



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Degradación enzimática de polímeros adhesivos presentes en el agua de proceso de la industria del cartón reciclado

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Maestro en Ciencias

Presenta:

I.Q. Edwin Gerardo Reyes Guzmán

Dirigido por:

Dr. Aldo Amaro Reyes

Co-director:

Dr. José Salazar Martínez

Dr. Aldo Amaro Reyes

Presidente

Dr. José Salazar Martínez

Secretario

Dr. Víctor Pérez Moreno

Asesor

Dr. Jorge Gracida Rodríguez

Asesor

Dr. José Alberto Rodríguez Morales

Asesor

Centro Universitario, Querétaro, Querétaro
Diciembre de 2019
México

RESUMEN

Dentro de la industria del cartón reciclado, el agua de proceso es la que transporta los principales contaminantes que alteran su manufactura, así como la calidad del producto final. Las principales sustancias que contaminan el agua de proceso son ceras, aceites, tintas, cargas minerales y los que más impactan son los polímeros adhesivos, técnicamente llamados stickies en esta industria. Los stickies se caracterizan por ser cúmulos negros con forma amorfa los cuales están generalmente compuestos por poli vinil acetato, poliuretano, almidón, lignina y restos de celulosa. Los tratamientos químicos convencionales, además de que son costosos, generan residuos tóxicos; el uso de enzimas producidas a partir de fermentación en estado sólido son una alternativa para degradar a los stickies. Es por eso que en este trabajo se evaluaron 2 extractos enzimáticos crudos producidos por *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* a partir de pasta de cartón reciclado para comprobar si estos son una alternativa. Los extractos producidos se evaluaron en agua de proceso de la industria recicladora de cartón, obteniendo valor máximo de remoción de stickies del 10.6 %. Para la remoción eficiente de de stickies es necesario mejorar la actividad de lipasa y esterasa en los extractos enzimáticos. Sin embargo, los valores de actividad obtenidos de xilanasas, celulasas y amilasas, se puede decir que estos extractos pueden aplicarse para agilizar el tiempo de desfibrado.

Palabras Clave: Hidrolasas, reciclaje de papel, mezclas de enzimas, stickies.

ABSTRACT

The process water that participate in the manufacture of the recycled paper it's commonly full of pollutants that causes technical failures and makes the quality of the final product decline. The principal substances that affect the recycling paperboard are oils, inks, waxes and adhesive polymers (technically known as stickies). The stickies are black cumulus commonly composed by poly vinyl acetate, polyurethane, starch and hemicelluloses. Conventional chemical treatments are expensive, also they produce toxic residues. In recent years, the use of enzymatic extracts produced by solid state fermentation are an alternative for sticky degradation, and they can be produced using filamentous fungi and bacteria. This study examines the sticky degradation and the activity of hydrolytic enzymes of an enzymatic extract produced by *T. reesei* and *A. niger* when the substrate it's recycled paperboard pulp at various conditions of temperature and pH. The activities studied for each fungus were esterases, lipases, amylases, cellulases, and xylanases; also, the extracts were evaluated in process water of a paperboard recycler. The results shown that the enzyme extracts produced by *T. reesei* and *A. niger* had high amylase, xylanase and cellulase activity, but low lipase and esterase activity, showing a maximum sticky removal of 10.6 %. These enzymatic extracts can be used as catalyzers to defiber the cellulose in the recycling paperboard process, but not as sticky removal agents.

Keywords: Hydrolases, paper recycling, enzymatic mixture, stickies.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis fue realizado gracias al esfuerzo de mi familia, en especial al de mi padre y mi madre, Juan Carlos Reyes Manrique y Adela Guzmán Romo. También, este proyecto se atribuye directamente al apoyo de Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, en especial a los doctores Aldo Amaro Reyes, Miguel Ángel Ramos López, Jorge Gracida Rodríguez, José Alberto Rodríguez Morales, Miguel Ángel Rico Rodríguez y Ramiro Pacheco Aguilar. Así mismo, se agradece el apoyo de la empresa Citriczyme S.A. de C.V. por brindar las muestras necesarias para los experimentos y datos clave de la industria del cartón reciclado. Gracias, sin ustedes hubiera podido lograr esta difícil meta.

ÍNDICE

Tópico	Página
1. Introducción	14
2. Marco teórico	15
2.1 Proceso general del reciclado de cartón	15
2.1.1 Ciclo del agua dentro del proceso de reciclado de cartón	16
2.1.2 Efectos de la mala calidad del agua en el proceso de reciclado de cartón	17
2.1.3 Tratamiento de agua de proceso	18
2.2 Las enzimas	21
2.2.1 Las enzimas hidrolíticas	21
2.2.2 Uso de las enzimas en las industrias de reciclado de carón	22
2.2.2.1 Esterasas	22
2.2.2.2 Lipasas	23
2.2.2.3 Xilanasas	24
2.2.2.4 Amilasas	25
2.2.2.5 Celulasas	27
2.3 <i>Trichoderma reesei</i> y <i>Aspergillus niger</i>	29
3. Justificación	30
4. Hipótesis	31
5. Objetivos	32
6. Metodología	33
6.1 Obtención de un extracto enzimático a partir de <i>Trichoderma reesei</i> y <i>Aspergillus niger</i>	33
6.2 Caracterización de los extractos enzimáticos en función del pH y temperatura	33

6.2.1 Método de cuantificación de contenido de proteína por el reactivo Biuret	33
6.2.2 Método p-nitrofenol	34
6.2.3 Método DNS	35
6.3 Mezclas de extractos enzimáticos crudos	38
6.4 Aplicación de los extractos al agua de proceso	38
6.5 Análisis estadístico	39
7. Resultados	40
7.1 Obtención del complejo enzimático a partir de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	40
7.2 Cálculo del contenido de proteína soluble y de las actividades enzimáticas de los extractos	42
7.3 Determinación de la mezcla óptima de los extractos	59
8. Conclusiones y perspectivas	81
9. Bibliografía	82

ÍNDICE DE TABLAS

Nombre	Página
Tabla 1. Lote de soluciones preparadas para el análisis de contenido de proteína de los extractos por el método Biuret.	34
Tabla 2. Soluciones que se prepararon para obtener la curva estándar del p-nitrofenol.	35
Tabla 3. Soluciones preparadas para medir actividad de los extractos para lipasa y esterasa.	36
Tabla 4. Lote de soluciones preparadas para la obtención de la curva estándar de la glucosa.	36
Tabla 5. Lote de soluciones para medir la actividad enzimática de amilasa, celulasa y xilanasas.	37
Tabla 6. Sustrato para cada actividad enzimática a evaluar.	37
Tabla 7. Valores obtenidos para la elaboración de la curva estándar de BSA.	42
Tabla 8. Contenido de proteína calculado para cada extracto crudo producido.	43
Tabla 9. Valores para obtener la curva de calibración de p-nitrofenol.	43
Tabla 10. Valores para obtener la curva de calibración de la glucosa.	44
Tabla 11. Resultados de la evaluación de actividad enzimática (dosis 100 μ L) reportada en unidad enzimática por miligramo de proteína del extracto y ND muestra una concentración no detectable.	45

Tabla 12. Evaluación de la actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de lipasa/esterasa a diferentes valores de pH.	48
Tabla 13. Evaluación de la actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de lipasa/esterasa a diferentes valores de temperatura.	49
Tabla 14. Evaluación de actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de amilasa a diferentes valores de pH.	50
Tabla 15. Evaluación de la actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de amilasa a diferentes valores de temperatura.	51
Tabla 16. Evaluación de actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de xilanasas a diferentes valores de pH.	52
Tabla 17. Evaluación de la actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de xilanasas a diferentes valores de temperatura.	53
Tabla 18. Evaluación de la actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de celulasa a diferentes valores de pH.	54
Tabla 19. Evaluación de la actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de celulasa a diferentes valores de temperatura.	55
Tabla 20. Condiciones de reacción en donde se obtuvieron los resultados máximos de actividad del extracto crudo de <i>T. reesei</i> .	56
Tabla 21. Condiciones de reacción en donde se obtuvieron los resultados máximos de actividad del extracto crudo de <i>A. niger</i> .	56
Tabla 22. Resultados de la simulación en MiniTab para obtener la mezcla óptima de extractos.	59
Tabla 23. Formulaciones de las mezclas de extractos enzimáticos evaluadas.	64

Tabla 24. Evaluación de actividad de mezclas de extractos de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> para lipasa/esterasa a las condiciones establecidas.	65
Tabla 25. Evaluación de actividad de mezclas de extractos de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> para amilasa a las condiciones establecidas.	67
Tabla 26. Evaluación de actividad de mezclas de extractos de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> para xilanasa a las condiciones establecidas.	68
Tabla 27. Evaluación de actividad de mezclas de extractos de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> para celulasa a las condiciones establecidas.	70
Tabla 28. Resultados de actividad máxima de las mezclas de extractos de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> a un pH de 7 a 35 °C.	71
Tabla 29. Resultados de actividad máxima de las mezclas de extractos de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> a un pH de 7 a 45 °C.	72
Tabla 30. Resultados de la aplicación de los extractos y su efecto en la remoción de stickies.	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Nombre	Página
Figura 1. Diagrama general del proceso de reciclado de cartón.	15
Figura 2. Diagrama general del ciclo del agua que tiene dentro de la industria de cartón reciclado.	16
Figura 3A y 3B. Estado común de la materia prima: Cartón empacado.	18
Figura 4. Imágenes de muestras de agua de una recicladora de cartón en el microscopio a una resolución 10x. A. Muestra tomada del hidrapulper; B. Muestra tomada antes del primer tanque de almacenamiento. Los stickies, ceras, tintas y cargas minerales son los principales contaminantes del cartón reciclado.	19
Figura 5. Cúmulos de polímeros adhesivos o stickies. A: sticky acumulado en el proceso de secado. B: stickies incrustados en la pasta de cartón (algunos se muestran en los círculos rojos).	20
Figura 6. Mecanismo general de acción de las esterasas. Un éster de cadena grande se hidroliza y producir alcoholes, ácidos y ésteres de menor cadena.	22
Figura 7. Mecanismo general de acción de las lipasas. Un triglicérido se hidroliza para producir glicerol y un ácido graso.	23
Figura 8. Mecanismo general de acción de las xilanasas. El xilano, por varias etapas se hidroliza para producir xilooligosacáridos y xilosa.	24
Figura 9. Mecanismo general de acción de las amilasas. El almidón se hidroliza en dextrina, maltosa y unidades de glucosa.	26

Figura 10. Mecanismo general de acción de las celulasas. El almidón se hidroliza en glucosa y ácidos glucónicos. A: Mecanismo de retención. B: Mecanismo de inversión. Ambos mecanismos actúan para la degradación completa de la celulosa (Obeng et al., 2016).	28
Figura 11. A: <i>Trichoderma reesei</i> . B: <i>Aspergillus niger</i> . Ambos suelen encontrarse en material vegetal en descomposición. La obtención del carbono requerido para su metabolismo lo realizan a partir de la producción de las enzimas hidrolíticas.	29
Figura 12. Matraces Erlenmeyer en donde se llevó a cabo la producción de los complejos enzimáticos. A: pasta de cartón sin inóculo. B: pasta de cartón con inóculo de <i>Trichoderma reesei</i> . C: pasta de cartón con inóculo de <i>Aspergillus niger</i> .	40
Figura 13. Extractos enzimáticos crudos obtenidos a partir de pasta de cartón reciclado utilizando fermentación en estado sólido. A: Extracto crudo de <i>T. reesei</i> . B: Extracto crudo de <i>A. niger</i> .	41
Figura 14. Curva estándar utilizada para calcular el contenido de proteína soluble.	42
Figura 15. Curva estándar obtenida para el p-nitrofenol.	44
Figura 16. Curva estándar obtenida para la glucosa.	45
Figura 17. Comparación de la actividad enzimática relativa de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de lipasa/esterasa a diferentes valores de pH.	48
Figura 18. Comparación de la actividad enzimática relativa de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de lipasa/esterasa a diferentes valores de temperatura.	49

Figura 19. Comparación de la actividad enzimática relativa de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de amilasa a diferentes valores de pH.	50
Figura 20. Comparación de la actividad enzimática relativa de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de amilasa a diferentes valores de temperatura.	51
Figura 21. Comparación de la actividad enzimática relativa de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de xilanasa a diferentes valores de pH.	52
Figura 22. Comparación de la actividad enzimática relativa de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de xilanasa a diferentes valores de temperatura.	53
Figura 23. Comparación de la actividad enzimática relativa de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de celulasa a diferentes valores de pH.	54
Figura 24. Comparación de la actividad enzimática relativa de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de celulasa a diferentes valores de temperatura.	55
Figura 25. Gráficos de optimización trazados por el simulador.	63
Figura 26. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de lipasa/esterasa a 35 °C a un pH 7.	66
Figura 27. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de lipasa/esterasa a 45 °C a un pH 7.	66
Figura 28. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de amilasa a 35 °C a un pH 7.	67
Figura 29. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de amilasa a 45 °C a un pH 7.	68

Figura 30. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de xilanasa a 35 °C a un pH 7.	69
Figura 31. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de xilanasa a 45 °C a un pH 7.	69
Figura 32. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de celulasa a 35 °C a un pH 7.	70
Figura 33. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> de celulasa a 45 °C a un pH 7.	70
Figuras 34. Tratamiento de 24 horas. A: Imagen del agua antes del tratamiento. B: imagen del agua después del tratamiento.	76
Figuras 35. Tratamiento de 2 horas. A: Imagen del agua antes del tratamiento. B: imagen del agua después del tratamiento.	77
Figuras 36. Tratamiento de 5 horas. A: Imagen del agua antes del tratamiento. B: imagen del agua después del tratamiento.	78
Figuras 37. Tratamiento de 7 horas. A: Imagen del agua antes del tratamiento. B: imagen del agua después del tratamiento.	79
Figuras 38. Tratamiento de 5 horas. A: Imagen del agua antes del tratamiento. B: imagen del agua después del tratamiento.	80

1. INTRODUCCIÓN

México en la actualidad, es el sexto productor de papel reciclado en el mundo, de hecho, el 86 % de las necesidades de fibras de celulosa se obtienen del proceso de reciclaje. Además, el reciclaje de celulosa trae consigo efectos positivos en el medio ambiente, este tiene menor costo de producción que el procesamiento de la celulosa virgen, se ahorra agua y energía (Domínguez et al., 2017).

