5430.2001>

Johansson, L.-S. (2002). Monitoring Fibre Surfaces with XPS in Papermaking Processes. *Microchimica Acta*, *138*(3-4), 217–223. <http://doi.org/10.1007/s006040200025>

Kandelbauer, A., Maute, O., Kessler, R. W., Erlacher, A., & Gübitz, G. M. (2004). Study of dye decolorization in an immobilized laccase enzyme-reactor using online spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, *87*(4), 552–

563. <http://doi.org/10.1002/bit.20162>

LaFayette, P. R., Eriksson, K.-E. L., & Dean, J. F. D. (1999). Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*). *Plant Molecular Biology*, 40(1), 23–35. <http://doi.org/10.1023/A:1026437406859>

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N.-S., ... Rogalski, J. (1999). Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 27(2–3), 175–185. <http://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1150>

Loera Corral, O., & Villaseñor-Ortega, F. (2006). Xylanases., 305–322.

Majcherczyk, A., Johannes, C., & Hüttermann, A. (1998). Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) by Laccase of *Trametes Versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(5), 335–341. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00199-3](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00199-3)

Mansur, M., Suárez, T., Fernández-Larrea, J. B., Brizuela, M. A., & González, A. E. (1997). Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2637–2646.

Marques, G. (2010). Valorización de productos agroforestales para la fabricación de pasta de papel: Caracterización química y modificación estructural de sus constituyentes orgánicos durante los procesos de cocción y blanqueo y aplicaciones biotecnológicas. Retrieved from <http://digital.csic.es/handle/10261/66248>

Martín-Sampedro, R., Eugenio, M. E., & Villar, J. C. (2012). Effect of steam explosion and enzymatic pre-treatments on pulping and bleaching of *Hesperaloe funifera*. *Bioresource Technology*, 111, 460–467. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.024>

Matias. (2005, December 28). Producción de pasta termomecánica [Text].

Retrieved December 18, 2015, from
<http://www.textoscientificos.com/papel/pulpa/pasta-termomecanica>

Moore, D. (1998). Tolerance of imprecision in fungal morphogenesis. *Proceedings of the Fourth Meeting on the Genetics and Cellular Biology of Basidiomycetes*, 13–19.

Mougin, C., Kollmann, A., & Jolival, C. (2002). Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnology Letters*, 24(2), 139–142.
<http://doi.org/10.1023/A:1013802713266>

(OPA), U. O. of P. A. (2015). United States Patent and Trademark Office. Retrieved December 26, 2015, from <http://www.uspto.gov/>

Ortiz Rivera, A. L. (2009). *Tratamiento por acidificación controlada del licor negro derivado del bagazo de caña para la recuperación de lignina y reducción de la demanda química de oxígeno (DQO)* (Thesis). Universidad Tecnológica de Pereira. Retrieved from <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/handle/11059/1462>

Oudia, A., Mészáros, E., Simões, R., Queiroz, J., & Jakab, E. (2007). Pyrolysis-GC/MS and TG/MS study of mediated laccase biodelignification of *Eucalyptus globulus* kraft pulp. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 78(2), 233–242. <http://doi.org/10.1016/j.jaap.2006.07.003>

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., & Sannia, G. (2000). Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 920–924. <http://doi.org/10.1128/AEM.66.3.920-924.2000>

Parajó, J. C., Domínguez, H., & Domínguez, J. (1998). Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*, 65(3), 191–201. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00038-8](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00038-8)

Pawlosky, Vera, Egozcue, Juan José, & Tolosana-Delgado, Raimon. (2015). *Modeling and Analysis of Compositional Data* (Wiley).

Pellerin, P., Gosselin, M., Lepoutre, J.-P., Samain, E., & Debeire, P. (1991). Enzymic production of oligosaccharides from corncob xylan. *Enzyme and Microbial Technology*, 13(8), 617–621. [http://doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90074-K](http://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90074-K)

Pérez, N. A., Delgado, L. A., & González, J. C. (2011). ESTUDIO TERMODINÁMICO DEL PROCESO DE ADSORCIÓN DE IONES DE Ni Y V POR PARTE DE LIGNINAS PRECIPITADAS DEL LICOR NEGRO KRAFT (THERMODYNAMIC EVALUATION OF THE Ni AND V ADSORPTION PROCESS BY PRECIPITATED LIGNINS FROM KRAFT BLACK LIQUOR). *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 0(0), 168–181.

Pinzón, L.M. (2012). *Biplot consenso para análisis de tablas múltiples*. Ediciones Universidad de Salamanca.

P. O. L. E. F. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae*, 13 (2), 61–67.

Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577–591. <http://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>

Portocarrero, E. (2002). *Manual de producción de caña de azúcar (Saccharum officinarum L.)*. Universidad de Zamorano.