Las condiciones del agua de proceso dentro de la producción del papel es un factor muy influyente en la calidad del producto final, es el medio principal de transporte y formación de las fibras, pero ésta siempre está contaminada. Los contaminantes principales son a causa del origen de la materia prima, y los principales suelen ser adhesivos, ceras, aceites, tintas, cargas minerales, plásticos, así como materia orgánica. Dentro de estos contaminantes, los que más causan problemas dentro de la producción del papel reciclado son los polímeros adhesivos, técnicamente conocidos como stickies. Estos generalmente están compuestos por acetato de polivinilo, hemicelulosa, poliuretano y almidón. Los principales problemas presentes debido a estos contaminantes son: fallas técnicas en el proceso, baja de la calidad del producto final, alto consumo de agua y energía además de que los costos de su depuración son altos. Los métodos convencionales para la depuración de estos polímeros adhesivos son tratamientos químicos y enzimáticos. Los tratamientos químicos tienen generan residuos tóxicos, mientras que el uso de enzimas purificadas también no es viable porque, así como los procedimientos químicos, tienen altos costos. La fermentación en estado sólido es una alternativa de producción de enzimas a bajo costo, ya que los extractos enzimáticos producidos pueden producir a las enzimas requeridas para degradar a los polímeros adhesivos. Es por eso que en este trabajo se describe el uso de extractos enzimáticos producidos a partir de pasta de cartón reciclado mediante fermentación en estado sólido utilizando *T. reesei* y *A. niger*. Lo anterior para proponer alternativas para la eliminación de los principales polímeros presentes en el agua de proceso de la industria del cartón reciclado.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Proceso general del reciclado de cartón

Del reciclado del cartón se obtiene papel de bajo y medio gramaje, el más común es el médium; este tipo de papel así se conoce porque su gramaje está por debajo de los 100 g/m². El proceso de reciclado de cartón es complejo, requiere múltiples operaciones unitarias en donde se consideran una gran variedad de parámetros. Las principales variables que afectan este proceso, así como el producto final son el estado de la materia prima, la presencia microbiana, el calor de secado, el desfibrado, la calidad y el consumo del agua. El proceso comienza alimentando al hidrapulper con la materia prima, esta corresponde a pacas de cartón que se obtienen de centros de recolección o de industrias. Un Hidrapulper, es un sistema mecánico el cual utiliza agua y unas grandes aspas para desfibrar a la materia prima, con el objeto de producir pasta de fibra. Durante el desfibrado hay procesos de purga que ayudan a eliminar sustancias ajenas como, por ejemplo, plásticos, envolturas, entre otros. Posteriormente, la pasta de fibra es impulsada por bombas hasta tanques de almacenamiento. En la Figura 1 muestra el diagrama de proceso común de reciclado de cartón.



Figura 1. Diagrama general del proceso de reciclado de cartón.

Seguido de los tanques de almacenamiento, la pasta ingresa a un equipo llamado mesa de formación, en donde previamente se adiciona almidón, cargas minerales (caolín, cenizas) y otros aditivos para formar una gran hoja. La hoja formada pasa por unos rodillos, en donde con vapor de agua, se logra secarla. Si la calidad del papel es buena, se pasa a almacenaje para su próxima entrega, si no, el producto se añade de nuevo al hidrapulper para su reprocesado. La pasta residual del proceso de formación de la hoja pasa a una laminadora, en donde se producen hojas gruesas de cartón las cuales son aprovechadas para recircular al proceso o para venderse.

2.1.1 Ciclo del agua dentro del proceso de reciclado del cartón

La formación de la hoja de papel está basada en la estructuración de la red fibrosa auxiliada con el agua de proceso para la formación de puentes de hidrógeno entre las fibras. Es por eso por lo que el agua juega un rol muy importante dentro de la formación de la hoja y su calidad se ve reflejada en el producto final (Saucedo et al., 2015). El agua de proceso se obtiene desde una fuente principal, esta puede ser un contenedor específico o un pozo. En la Figura 2 se muestra el diagrama general del ciclo del agua del proceso.

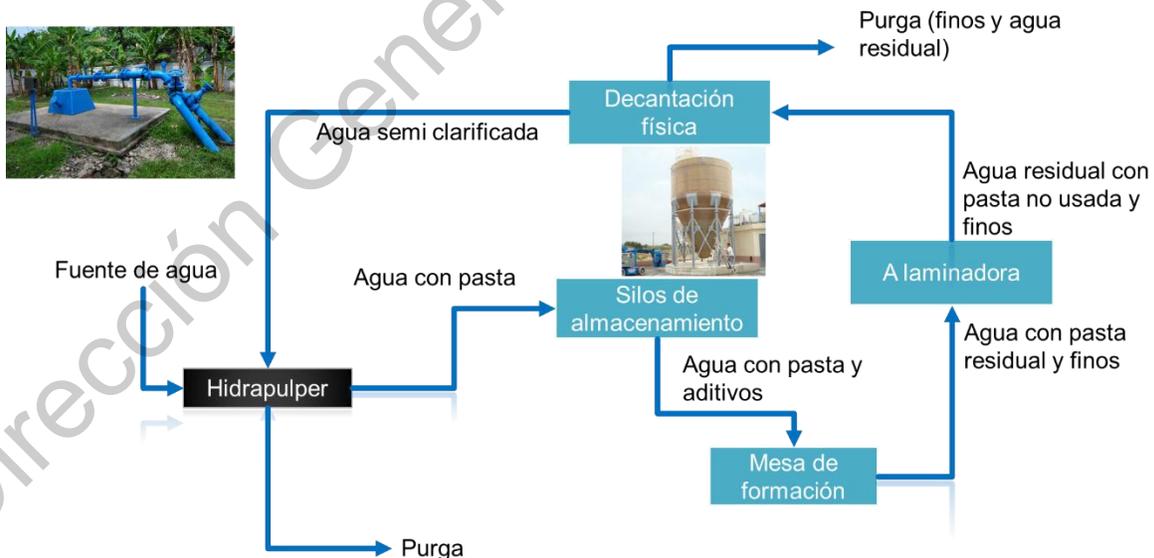


Figura 2. Diagrama general del ciclo del agua que tiene dentro de la industria de cartón reciclado.

Desde el hidrapulper comienza la contaminación del agua, esto es porque la materia prima porta una gran cantidad de contaminantes. En seguida, el agua con la pasta pasa a los tanques de almacenamiento, descargándose luego hacia la mesa de formación, en donde se le agregan aditivos que ayudan a la formación de la hoja. Después de la mesa de formación, el agua de proceso pasa a laminadora en donde participa en la manufactura de las hojas gruesas. El agua residual de la laminadora se expone a un proceso de separación fisicoquímico en el cual se busca clarificarla para que esta pueda volver a ser utilizada en el proceso.

2.1.2 Efectos de la mala calidad del agua en el proceso de reciclado de cartón

Para poder realizar un análisis de los contaminantes dentro del reciclado del cartón, vamos desde el origen: el estado de la materia prima. La calidad de la materia prima es un parámetro que influye directamente en la calidad del agua, también en la del producto final.

En la estructura del cartón hay tintas, pegamentos, polímeros, microorganismos entre otros sólidos de diferentes tamaños los cuales siempre ingresan al proceso. Las pacas de cartón también están expuestas al medio, lo que significa que están incrustadas de polvo y materia orgánica. Los contaminantes en el agua generan los mayores problemas en el proceso de formación de la hoja. Como se puede observar a continuación en las Figuras 3A y 3B, en el momento del empacado no solo va el cartón, si no que otra variedad de materiales, como plásticos y basura.

Los contaminantes sólidos pueden ser retirados en las purgas acompañado con tratamientos fisicoquímicos. Para el caso de los contaminantes coloidales y compuestos no solubles es más complicado, por el hecho de que también son transportados por las fibras del cartón. Los microorganismos se acumulan en biofilms durante todo el proceso, causando desgaste en tuberías, fallas en maquinarias y problemas en la formación de la hoja.



3A



3B

Figuras 3A y 3B. Estado común de la materia prima: Cartón empacado.

Mientras que los compuestos no solubles se quedan incrustados en el producto final e influyen directamente en el consumo de agua. La operación unitaria que realiza la mesa de formación es la parte más delicada del proceso, aquí se forma la hoja; adicionalmente define el producto final. El agua de proceso es fundamental para esta operación, por esa razón debe tener una calidad óptima y parámetros específicos. Si el agua que utilizan la mesa contiene aceites, polímeros, adhesivos o tintas, estas formarán parte de la estructura de la hoja del papel que se produce.

2.1.3 Tratamiento de agua de proceso

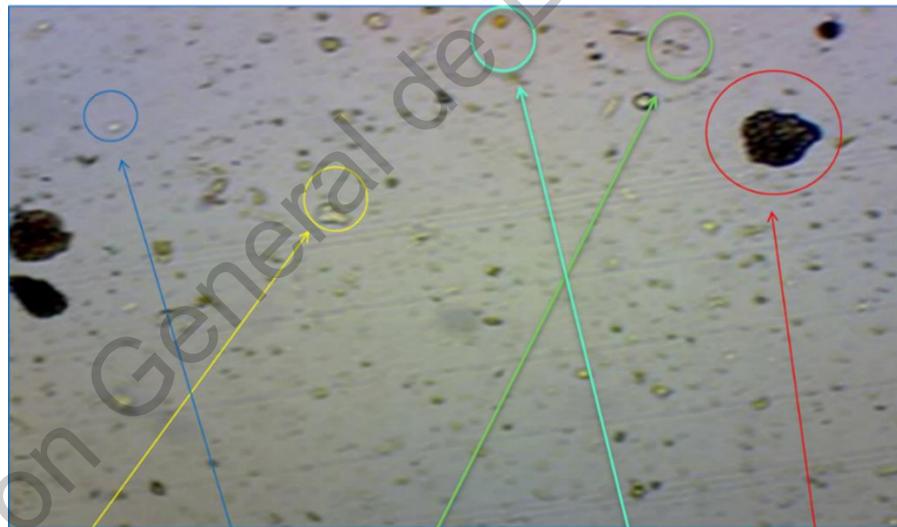
Para eliminar a los contaminantes presentes en el agua de proceso de las recicladoras de papel se utilizan solventes, radiación UV, componentes clorados y ozono. Estos productos son tóxicos, exigen una gran demanda de agua para su uso, no son efectivos, son costosos y pueden alterar la calidad del producto final (Virik et al., 2013; Kumar et al., 2014). El uso de dichos productos los tratamientos restringen el recirculado de agua dentro de la planta, aumenta la demanda química de oxígeno, daña los equipos involucrados y tienen efectos químicos secundarios en el papel. Otro de los mayores conflictos reside en que durante las purgas programadas, los residuales de estas sustancias son descargadas al drenaje o a los ecosistemas, causando impacto ambiental. Una de las alternativas para sustituir a los tratamientos convencionales son los tratamientos enzimáticos, en su aplicación requieren poca cantidad, son prácticos y no causan un impacto ambiental significativo (Saxena y Singh, 2015).

A



Fibra Cargas minerales Ceras Stickies Tintas

B



Ceras Aceites Cargas minerales Tintas Stickies

Figura 4. Imágenes de muestras de agua de una recicladora de cartón en el microscopio a una resolución 10x. A. Muestra tomada del hidrapulper; B. Muestra tomada antes del primer tanque de almacenamiento. Los stickies, ceras, tintas y cargas minerales son los principales contaminantes del cartón reciclado.

En la Figura 3 se muestran los principales contaminantes del agua de proceso, todos estos están presentes en la materia prima. Dentro de los que más destacan son los polímeros adhesivos, técnicamente llamados stickies, los cuales están compuestos principalmente por poli vinil acetato, poliuretano, almidón y hemicelulosa (Zhang et al., 2017). Estos se pueden notar fácilmente en el agua de proceso, así como en el producto final; a nivel microscópico y macroscópico se observan como cúmulos negros de forma amorfa con estructura rígida.

Los stickies presentan una electronegatividad característica, lo que hace que estos atraigan otras sustancias catiónicas y que su composición sea de diversa (Zhang et al., 2017). En la Figura 5 se muestran cómo se observan los stickies a nivel macroscópico en el producto final y en el proceso de secado.



Figura 5. Cúmulos de polímeros adhesivos o stickies. A: sticky acumulado en el proceso de secado. B: stickies incrustados en la pasta de cartón (algunos se muestran en los círculos rojos)

2.2 Las enzimas

Las enzimas son proteínas que catalizan diversas reacciones químicas las cuales proveen una excelente y económica conversión química gracias a su acción biocatalítica. Estas pueden iniciar una reacción química sin ser consumidas, también aumentan el rendimiento de reacción (John, 2017). Son componentes vitales de numerosos procesos industriales, algunos de estas industrias son las de celulosa, la alimentaria, las textiles y las farmacéuticas (Gurung et al., 2013). Desde 1950, se vio un importante desarrollo del uso de enzimas microbianas. En 1969, el 80 % de los detergentes comerciales para lavandería ya contenían enzimas, principalmente proteasas (Dihillon et al., 2016). En recientes décadas, las enzimas han atraído mucho la atención en aplicaciones industriales debido a su alto grado de actividad, a su capacidad de condicionar las reacciones químicas, a su bajo costo y por su selectividad específica (Metsämuuronen et al., 2013).

2.2.1 Las enzimas hidrolíticas

Las hidrolasas son enzimas que hidrolizan a los sustratos para romper o formar enlaces. Estas han demostrado abordar al sustrato específicamente; además son capaces de hidrolizar péptidos, halógenos, amidas, esterres y triglicéridos. Las principales fuentes de las hidrolasas son los microorganismos, tales como hongos y bacterias (Dihilon et al., 2016). Las industrias alimenticias, agrícolas, papeleras, curtidoras y textiles son perfectas para la aplicación de las hidrolasas por el hecho de que la materia prima son biomoléculas que pueden ser producidas, degradadas o modificadas por éstas. Casi el 75 % de las enzimas utilizadas en las industrias son hidrolíticas, lo que significa que su uso se extiende a degradar varias sustancias (Dihilon et al., 2016). Para el uso industrial, se buscan enzimas que tengan tolerancia a altas y bajas temperaturas. También se busca que las enzimas exhiban actividad en medios ácidos o alcalinos, adicionalmente que tengan alto rendimiento en medios no acuosos (Joshi y Satyanarayana, 2015). La hidrólisis enzimática ha sido practicada durante muchos años y gradualmente ha ido remplazando la hidrólisis ácida tradicional (Kazunari y Imanka, 2011).

2.2.2 Uso de enzimas en las industrias de reciclado de cartón

Por su efecto catalítico en la industria de recicladora de cartón, las enzimas pueden ser utilizadas para degradar fibras, adhesivos, tintas, así como para blanqueamiento y tratamiento de aguas (Sondhi et al., 2015). Para la degradación de adhesivos se utiliza la esterasa principalmente; esta puede ser auxiliada por lipasa, xilanasas, celulasa y amilasa (Gronqvist et al., 2014; Nguyen et al., 2010).

2.2.2.1 Esterasas

Las esterasas al igual que las lipasas, son hidrolasas éster carboxílicas. Las esterasas son un grupo de hidrolasas capaces de degradar o formar enlaces de ésteres (Castro et al., 2017). Estas enzimas tienen varias aplicaciones debido a su estabilidad en solventes orgánicos, cuentan con una extensa variedad de sustratos específicos, son estereoselectivas y regioselectivas (Ramnath et al., 2016). Degradar a un éster causa la disminución de la superficie adherente del sustrato, debilitando las propiedades de adhesión (Vaquero et al., 2016). El mecanismo de hidrólisis de los ésteres se divide en 4 etapas. Inicialmente, el sustrato se une a la serina activa, generando un intermediario tetraédrico el cual es estabilizado por la acción catalítica de His y Asp residuales. Enseguida, el alcohol es liberado y un complejo acil-enzima es producido. El ataque del nucleófilo forma nuevamente un intermediario tetraédrico, quien después genera el producto (un ácido o un éster) y una enzima libre (Castro et al., 2017).

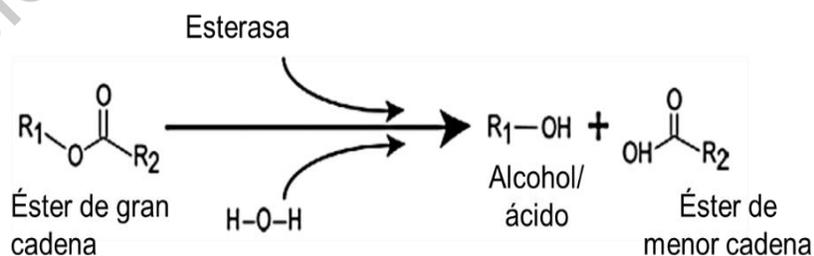


Figura 6. Mecanismo general de acción de las esterasas. Un éster de cadena grande se hidroliza y producir alcoholes, ácidos y ésteres de menor cadena.

2.2.2.2 Lipasas

Las lipasas son triacilglicerol acilhidrolasas las cuales catalizan la hidrolisis de un triacilglicerol a glicerol y ácidos grasos (Jaiswal et al., 2017). Las lipasas se pueden diferenciar de las esterasas por la ocurrencia de activación de interfase, (característica que solo se observa en las lipasas) mientras que las esterasas obedecen el modelo cinético de Michaelis Menten (Sharma et al., 2001). Sin embargo, las lipasas tienen propiedades alteradas de las esterasas, ya que estas pueden portar a los grupos acilo (Pleiss et al., 1998). Las lipasas toman efecto en los enlaces de ésteres presentes en acilgliceroles para liberar glicerol y ácidos grasos (Jaiswal et al., 2017). En medios líquidos limitados, estas enzimas son capaces de hacer reversible esta acción (esterificación) vía acidólisis, interesterificación y alcoholisis. Sirven como aditivos en químicos finos, fármacos, tratamientos de aguas residuales, desengrasantes, manufactura del papel, también aceleran la degradación de residuos grasos y del poliuretano (Ramnath et al., 2016). Son conocidas por hidrolizar el 90 % de los triglicéridos en glicerol, monoglicéridos más ácidos grasos, los cuales son más hidrofóbicos y más fáciles de eliminar que los triglicéridos (Sharma et al., 2001). Análisis estructurales han revelado que la activación de interfase es debido a un dominio hidrofóbico, el cual cubre el sitio activo de las lipasas. Sin embargo, solo la presencia mínima de concentración de sustrato, como la presencia de triglicéridos y solventes orgánicos, harán el sitio activo de la enzima disponible (Sharma et al., 2001).

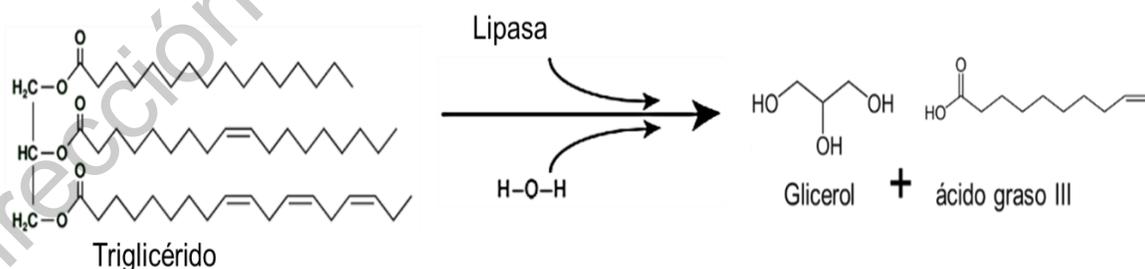


Figura 7. Mecanismo general de acción de las lipasas. Un triglicérido se hidroliza para producir glicerol y un ácido graso.

2.2.2.3 Xilanasas

Las xilanasas son glucosidasas que pueden adherirse a la columna β -1,4 del complejo polisacárido xilano. El xilano compone la mayor proporción porcentual de las paredes celulares primarias y secundarias de las plantas. Son científicamente conocidas como endo-1,4- β -xilanasas en conjunto con varios sinónimos tales como β -xilanasas, xilanasas, β -1, 4-xilanasas, endoxilanasas, endo-1,4- β -d-xilanasas, y β -1,4-d-xilan-xilanohidrolasas (Kumar et al., 2018). La degradación enzimática del xilano es un proceso complicado que requiere la acción sinérgica de varias enzimas. Las endo-1,4- β -xilanasas enlazan al xilano aleatoriamente. Las β -d-xilosidasas catalizan la remoción de las unidades de xilosa monomérica de la sección no reductora terminal de la xilobiosa y las cadenas de xilo-oligosacáridos. Mientras que la remoción de los grupos laterales de las cadenas es catalizada por otras enzimas como la acetil xilanesterasas, α -L-arabinofuranosidasas y α -d-glucuronidasas (Kumar et al., 2018).

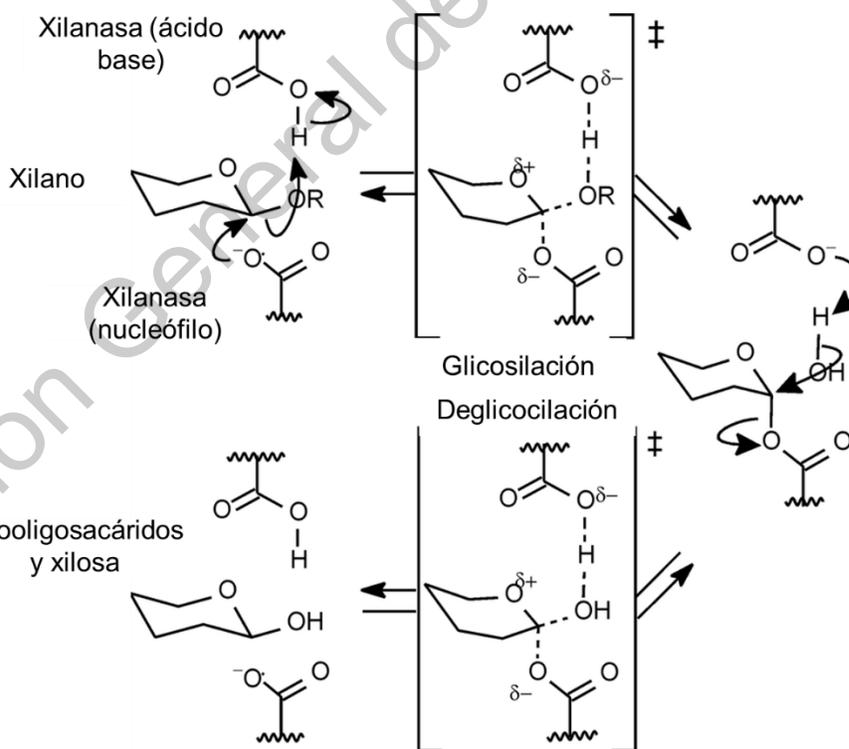


Figura 8. Mecanismo general de acción de las xilanasas. El xilano, por varias etapas se hidroliza para producir xilooligosacáridos y xilosa.

La acción de despolimerización de las xilanasas puede cambiar al sustrato polimérico en xilooligosacáridos y xilosa (Juturu y Wu, 2012). Las xilanasas también son usadas en la industria alimenticia, papelera y recicladora (Singh et al., 2013). Estas enzimas, sean de origen bacteriológico o fúngico, muestran una actividad óptima cerca de temperaturas mesofílicas (Walia et al., 2014). También son utilizadas en el proceso de blanqueamiento del papel como alternativa a los compuestos clorados. Las desventajas de las xilanasas están la dificultad de alcanzar el sustrato debido a limitaciones físicas (Walia et al., 2017). Otras desventajas radican en la limitada hidrólisis de los xilanos por su estructuración ramificada divergente, el rango del pH de operación, la estabilidad térmica, la inhibición del producto final y el costo de producción (Walia et al., 2017).

El tratamiento con xilanasas en la industria recicladora de cartón puede ayudar a la remoción de grupos cromóforos, así como también a la hidrólisis parcial de los reprecipitados de xilanos o complejos de carbohidratos de lignina (Walia et al., 2015) La xilanasas es capaz de romper los enlaces del xilano entre las macromoléculas que lo recubren, lo que facilita la remoción de la lignina en el proceso de blanqueamiento. Por esta razón, las xilanasas ayudan a reducir el contenido de lignina, así como a incrementar el brillo de la pasta (Kumar y Shukla, 2015). Las xilanasas libres de celulasas son capaces de delignificar sin afectar la estructura de la fibra celulósica (Chauchan et al., 2014).

2.2.2.4 Amilasas

Las amilasas son enzimas que pueden hidrolizar moléculas de almidón para dar diversos productos como la dextrina y pequeños polímeros que se componen por unidades de glucosa. Estas enzimas tienen una gran importancia en nuestros días por el hecho de que se pueden aplicar a industrias alimenticias, textiles, papeleras hasta farmacéuticas (John, 2017). Existen 2 clases de amilasas, entre las más identificadas están las α -amilasas y las gluco amilasas. Las α -amilasas (endo-1,4- α -D-glucan glucohidrolasa) son enzimas extracelulares que se adhieren aleatoriamente a los enlaces 1,4 α -D-glucosídicos, los cuales unen a las moléculas de glucosa en la cadena lineal de la amilasa. La glucoamilasa (exo-1,4- α -D-glucan

glucanohidrolasa) hidroliza unidades de glucosa de los extremos no reductores de amilosa y amilopectina de una manera gradual. Así mismo, las amilasas degradan polímeros de la familia del almidón para dar productos característicos de enzimas amilolíticas individuales (Damien et al., 2010). El producto final de la hidrólisis catalizada por la β -amilasa es maltosa, mientras que la glucoamilasa genera glucosa (Babbar y Oberoi, 2014). El almidón consiste en 2 polímeros compuestos de unidades de glucosa: amilosa (lineal) y amilopectina (ramificada). La amilosa está compuesta por cadenas lineales de enlaces α -1,4 D-glucosa residuales (Chi-Wen et al., 2011).