Pulp Watch. (2014). *Empresas papeleras*. Retrieved from <http://pw.environmentalpaper.org/>

Raghukumar, C. (2000). Fungi from marine habitats: an application in bioremediation. *Mycological Research*, 104(10), 1222–1226. <http://doi.org/null>

Rama, R., Mougin, C., Boyer, F.-D., Kollmann, A., Malosse, C., & Sigoillot, J.-

C. (1998). Biotransformation of bezo[a]pyrene in bench scale reactor using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Biotechnology Letters*, 20(12), 1101–1104. <http://doi.org/10.1023/A:1005387016390>

Ramos, J., González, M., Ramírez, F., Young, R., & Zúñiga, V. (2001). Biomechanical and biochemical pulping of sugarcane bagasse with *Ceriporiopsis subvermispora* fungal and xylanase pretreatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1180–1186.

Reyes, P., Pickard, M. A., & Vazquez-Duhalt, R. (1999). Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. *Biotechnology Letters*, 21(10), 875–880. <http://doi.org/10.1023/A:1005502906890>

Rico Campos, A. (2010). Tratamientos enzimáticos con lacasas y mediadores naturales para la eliminación de lignina y lípidos presentes en pastas de celulosa. Retrieved from <http://digital.csic.es/handle/10261/66258>

Robles, J. (2012). *ESTUDIO DE FACTIBILIDAD PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE UN DEPÓSITO INDUSTRIAL, ORIENTADO A LA ELABORACIÓN DE PAPEL KRAFT Y SUS DERIVADOS EN LA CIUDAD DE MACHALA* (Tesis Doctoral).

Rowell, R. (1984). *The chemistry of solid wood.*, x + 614pp.

Saad, M. B. W., Oliveira, L. R. M., Cândido, R. G., Quintana, G., Rocha, G. J. M., & Gonçalves, A. R. (2008). Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 220–225. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.03.006>

Sanadi, A. R., Caulfield, D. F., Jacobson, R. E., & Rowell, R. M. (1995). Renewable Agricultural Fibers as Reinforcing Fillers in Plastics: Mechanical Properties of Kenaf Fiber-Polypropylene Composites. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 34(5), 1889–1896. <http://doi.org/10.1021/ie00044a041>

- Sandas, E., & Lönnberg, B. (1990). Effects of pulpstone grits in wood grinding. II: Two-size grit mixture (various proportions). *Paperi Ja Puu*, 72(8), 765–771.
- Sanjuán, R., Anzaldo, J., Vargas, J., Turrado, J., & Patt, R. (2001). Morphological and Chemical Composition of Pith and Fibers from Mexican Sugarcane Bagasse. *Holz Als Roh- Und Werkstoff*, 59(6), 447–450. <http://doi.org/10.1007/s001070100236>
- Satyanarayana, T., Johri, B. N., & Prakash, A. (2012). *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*. Springer Science & Business Media.
- Skorobogat'ko, O. V, Stepanova, E. V, Gavrilova, V. P., & Yaropolov, A. I. (1996). Effects of inducers on the synthesis of extracellular laccase by *Coriolus hirsutus*, a basidial fungus. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 35(5), 473–476.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., & Machonkin, T. E. (1996). Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews*, 96(7), 2563–2606. <http://doi.org/10.1021/cr950046o>
- Soltanali, S., & Ziaie-Shirkolaei, Y. (2007). Biobleaching of Bagasse Pulp with Xylanase Enzymes and Hydrogen Peroxide. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(3), 170–177.
- Stryer, L. (1998). *Bioquímica*. Universidad del Rosario.
- Sunna, A., & Antranikian, G. (1997). Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(1), 39–67. <http://doi.org/10.3109/07388559709146606>
- Suurnäkki, A., Oksanen, T., Orlandi, M., Zoia, L., Canevali, C., & Viikari, L. (2010). Factors affecting the activation of pulps with laccase. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(3–4), 153–158. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.11.009>

Urias, J. C. T. (1996). Determinación de los índices de calidad de pulpa para papel de 132 maderas latifoliadas.

Varela, M., Vicente-Villardón, J. L., & Blazquez, A. (2002). Los métodos biplot como herramienta de análisis de interacción de orden superior en un modelo lineal/bilineal. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CU2010400003>

Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., & Linko, M. (1994). Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(2–3), 335–350. <http://doi.org/http://dx.doi.org/>

Villar, J. (2008). Biotecnología aplicada a la fabricación de pulpa y papel. *Panorama de La Industria de La Celulosa*, 308–313.

Wang, W., Mozuch, M. D., Sabo, R. C., Kersten, P., Zhu, J. Y., & Jin, Y. (2014). Production of cellulose nanofibrils from bleached eucalyptus fibers by hyperthermostable endoglucanase treatment and subsequent microfluidization. *Cellulose*, 22(1), 351–361. <http://doi.org/10.1007/s10570-014-0465-2>

Wong, K. K., & Saddler, J. N. (1993). Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries. *Hemicellulose and Hemicellulases*, 4, 127–143.

Wong, Y., & Yu, J. (1999). Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research*, 33(16), 3512–3520. [http://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00066-4](http://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00066-4)

ZANUTTINI, M. (2006). PULPADO DE MUY ALTO RENDIMIENTO.

Zhao, J., Li, X., Qu, Y., & Gao, P. (2002). Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(6), 734–740. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00050-9](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00050-9)