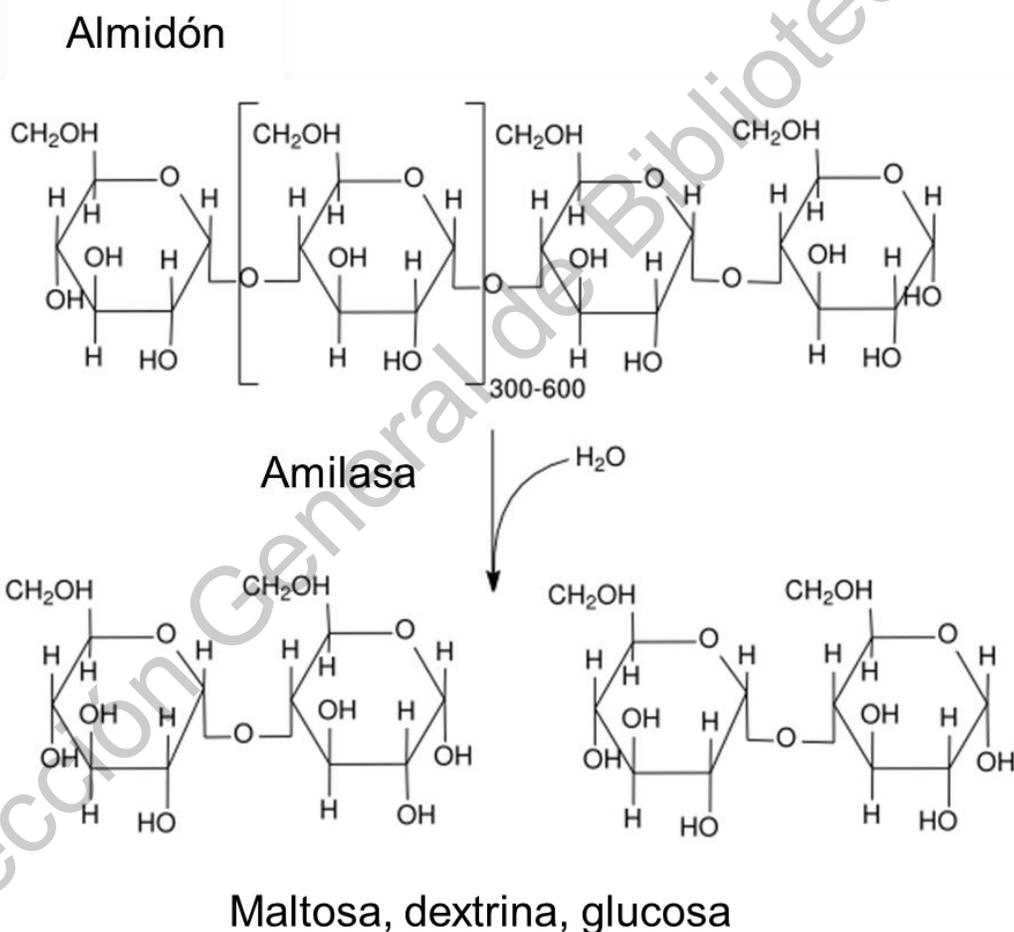


Figura 9. Mecanismo general de acción de las amilasas. El almidón se hidroliza en dextrina, maltosa y unidades de glucosa.

La amilosa se puede degradar de forma extensa por la α -amilasa. La amilopectina puede abarcar desde el 75 al 80 % de la mayoría de los almidones, tiene alto peso molecular y estructuras ramificadas compuestas por alrededor de 20 a 25 uniones α -1,4 D-glucosa residuales. En soluciones acuosas, las amilopectinas son estables debido a sus estructuras ramificadas. El almidón es un componente mayoritario de los residuos procesados de alimentos. Cuando los compuestos de la familia del almidón son utilizados como adhesivos dentro de la industria recicladora de cartón, estos se pueden acumular en forma de depósitos. La alfa amilasa se puede aplicar para facilitar su degradación para que no cause problemas en el proceso (Jhon, 2017).

Las amilasas son los biocatalizadores más empleados en la sacarificación del almidón, estas son capaces de modificar e hidrolizar a esta molécula. Pueden ser ácidas, neutras y alcalinas. Son metaloenzimas, requieren (Ca^{2+}) como cofactor para efectuar su actividad, mantener su integridad estructural, así como la estabilidad durante las reacciones enzimáticas en las que participa (Sharma y Satyanarayana, 2013).

2.2.2.5 Celulasas

Las celulasas son glucosidasas que descomponen la celulosa en polisacáridos de cadena más corta como celodextrina, celobiosa y glucosa. Estas tienen comúnmente un dominio catalítico que se adhiere al enlace glucosídico, así como un módulo que se une al carbohidrato que tiene como objetivo insertar el dominio catalítico al sustrato. Las celulasas se dividen en 3 categorías, las endoglucanasas, exoglucanasas y celobiasas; estas colaboran en conjunto para poder llevar a cabo la hidrólisis del complejo celulósico de las células de la pared celular (Obeng et al., 2016).

El mecanismo de hidrólisis establece que las endoglucanasas catalizan una sección aleatoria de las cadenas de celulosa sobre las regiones amorfas, produciendo principalmente celodextrina. Las exoglucanasas hidrolizan la celulosa cristalina, produciendo celobiosa como producto principal. Finalmente, las

celobiasas finalmente hidrolizan los celo-oligómeros solubles producidos, degradándolos a glucosa (Wahlström et al., 2014).

Las celulasas son muy utilizadas en la industria recicladora de cartón como blanqueadores, además, así como las xilanasas, tienen la propiedad de modificar drásticamente las características de la pasta y del producto final (Kumar et al., 2018).

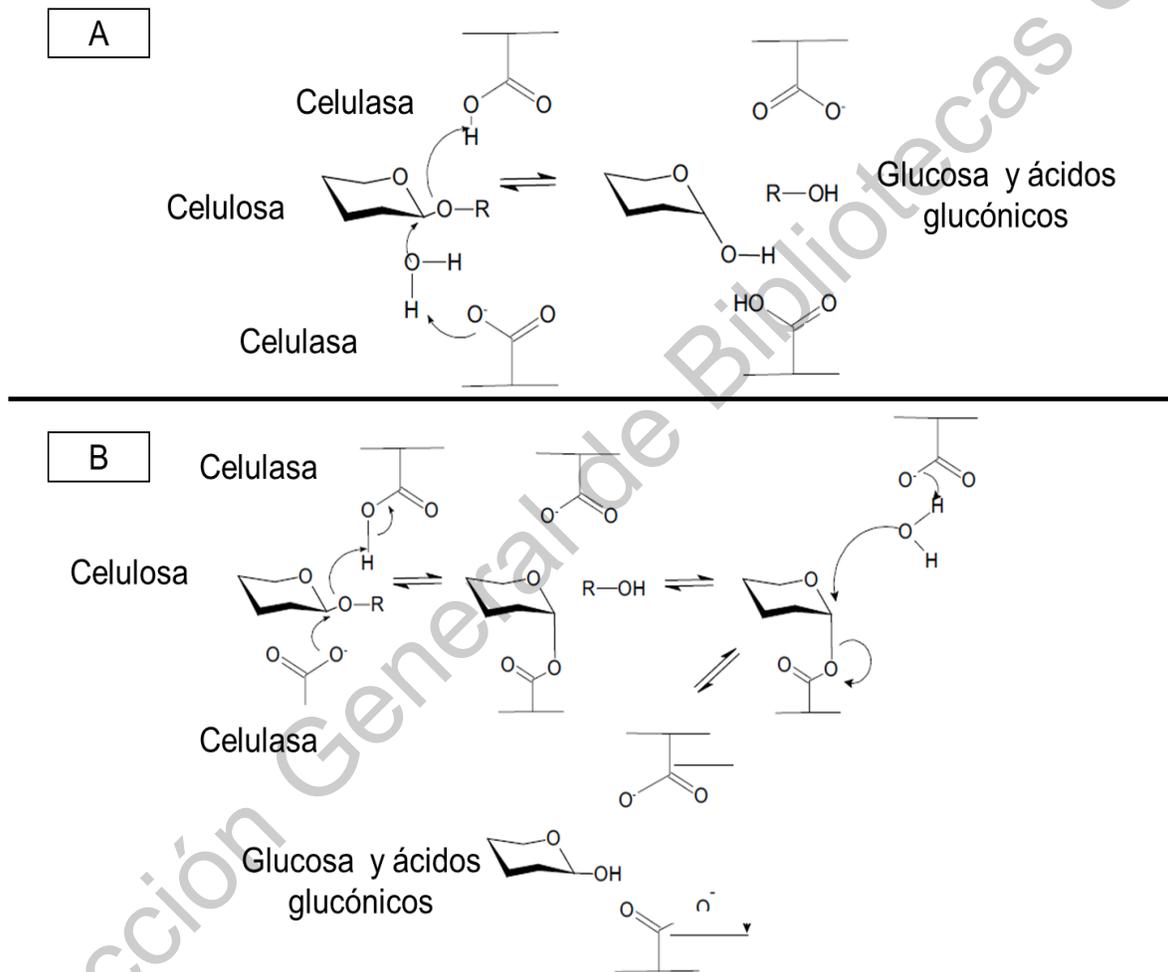


Figura 10. Mecanismo general de acción de las celulasas. El almidón se hidroliza en glucosa y ácidos glucónicos. A: Mecanismo de retención. B: Mecanismo de inversión. Ambos mecanismos actúan para la degradación completa de la celulosa (Obeng et al., 2016).

2.3 *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*

Trichoderma reesei y *Aspergillus niger* son hongos filamentosos ubicuos que se caracterizan por producir altas concentraciones de enzimas hidrolíticas cuando utilizan la fermentación en estado sólido para obtener fuentes de carbono (Obeng et al., 2016). Generalmente se encuentran creciendo de forma aerobia en materia orgánica y se pueden encontrar en el suelo, compostas y plantas en descomposición. Se ha reportado que estos hongos son productores de esterasas, lipasas, xilanasas, celulasas y amilasas (John, 2017; Dhillon y Kaur, 2016; Kulkarni et al., 2013), por lo cual son especies que pueden tener potencial en la industria del cartón reciclado. Las enzimas de estos hongos, sobre todo las celulasas, son utilizadas ampliamente en la industria para la degradación de compuestos lignocelulósicos.

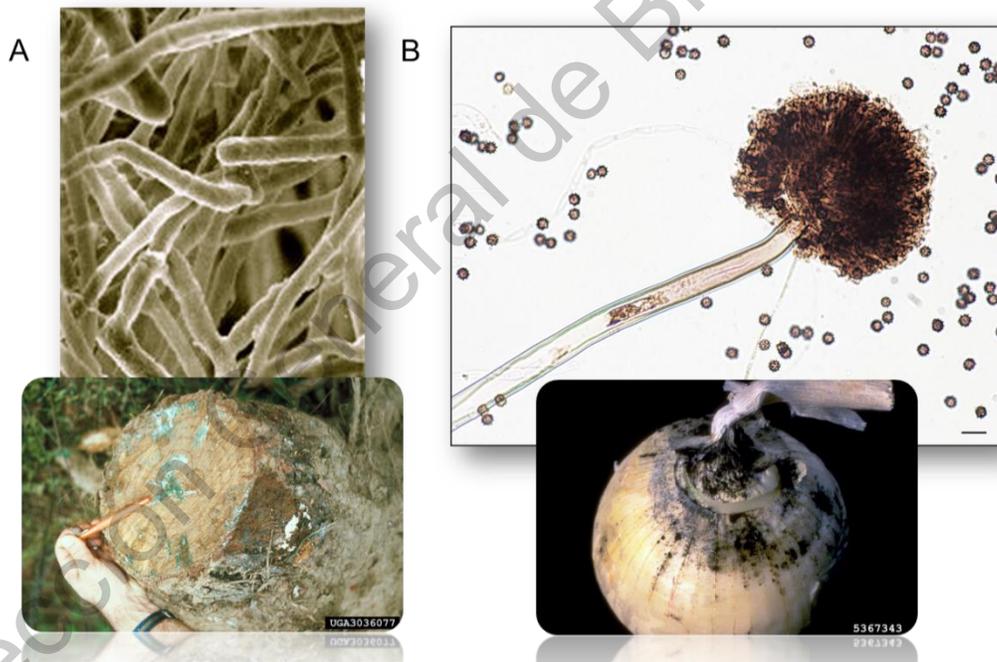


Figura 11. A: *Trichoderma reesei*. B: *Aspergillus niger*. Ambos suelen encontrarse en material vegetal en descomposición. La obtención del carbono requerido para su metabolismo lo realizan a partir de la producción de las enzimas hidrolíticas.

3 JUSTIFICACIÓN

La problemática por la presencia de stickies o polímeros adhesivos en el agua de proceso de la industria del cartón causa pérdidas económicas, fallas técnicas y baja calidad en el papel reciclado. El uso de enzimas para eliminar estos contaminantes es una alternativa, sin embargo, el elevado costo de las enzimas puras hace poco viable su uso a nivel industrial. Una alternativa de bajo costo puede ser el uso de extractos enzimáticos crudos utilizando fermentación en estado sólido. Como se requieren nuevas propuestas económicas y que sean amigables con el medio ambiente, se propone producir estos extractos enzimáticos crudos a partir de *T. reesei* y *A. niger* utilizando como sustrato pasta de cartón reciclado. Estas 2 especies de hongos se caracterizan por producir enzimas hidrolíticas, lo que significa que pueden producir extractos que puedan contribuir a la degradación de los stickies en el agua de una manera económica y eficaz. Si se comprueba que pueden degradar los stickies del agua de proceso, ya se tendrá una nueva alternativa para poder controlar el problema dentro de las industrias de cartón reciclado.

4 HIPÓTESIS

La aplicación de un extracto enzimático crudo producido por *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* obtenido a partir de pasta de cartón será capaz de degradar los depósitos de polímeros adhesivos (*stickies*) presentes en el agua de proceso de las industrias recicladoras de cartón.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de dos extractos enzimáticos crudos obtenidos a partir de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* sobre la degradación de los depósitos de polímeros adhesivos presentes en el agua de proceso de la industria del cartón reciclado.

5.2 Objetivos particulares

- 5.2.1 Obtener dos extractos enzimáticos independientes a partir de *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei* utilizando pasta de cartón reciclado como sustrato.
- 5.2.2 Caracterizar los extractos en función de su contenido de proteína, así como su actividad de lipasas, esterasas, xilanasas y celulasas bajo el efecto de diferentes valores de pH y temperatura.
- 5.2.3 Determinar el efecto de la relación de extracto enzimático de los diferentes hongos, así como valores de pH y temperatura que conduzcan a una mayor actividad enzimática.
- 5.2.4 Evaluar el efecto de la aplicación del extracto enzimático combinado en muestras de agua de proceso de la industria de cartón reciclado sobre la eliminación de stickies.

6. METODOLOGÍA

6.1 Obtención de un extracto enzimático a partir de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*

Una muestra de pasta de cartón de una recicladora de cartón fue donada por Citriczyme S.A. de C.V. la cual fue utilizada como el sustrato para la producción de 2 complejos enzimáticos independientes a partir de *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei*. Para la obtención de los complejos, se tomaron 2 matraces Erlenmeyer de 250 mL y a cada uno se les agregó 50 g de pasta de cartón. En uno de los matraces se le agregó 1 mL de una solución de *Trichoderma reesei*, mientras que al otro 1 mL de una solución de *Aspergillus niger*, ambos con una concentración de 1×10^7 UFC. A cada uno de los matraces se le añadieron 32 mL de solución mineral, la cual tiene los siguientes componentes por litro de solución: 1.44 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g Na_2HPO_4 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.31 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 2 g K_2HPO_4 , 0.1 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0.0138 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$. Se dejaron incubando a 33 °C y a humedad constante hasta que las muestras esporularon. Se tuvieron muestras control sin inoculación para asegurar el crecimiento de los hongos.

6.2 Caracterización de los extractos enzimáticos en función del pH y temperatura

6.2.1 Método de cuantificación de proteína por el reactivo Biuret

En esta técnica, el reactivo Biuret (Gornall et al., 1949) se preparó disolviendo 3.8 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 6.7 g Na-EDTA en 700 mL de H_2O . Mientras se agitaba, se añadieron 200 ml de NaOH 5N y luego 1 g de KI como estabilizante. Se preparó un estándar de BSA de 20 mg/mL. Se añadió 1 mL del reactivo de Biuret a los tubos estándar y muestras problemas preparadas como se indica en la Tabla 1. Las disoluciones preparadas se dejaron a temperatura ambiente durante 1 hora, se tomaron 100 μL y se analizaron en el espectrofotómetro (iMark, Bio Rad) a 570 nm frente al blanco.

Tabla 1. Lote de soluciones preparadas para el análisis de contenido de proteína de los extractos por el método Biuret.

Muestra	BSA 20 mg/mL (μ L)	H ₂ O (μ L)	Reactivo Biuret	Concentración (mg/mL)
Blanco	0	100	1 ml	0
1	25	75	1 ml	5
2	50	50	1 ml	10
3	75	25	1 ml	15
4	100	0	1 ml	20
<i>E. T. reesei</i>	100	0	1 ml	Por conocer
<i>E. A. niger</i>	100	0	1 ml	Por conocer

6.2.2 Método p-nitrofenol

Esta técnica fue utilizada para verificar la actividad o presencia de lipasas y esterases en los complejos obtenidos. Previo a los análisis, se realizó una curva de estándar para el p-nitrofenol: se preparó la solución de p-nitrofenol 1×10^{-4} M a partir de una solución inicial 0.01 M que contenía 0.1391 g de p-nitrofenol en 100 mL de agua (Gupta et al., 2003). Diferentes volúmenes de la solución de p-nitrofenol se mezclaron con NaOH 0.2 M y agua destilada, en las cantidades que se indican en la Tabla 3, cada ensayo fue realizado por triplicado.

Se tomaron 100 μ L de cada una de las muestras y se llevaron a lectura por espectrofotometría a 415 nm (iMark, Bio Rad). Seguido, se tomaron 25, 50, 75 y 100 μ L de los dos extractos obtenidos y se empleó como sustrato 4 nitrofenil palmitato. Se preparó una solución reguladora de citrato-fosfato 50 mM con valores de pH de 7. Se siguió la metodología propuesta por Gupta et al. (2003) con las siguientes modificaciones: 3 mg de p-nitrofenol disueltos en 1 mL de 2-propanol. Se añadieron 15 μ L de la solución antes descrita a las muestras problema preparadas como se muestran en la Tabla 2. Las soluciones mostradas en la Tabla 3 se dejaron reaccionar en una termo placa a una temperatura de 45 °C, a 500 rpm durante 15 minutos. Después de la reacción, se tomaron 100 μ L de cada una de las muestras y se llevaron a lectura por espectrofotometría a 415 nm (iMark, Bio Rad). Las soluciones, así como los ensayos de los análisis se realizaron por triplicado.

Tabla 2. Lote de soluciones preparadas para obtener la curva estándar del p – nitrofenol. Para todas las soluciones se utilizaron 50 μL de amortiguador.

Muestra	Concentración de p-nitrofenol (μM)	p-nitrofenol (μL)	H ₂ O (μL)
Blanco	0	-	450
P1	20	9	441
P2	40	18	432
P3	60	27	423
P4	80	36	414
P5	100	45	405

6.2.3 Método DNS

La determinación de la actividad de la amilasa, xilanasas y celulasas estuvo basada en el método DNS (Miller, 1959). En este caso, la hidrólisis enzimática del almidón, xilano y celulosa (azúcares no reductores) en glucosa más fructosa (azúcares reductores) se calculó mediante la producción de azúcares reductores. El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Chaplin, 1986), y pueden detectarse a una absorbancia en la zona de 540-570 nm. El reactivo DNS se preparó de la siguiente manera: se agregó tartrato sódico potásico [$\text{NaK}(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; PM 282.23] al 30 % (p/v) en NaOH (PM 40) 0.4 M. Después, se disolvió 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 300 g de tartrato sódico potásico en 200 mL de hidróxido sódico 2 M (16 g de NaOH en 200 mL de agua destilada) y se diluyó con 1000 ml con agua destilada.

Se realizó una curva estándar para la glucosa con DNS. A partir de una solución de glucosa 40 mM y por dilución con agua destilada, se prepararon una serie de soluciones de distinta concentración, tal y como se indica en la Tabla 4. Las muestras se realizaron por triplicado. De cada muestra se tomaron 100 μL , se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

Tabla 3. Soluciones preparadas para medir actividad de los extractos para lipasa y esterasa.

Muestra	Amortiguador (μL)	Sustrato (4-nitrofenil palmitato) (μL)	Extractos enzimáticos (μL)	Agua destilada (μL)
Tratamiento negativo	485	15	0	100
M1	485	15	25	75
M2	485	15	50	50
M3	485	15	75	25
M4	485	15	100	0

Seguido, se añadieron 100 μL del reactivo DNS; después, se dejó incubar posteriormente la mezcla en una placa térmica con agitación a 100 °C, dejando reaccionar durante 10 minutos. Posteriormente, se enfrió y se tomaron 100 μL de la muestra y se determinó la absorbancia a 570 nm, utilizando como blanco la mezcla de la muestra 0.

Los sustratos empleados se muestran en la Tabla 6, los cuales corresponden a la actividad de cada enzima. Las muestras y análisis se realizaron por triplicado para el caso de cada enzima.

Tabla 4. Lote de soluciones preparadas para la obtención de la curva estándar de glucosa.

Muestra	Concentración (μM)	Agua destilada (μL)	Glucosa 40 mM (μL)
0	0	5.0	0
1	2000	4.75	0.25
2	4000	4.5	0.5
3	6000	4.25	0.75
4	8000	4.0	1.0
5	10000	3.75	1.25

Tabla 5. Lote de soluciones para medir la actividad enzimática de la amilasa, celulasa y xilanasa.

Muestra	Amortiguador (μL)	Sustrato (μL)	Extractos enzimáticos (μL)	Agua destilada (μL)
Tratamiento negativo	200	100	0	100
M1	200	100	25	75
M2	200	100	50	50
M3	200	100	75	25
M4	200	100	100	0

Las soluciones preparadas se dejaron reaccionar en la termo placa a 60 °C durante 10 minutos a 500 rpm para el caso de la evaluación de la actividad de xilanasa y amilasa. Para evaluar la actividad de la celulasa, las soluciones preparadas se dejaron reaccionar a 60 °C durante 60 minutos. Después de los tiempos de reacción, de cada muestra se toman 100 μL y se transfieren a un tubo Eppendorf. Se añadieron 100 μL del reactivo DNS, colocando posteriormente la mezcla en la placa térmica con agitación a 100 °C, dejando reaccionar durante 10 minutos. Al finalizar la reacción, enfriar, tomar 100 μL de la muestra y determinar la absorbancia a 570 nm.

Una vez que se verificó la actividad enzimática, así como la dosificación mínima, se evaluaron las actividades a diferentes condiciones de temperatura y pH.

Tabla 6. Sustrato para cada actividad enzimática a evaluar.

Actividad a evaluar	Sustrato
Amilasa	Solución de almidón al 2 % p/v de CaCl ₂ 20 mM.
Esterasa/lipase	Solución de p-nitrofenol en 2-propanol (3 mg/mL)
Xilanasa	Suspensión de xilano a una concentración de 5 g/L
Celulasa	10 mg de papel filtro

Se prepararon soluciones reguladoras de citrato-fosfato 50 mM con un intervalo de pH de 5.0 a 8.0 y soluciones reguladoras de glicina con valores de pH de 9.0 a 10.0. Al obtener el pH donde la actividad enzimática sea máxima, el extracto enzimático crudo será evaluado a ese valor a las siguientes temperaturas: 30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C (Amaro-Reyes et al., 2011).

Se definió una unidad de actividad (U) como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de glucosa (para el caso de la celulasa, amilasa y xilanasas) o de p-nitrofenol (para la lipasa y esterasa), y se reportaron los resultados en U/mg de proteína contenida en cada uno de los extractos evaluados.

6.3 Mezclas de extractos enzimáticos crudos

Se utilizó el modelo de diseño experimental de diseño de mezcla en el programa MiniTab 16.4 (2013, Minitab Inc., State College, PA, EUA) para obtener la mezcla óptima (proporción de extractos crudos de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*) con base en los resultados obtenidos. El pH y temperatura de evaluación se establecieron igual a las del agua de proceso de las industrias recicladoras de cartón, que en este caso es de T= 30 a 45 °C a un pH= 7 (Datos proporcionados por la empresa Citriczyme S.A. de C. V.).

6.4 Aplicación de los extractos crudos al agua de proceso.

Se evaluaron los extractos enzimáticos crudos tomando 1 mL de agua de proceso de una industria recicladora de cartón determinada (proporcionada por Citriczyme S.A. de C.V.). En este caso, se aplicaron 100 μL a las muestras de agua y se dejaron reaccionar en una termo placa a 45 °C durante 2, 5, 7 y 24 horas. Seguido, se tomó 1 gota de muestra de agua problema antes de la aplicación y se colocó en una cámara de Neubauer, utilizando el método del hemacitómetro como primera evaluación rápida. El método del hemacitómetro es un procedimiento sencillo con el cual se puede notar la presencia de stickies en el agua de proceso; esta técnica es comúnmente utilizada como un indicador sencillo y de confianza dentro de esta industria. Luego, esta se observó en el microscopio óptico a una resolución de 10x para poder realizar un conteo a los polímeros. Al finalizar la

reacción, se tomó una gota del agua tratada para contar los stickies en el microscopio con el mismo método. En caso de que las pruebas rápidas arrojaran resultados mayores al 40 % de remoción o se notara un cambio drástico en el área de los stickies, se utilizará el método aplicado por Zhang et al. (2017), que consiste en medir la disminución de las áreas superficiales de los stickies presentes. En donde para el calcular el porcentaje de remoción de polímeros adhesivos en el agua de proceso, se aplicará la Ecuación 1.

$$\%R = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \dots\dots(1)$$

En donde A_1 es el conteo de adhesivos antes del tratamiento y A_2 es el conteo de adhesivos después del tratamiento.

6.5 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y serán reportadas como la media de los datos \pm la desviación estándar. Se realizará comparación de medias de las variables de respuestas de cada experimento una factorial.

7 RESULTADOS

7.1 Obtención del complejo enzimático a partir de *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei*

A los 15 días después de haber dejado los matraces con la pasta de cartón reciclado incubados a 33 °C e inoculados con *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*, estos esporularon. Se realizaron 9 ensayos, cada uno con 50 g de pasta, 3 sin inocular, 3 inoculados con *Trichoderma reesei* y otros 3 inoculados con *Aspergillus niger*. Después de dicho periodo, se observó que la pasta de cartón se cubrió por completo de una capa verde para el que contenía *Trichoderma reesei* y una capa negra para los inoculados con *Aspergillus niger*. En la Figura 11 se muestran los matraces empleados para la experimentación. Se tomaron los extractos enzimáticos crudos de las muestras que cubrieron mayoritariamente a la pasta de cartón colocada en cada matraz; estos se obtuvieron sacando el líquido contenido dentro de los matraces y exprimiendo mecánicamente la pasta.



Figura 12. Matraces Erlenmeyer en donde se llevó a cabo la producción de los complejos enzimáticos. A: pasta de cartón sin inóculo. B: pasta de cartón con inóculo de *Trichoderma reesei*. C: pasta de cartón con inóculo de *Aspergillus niger*.

En total, se obtuvieron 30 mL de extracto de *Trichoderma reesei* y 28 mL de extracto de *Aspergillus niger*. Se calculó la actividad de estos extractos, pero debido a su nulos o bajos valores obtenidos para lipasa, esterasa, amilasa, xilanas y celulasa, se propuso producir un segundo extracto. Para producirlo, se tomó 1 g de pasta inoculada previamente preparada de los matraces de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* para agregarlos a otros que contenían 50 g de pasta de cartón cada uno. A los 3 días de incubación a 33 °C, la pasta de cartón contenida en ambos matraces se observó cubierta totalmente de los hongos *T. reesei* y *A. niger*. Al ocurrir esto, se procedió extrayendo el extracto crudo líquido y exprimiendo mecánicamente la pasta de cartón con un exprimidor de naranjas. Se obtuvieron 30 mL del extracto de *Trichoderma reesei* y 29 mL del extracto de *Aspergillus niger*.

El crecimiento de ambos hongos para la segunda producción de los extractos enzimáticos fue 5 veces más rápida comparado con la primera. Así mismo, se realizaron cálculos previos de actividad y mostraron valores detectables en el espectrofotómetro, por lo que se continuó con estos extractos para realizar las pruebas de actividad.

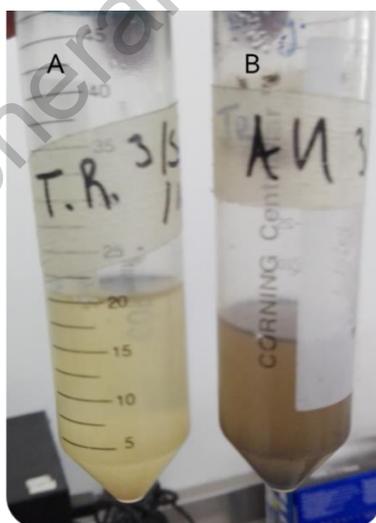


Figura 13. Extractos enzimáticos crudos obtenidos a partir de pasta de cartón reciclado utilizando fermentación en estado sólido. A: Extracto crudo de *T. reesei*. B: Extracto crudo de *A. niger*.

7.2 Cálculo del contenido de proteína soluble y de las actividades enzimáticas de los extractos

Para comenzar con los experimentos de cuantificación, primero se comenzó calculando el contenido de proteína soluble de cada uno de los extractos enzimáticos crudos producidos empleando el método del reactivo Biuret. Primero, se realizó una curva estándar de BSA, los valores que se emplearon para su elaboración se muestran a continuación en la Tabla 7 y la curva correspondiente en la Figura 13.

Tabla 7. Valores obtenidos para la elaboración de la curva estándar de BSA.

M1	M2	M3	C (mg/mL)	Absorbancia de muestra		
0	0	0	0	0.0000	±	0.0000
0.088	0.091	0.105	5	0.0947	±	0.0091
0.167	0.171	0.187	10	0.1750	±	0.0106
0.252	0.252	0.232	15	0.2453	±	0.0115
0.292	0.301	0.31	20	0.3010	±	0.0090

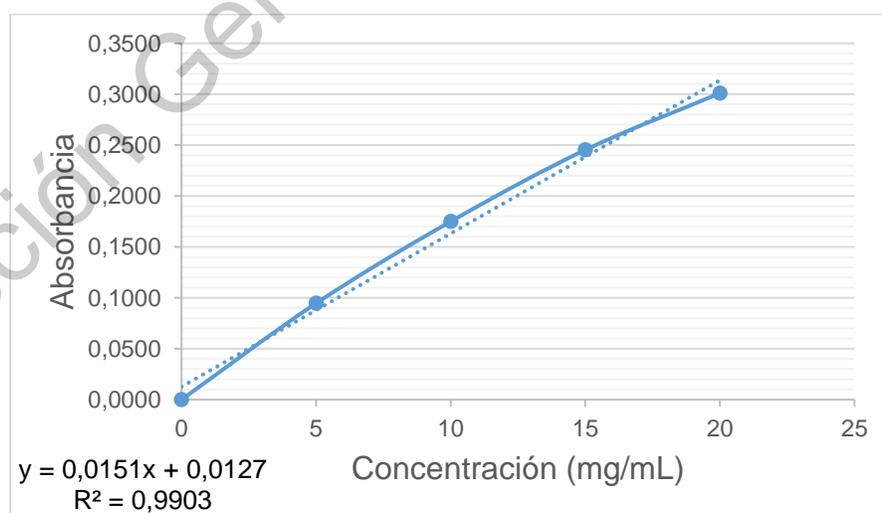


Figura 14. Curva estándar utilizada para calcular el contenido de proteína soluble.

Tabla 8. Contenido de proteína calculado para cada extracto crudo producido.

Extracto	Contenido de proteína soluble (mg/mL)		
<i>Trichoderma reesei</i>	7.857	±	0.340
<i>Aspergillus niger</i>	12.77	±	0.340

En la Tabla 8, se muestran los resultados del contenido de proteína soluble para cada extracto. El contenido de proteína del extracto de *A. niger* es 38.61 % mayor al extracto de *T. reesei*. Zhang et al. (2017) obtuvieron un valor de proteína soluble de 3.39 mg/mL utilizando *T. reesei* como productor del extracto enzimático utilizando almidón de maíz. Mientras que Oshoma y Ewakun-oie (2018) obtuvieron un valor de 2.29 ± 0.02 g/L para un extracto enzimático obtenido a partir de *A. niger* utilizando como sustrato residuos de una industria productora de plátanos.

Para calcular las actividades enzimáticas de la lipasa, esterasa, amilasa, xilanasa y celulasa, se procedió a realizar 2 curvas estándar: una de glucosa para medir los azúcares reductores liberados, adicionalmente otra de p-nitrofenol, para medir los ésteres producidos. Se realizaron 3 repeticiones de cada una de las evaluaciones de actividad por cada extracto para cada una de las enzimas mencionadas con una dosificación de 25, 50, 75 y 100 μ L.

Tabla 9. Valores para obtener la curva de calibración de p-nitrofenol.

M1	M2	M3	C (μ M)	Absorbancia de muestra		
0	0	0.018	0	0.006	±	0.010
0.221	0.253	0.201	20	0.225	±	0.026
0.523	0.509	0.531	40	0.521	±	0.011
0.761	0.743	0.768	60	0.757	±	0.013
0.851	0.981	0.918	80	0.917	±	0.065
1.039	1.169	1.141	100	1.116	±	0.068

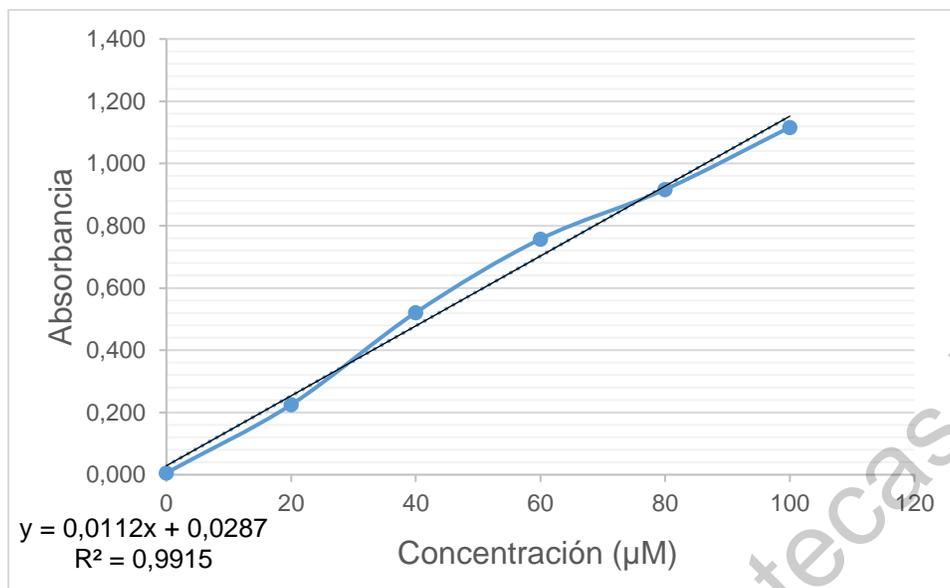


Figura 15. Curva estándar obtenida para el p-nitrofenol.

Tabla 10. Valores para obtener la curva estándar de la glucosa.

M1	M2	M3	C (µM)	Absorbancia de muestra		
0	0	0	0	0.0000	±	0.0236
0.225	0.272	0.252	2000	0.2497	±	0.0058
0.485	0.475	0.485	4000	0.4817	±	0.0155
0.625	0.633	0.655	6000	0.6377	±	0.0091
0.795	0.798	0.812	8000	0.8017	±	0.0293
0.985	0.968	1.025	10000	0.9927	±	0.0293

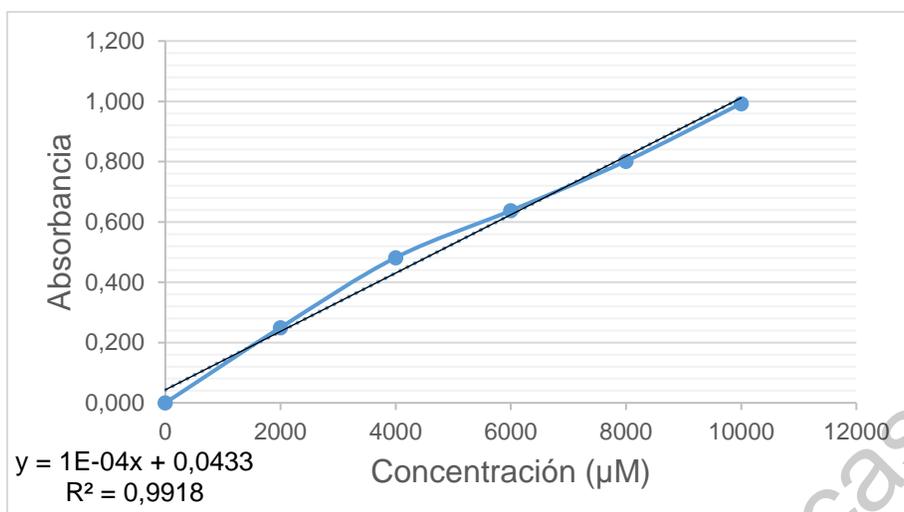


Figura 16. Curva estándar obtenida para la glucosa.

Tabla 11. Resultados de la evaluación de actividad enzimática (dosis 100 µL) reportada en unidad enzimática por miligramo de proteína del extracto y ND muestra una concentración no detectable.

Trichoderma reesei

Evaluación lipasa/esterasa				pH= 7	T= 45 °C	t= 15 min	
Dosis (µL)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio
	1	2	3	1	2	3	
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
75	0.079	0.221	0.122	0.038	0.145	0.071	0.08 ± 0.05
100	0.606	0.551	0.503	0.436	0.395	0.358	0.39 ± 0.03

Evaluación amilasa				pH= 7	T= 60 °C	t= 10 min	
Dosis (µL)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio
	1	2	3	1	2	3	
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
75	0.101	0.05	0.152	7.344	0.853	13.835	7.3 ± 6.4
100	0.487	0.421	0.4	56.472	48.072	45.399	49.9 ± 5.7

Evaluación de xilanasa				pH= 7	T= 60 °C	t= 10 min	
Dosis (µL)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio
	1	2	3	1	2	3	
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
75	0.218	0.173	0.305	22.2	16.5	33.3	24 ± 8.54
100	0.691	0.756	0.741	82.4	90.7	88.8	87.3 ± 4.3

Evaluación de celulasa				pH= 7	T= 60 °C	t= 60 min	
Dosis (µL)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio
	1	2	3	1	2	3	
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
75	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
100	0.209	0.253	0.275	3.5	4.4	4.9	4.2 ± 0.7

Aspergillus niger

Evaluación de lipasa/esterasa				pH= 7	T= 45 °C	t= 15 min	
Dosis (µL)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio
	1	2	3	1	2	3	
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
75	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
100	0.279	0.249	0.199	0.116	0.102	0.079	0.09 ± 0.01

Evaluación de amilasa				pH= 7	T= 60 °C	t= 10 min	
Dosis (µL)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio
	1	2	3	1	2	3	
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
75	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
100	0.385	0.445	0.495	26.7	31.4	35.3	31.2 ± 4.3

Evaluación de xilanasas				pH= 7	T= 60 °C	t= 10 min	
Dosis (µL)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio
	1	2	3	1	2	3	
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
75	0.158	0.232	0.303	9.0	14.8	20.3	14.7 ± 5.7
100	0.597	0.623	0.657	43.3	45.4	48.0	45.6 ± 2.4

Evaluación de celulasas				pH= 7	T= 60 °C	t= 60 min	
Dosis (µL)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio
	1	2	3	1	2	3	
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
75	0.1	0.05	0.083	0.7	0.1	0.5	0.4 ± 0.3
100	0.441	0.411	0.514	5.2	4.8	6.2	5.4 ± 0.7

Los resultados mostrados en la Tabla 11 indican que utilizar una dosis de 100 µL para cada ensayo es la óptima para realizar las evaluaciones de actividad a diversos valores de pH y temperatura. A continuación, en las Tablas 13 a 19, se muestran los resultados de dicha evaluación. Después de haber obtenido el pH donde la actividad calculada fue la de mayor valor (óptimo), se procedió a realizar a evaluación a los siguientes valores de temperatura: 30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C.

Tabla 12. Evaluación de la actividad de *T. reesei* y *A. niger* de lipasa/esterasa a diferentes valores de pH.

Trichoderma reesei

T= 40 °C

pH	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio	
	1	2	3	1	2	3		
5	0.317	0.287	0.287	0.218	0.195	0.195	0.202	± 0.013
6	0.547	0.48	0.537	0.391	0.340	0.383	0.371	± 0.027
7	0.473	0.531	0.473	0.335	0.379	0.335	0.350	± 0.026
8	0.59	0.663	0.687	0.424	0.479	0.498	0.467	± 0.038
9	0.74	0.767	0.76	0.537	0.557	0.552	0.549	± 0.011
10	0.487	0.403	0.44	0.346	0.283	0.311	0.313	± 0.032

Aspergillus niger

T= 40 °C

pH	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio	
	1	2	3	1	2	3		
5	0.423	0.427	0.397	0.298	0.300	0.277	0.292	± 0.013
6	0.403	0.473	0.423	0.283	0.335	0.298	0.305	± 0.027
7	0.45	0.49	0.487	0.318	0.349	0.346	0.338	± 0.017
8	0.387	0.393	0.35	0.270	0.275	0.242	0.262	± 0.018
9	0.403	0.423	0.387	0.283	0.298	0.270	0.283	± 0.014
10	0.423	0.41	0.377	0.298	0.288	0.262	0.283	± 0.018

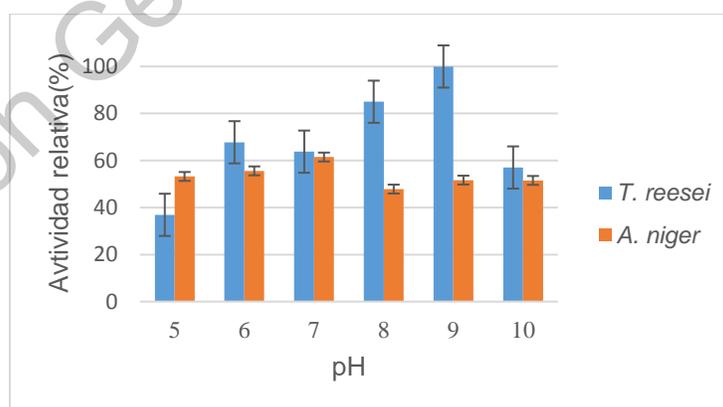


Figura 17. Comparación de la actividad enzimática relativa de *T. reesei* y *A. niger* de lipasa/esterasa a diferentes valores de pH.

Tabla 13. Evaluación de la actividad de *T. reesei* y *A. niger* de lipasa/esterasa a diferentes valores de temperatura.

Trichoderma reesei

pH= 9

T (°C)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio	
	1	2	3	1	2	3		
30	1.347	1.303	1.353	0.996	0.963	1.001	0.987	± 0.021
40	1.17	1.19	1.327	0.862	0.877	0.981	0.907	± 0.065
50	1.467	1.57	1.63	1.087	1.165	1.210	1.154	± 0.062
60	1.143	1.01	0.987	0.842	0.741	0.724	0.769	± 0.064
70	0.91	0.9	0.797	0.666	0.658	0.581	0.635	± 0.047
80	0.873	0.813	0.893	0.638	0.593	0.653	0.628	± 0.031

Aspergillus niger

pH = 7

T (°C)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio	
	1	2	3	1	2	3		
30	0.337	0.353	0.373	0.233	0.245	0.260	0.246	± 0.014
40	0.457	0.5	0.52	0.324	0.356	0.371	0.350	± 0.024
50	0.633	0.6	0.643	0.457	0.432	0.464	0.451	± 0.017
60	0.373	0.4	0.423	0.260	0.281	0.298	0.280	± 0.019
70	0.46	0.42	0.453	0.326	0.296	0.321	0.314	± 0.016
80	0.407	0.43	0.483	0.286	0.303	0.343	0.311	± 0.029

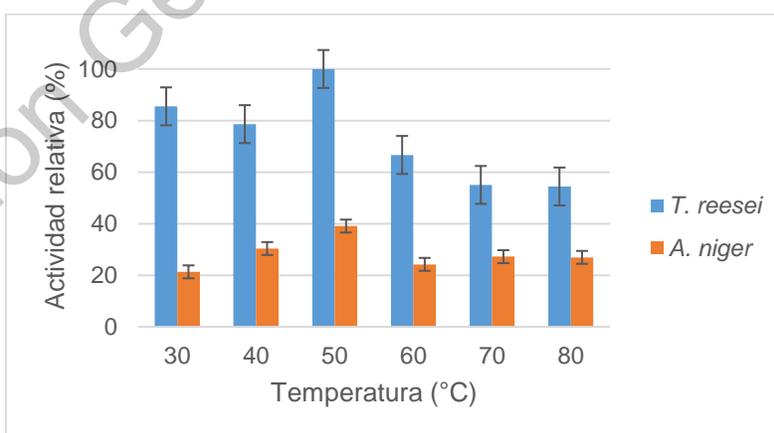


Figura 18. Comparación de la actividad enzimática relativa de *T. reesei* y *A. niger* de lipasa/esterasa a diferentes valores de temperatura.

Tabla 14. Evaluación de actividad de *T. reesei* y *A. niger* de amilasa a diferentes valores de pH.

Trichoderma reesei

T= 60 °C

pH	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3			
5	0.517	0.463	0.477	60.3	53.4	55.2	56.3	±	3.6
6	0.527	0.597	0.533	61.6	70.5	62.3	64.8	±	4.9
7	0.633	0.683	0.667	75.1	81.4	79.4	78.6	±	3.2
8	0.543	0.527	0.557	63.6	61.6	65.4	63.5	±	1.9
9	0.5	0.427	0.473	58.1	48.8	54.7	53.9	±	4.7
10	0.267	0.2	0.223	28.5	19.9	22.9	23.8	±	4.3

Aspergillus niger

T= 60 °C

pH	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3			
5	0.573	0.547	0.583	67.4	64.1	68.7	66.7	±	2.4
6	0.563	0.513	0.57	66.1	59.8	67.0	64.3	±	4.0
7	0.443	0.43	0.473	50.9	49.2	54.7	51.6	±	2.8
8	0.347	0.33	0.32	38.7	36.5	35.2	36.8	±	1.7
9	0.33	0.283	0.277	36.5	30.5	29.7	32.2	±	3.7
10	0.223	0.22	0.237	22.9	22.5	24.7	23.3	±	1.2

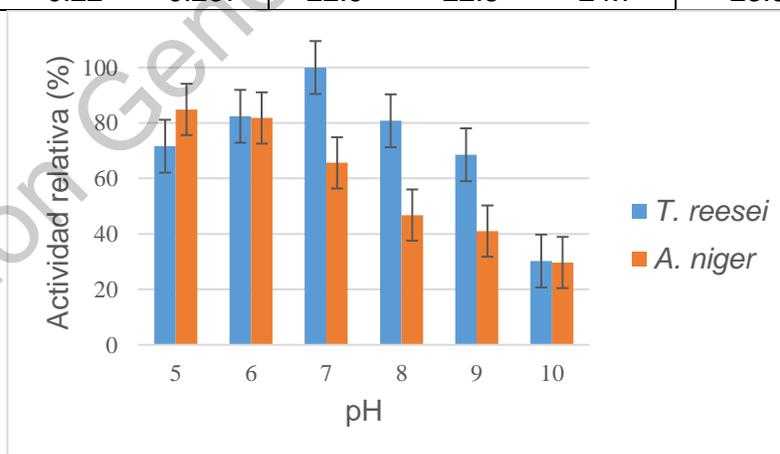


Figura 19. Comparación de la actividad enzimática relativa de *T. reesei* y *A. niger* de amilasa a diferentes valores de pH.

Tabla 15. Evaluación de la actividad de *T. reesei* y *A. niger* de amilasa a diferentes valores de temperatura.

Trichoderma reesei

pH= 7

T (°C)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3			
30	0.423	0.423	0.407	48.3	48.3	46.3	47.6	±	1.2
40	0.52	0.56	0.52	60.7	65.8	60.7	62.4	±	2.9
50	0.533	0.53	0.523	62.3	61.9	61.1	61.8	±	0.7
60	0.663	0.667	0.653	78.9	79.4	77.6	78.6	±	0.9
70	0.69	0.591	0.7	82.3	69.7	83.6	78.5	±	7.7
80	0.627	0.54	0.603	74.3	63.2	71.2	69.6	±	5.7

Aspergillus niger

pH = 5

T (°C)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3			
30	0.47	0.42	0.413	54.3	47.9	47.1	49.8	±	4.0
40	0.473	0.467	0.513	54.7	53.9	59.8	56.1	±	3.2
50	0.547	0.563	0.573	64.1	66.1	67.4	65.9	±	1.7
60	0.54	0.64	0.58	63.2	75.9	68.3	69.2	±	6.4
70	0.573	0.597	0.57	67.4	70.5	67.0	68.3	±	1.9
80	0.467	0.467	0.443	53.9	53.9	50.9	52.9	±	1.8

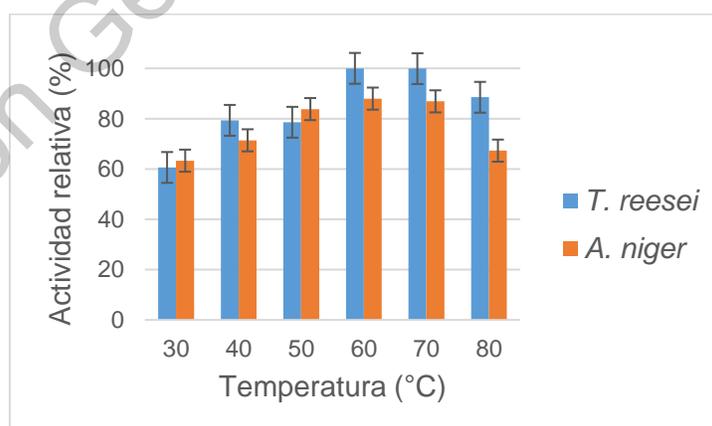


Figura 20. Comparación de la actividad enzimática relativa de *T. reesei* y *A. niger* de amilasa a diferentes valores de temperatura.

Tabla 16. Evaluación de actividad de *T. reesei* y *A. niger* de xilanasa a diferentes valores de pH.

Trichoderma reesei

T= 60 °C

pH	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio	
	1	2	3	1	2	3		
5	0.523	0.493	0.483	61.1	57.2	56.0	58.1	± 2.6
6	0.547	0.557	0.651	64.1	65.4	77.3	68.9	± 7.3
7	0.867	0.79	0.733	104.8	95.0	87.8	95.9	± 8.6
8	0.467	0.543	0.527	53.9	63.6	61.6	59.7	± 5.1
9	0.52	0.44	0.43	60.7	50.5	49.2	53.5	± 6.3
10	0.23	0.23	0.24	23.8	23.8	25.0	24.2	± 0.7

Aspergillus niger

T= 60 °C

pH	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio	
	1	2	3	1	2	3		
5	0.687	0.673	0.65	81.9	80.1	77.2	79.8	± 2.4
6	0.7	0.73	0.72	83.6	87.4	86.1	85.7	± 1.9
7	0.66	0.603	0.647	78.5	71.2	76.8	75.5	± 3.8
8	0.62	0.607	0.61	73.4	71.7	72.1	72.4	± 0.9
9	0.463	0.49	0.443	53.4	56.9	50.9	53.7	± 3.0
10	0.38	0.393	0.3	42.9	44.5	32.7	40.0	± 6.4

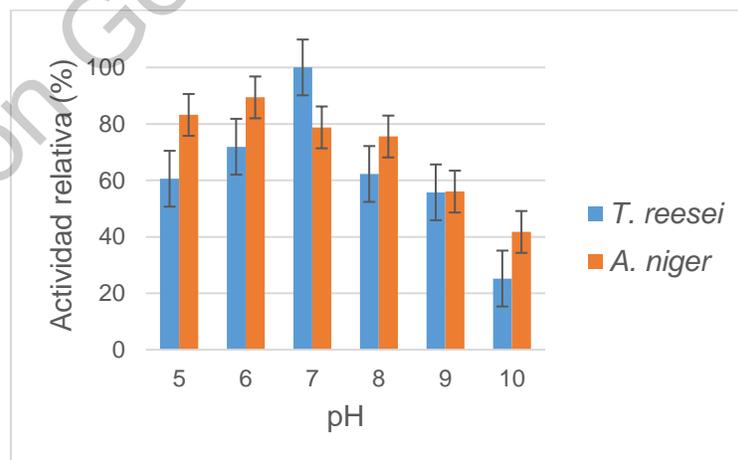


Figura 21. Comparación de la actividad enzimática relativa de *T. reesei* y *A. niger* de xilanasa a diferentes valores de pH.

Tabla 17. Evaluación de la actividad de *T. reesei* y *A. niger* de xilanasas a diferentes valores de temperatura.

Trichoderma reesei

pH= 7

T (°C)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3			
30	0.49	0.523	0.453	56.9	61.1	52.1	56.7	±	4.5
40	0.615	0.625	0.532	72.8	74.0	62.2	69.7	±	6.5
50	0.63	0.707	0.61	74.7	84.5	72.1	77.1	±	6.5
60	0.611	0.648	0.625	72.3	77.0	74.0	74.4	±	2.4
70	0.798	0.848	0.851	96.1	102.4	102.8	100.4	±	3.8
80	0.701	0.621	0.578	83.7	73.5	68.1	75.1	±	7.9

Aspergillus niger

pH = 6

T (°C)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3			
30	0.723	0.79	0.71	86.5	95.0	84.9	88.8	±	5.5
40	0.68	0.783	0.79	81.0	94.1	95.0	90.1	±	7.8
50	0.673	0.663	0.673	80.1	78.9	80.1	79.7	±	0.7
60	0.687	0.77	0.703	81.9	92.5	84.0	86.1	±	5.6
70	0.703	0.613	0.703	84.0	72.5	84.0	80.1	±	6.6
80	0.607	0.613	0.557	71.7	72.5	65.4	69.9	±	3.9

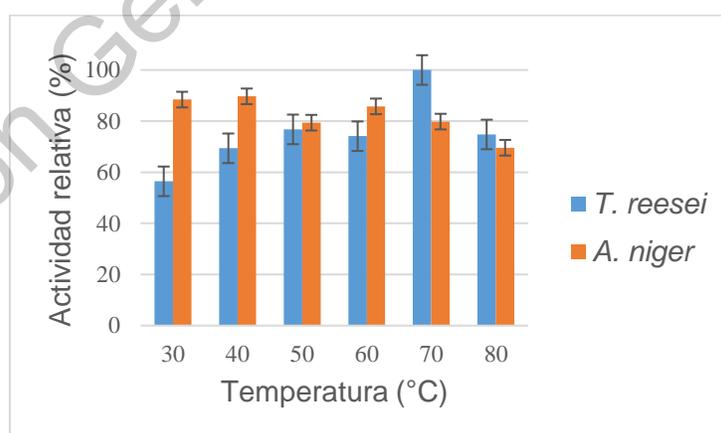


Figura 22. Comparación de la actividad enzimática relativa de *T. reesei* y *A. niger* de xilanasas a diferentes valores de temperatura.

Tabla 18. Evaluación de la actividad de *T. reesei* y *A. niger* de celulasa a diferentes valores de pH.

Trichoderma reesei

T= 60 °C

pH	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3			
5	0.19	0.193	0.17	3.1	3.2	2.7	3.0	±	0.3
6	0.12	0.12	0.13	1.6	1.6	1.8	1.7	±	0.1
7	0.319	0.296	0.272	5.8	5.4	4.8	5.3	±	0.5
8	0.242	0.229	0.216	4.2	3.9	3.7	3.9	±	0.3
9	0.27	0.243	0.27	4.8	4.2	4.8	4.6	±	0.3
10	0.297	0.267	0.28	5.4	4.7	5.0	5.0	±	0.3

Aspergillus niger

T= 60 °C

pH	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3			
5	0.367	0.393	0.387	6.9	7.4	7.3	7.2	±	0.3
6	0.338	0.305	0.351	6.2	5.5	6.5	6.1	±	0.5
7	0.433	0.417	0.487	8.3	7.9	9.4	8.5	±	0.8
8	0.337	0.36	0.297	6.2	6.7	5.4	6.1	±	0.7
9	0.363	0.393	0.333	6.8	7.4	6.1	6.8	±	0.6
10	0.253	0.257	0.277	4.4	4.5	5.0	4.6	±	0.3

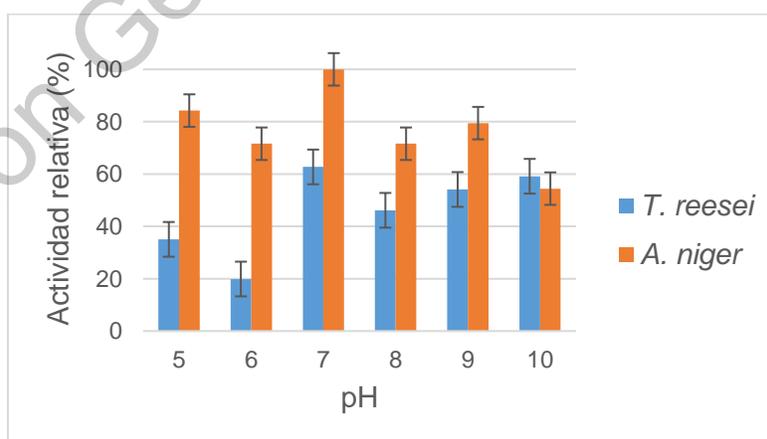


Figura 23. Comparación de la actividad enzimática relativa de *T. reesei* y *A. niger* de celulasa a diferentes valores de pH.

Tabla 19. Evaluación de la actividad de *T. reesei* y *A. niger* de celulasa a diferentes valores de temperatura.

Trichoderma reesei

pH= 7

T (°C)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3			
30	0.089	0.109	0.094	1.0	1.4	1.1	1.1	±	0.2
40	0.387	0.38	0.36	7.3	7.1	6.7	7.0	±	0.3
50	0.222	0.256	0.269	3.8	4.5	4.8	4.4	±	0.5
60	0.383	0.42	0.403	7.2	8.0	7.6	7.6	±	0.4
70	0.17	0.19	0.14	2.7	3.1	2.0	2.6	±	0.5
80	0.31	0.397	0.297	5.7	7.5	5.4	6.2	±	1.2

Aspergillus niger

pH = 7

T (°C)	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3			
30	0.33	0.33	0.33	6.1	6.1	6.1	6.1	±	0.0
40	0.22	0.233	0.277	3.7	4.0	5.0	4.2	±	0.6
50	0.623	0.553	0.593	12.3	10.8	11.7	11.6	±	0.7
60	0.433	0.37	0.413	8.3	6.9	7.8	7.7	±	0.7
70	0.277	0.293	0.263	5.0	5.3	4.7	5.0	±	0.3
80	0.343	0.327	0.347	6.4	6.0	6.4	6.3	±	0.2

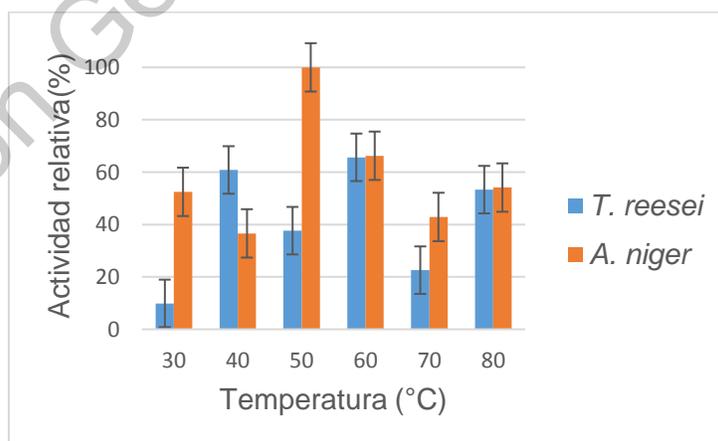


Figura 24. Comparación de la actividad enzimática relativa de *T. reesei* y *A. niger* de celulasa a diferentes valores de temperatura.

Tabla 20. Condiciones de reacción en donde se obtuvieron los resultados máximos de actividad del extracto crudo de *T. reesei*.

Máximos valores obtenidos para el extracto de <i>Trichoderma reesei</i>			
Evaluación de actividad	U/mg	pH	T (°C)
Esterasa/Lipasa	1.1 ± 0.1	9	50
Amilasa	78.6 ± 0.9	7	60
Xilanasa	100.4 ± 3.8	7	70
Celulasa	7.6 ± 0.4	7	60

Tabla 21. Condiciones de reacción en donde se obtuvieron los resultados máximos de actividad del extracto crudo de *A. niger*.

Máximos valores obtenidos para el extracto de <i>Aspergillus niger</i>			
Evaluación de actividad	U/mg	pH	T (°C)
Esterasa/Lipasa	0.5 ± 0.01	7	50
Amilasa	69.2 ± 6.4	5	60
Xilanasa	90.1 ± 7.8	6	40
Celulasa	11.6 ± 0.7	7	50

Como se muestra en las Tablas 20-21, *T. reesei* obtuvo un valor máximo de actividad para lipasa/esterasa cuando el valor del pH fue 9 y la temperatura fue de 50 °C, obteniendo un valor de 1.1 ± 0.1 U/mg. Qin et al. (2012) obtuvieron el valor máximo de actividad para la lipasa de 40.5 ± 2.4 U/mg a 45 °C a un pH 9 utilizando como sustrato aceite de oliva. Para el caso de *A. niger*, el valor máximo de actividad para lipasa/esterasa fue de 0.5 ± 0.01 U/mg cuando el valor del pH fue 7 a 50 °C. Utami et al. (2017) obtuvieron un valor máximo de actividad de lipasa de 38.6 U/g (donde una unidad de actividad de lipasa se expresó como el número de ácidos grasos formados por 5 gramos de triglicéridos en 5 minutos). Comparando las actividades de ambos extractos, el extracto de *T. reesei* mostró 55.55 % más actividad de lipasa y esterasa que el extracto de *A. niger*. Los valores de actividad de los extractos obtenidos muestran que la actividad de lipasa y esterasa para *A. niger* son estables a los valores de pH 5 a 10 y a un rango de temperatura de 30 a 80 °C. Mientras para los valores de actividad obtenidos para *T. reesei*, hubo variaciones en las actividades a los valores de temperatura y pH medidos. Zhang et al. (2017) encontraron la actividad óptima de esterasa termofílica purificada a un pH 9 a 50 °C. La baja actividad de lipasa y esterasa fue debido a la baja cantidad de moléculas de ésteres y lípidos presentes en la pasta de cartón reciclado. Para poder acelerar la actividad de estas enzimas, se sugiere agregar lípidos y ésteres tales como el aceite de coco.

Las actividades de amilasa, para el extracto de *T. reesei* el valor máximo obtenido de actividad fue de 78.6 ± 0.9 U/mg a un pH de 7 a 60 °C. Los resultados de actividades no están en el rango de actividad óptima reportada por los autores Kumar y Satyanarayana, (2009). La actividad máxima de amilasa de *A. niger* fue de 69.2 ± 6.4 U/mg a un pH de 5 a 60 °C. Los valores óptimos de operación obtenidos coinciden en el rango con los reportados BRENDA por Polakovič y Bryjak (2004). El extracto de *T. reesei* mostró 11.9 % más actividad de amilasa comparado con el valor máximo obtenido del extracto de *A. niger*. La actividad de amilasa para ambos disminuyó cuando la temperatura aumentó en el intervalo de 30 a 80 °C; así mismo, cuando incremento el pH, los extractos de *T. reesei* y *A. niger* disminuyeron su

actividad. La actividad de amilasa se debió a que hay moléculas de almidón abundantes en la pasta del cartón reciclado.

Para el caso de las actividades de xilanasas, el valor máximo obtenido por el extracto de *T. reesei* fue de 100.4 ± 3.8 U/mg a un pH de 7 a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que para el extracto de *A. niger*, fueron 90.1 ± 7.8 U/mg a un pH de 6 a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Florencio et al. (2016) cuantificó la actividad máxima de xilanasas a un pH de 4.5 a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *T. reesei* y *A. niger*, y obtuvieron valores de 18.3 ± 0.3 U/mL y 26.4 ± 2.1 respectivamente, usando bagazo de caña de azúcar como sustrato. Comparando la máxima actividad cuantificada de los extractos obtenidos, *T. reesei* mostró 10.1 % mayor actividad al extracto de *A. niger*. Para ambos extractos, los valores de actividad disminuyeron cuando el pH aumentó en el rango de 5 a 10. Para la evaluación de temperatura, los valores de actividad obtenidos de xilanasas fueron estables en el rango de 30 a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los valores de actividad obtenidos para ambos casos se deben a la abundante presencia de moléculas de xilano en la pasta del papel reciclado.

Mientras que, para la actividad de la celulasa, se obtuvo un valor máximo de 7.6 ± 0.4 U/mg a un pH de 7 a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, y de 11.6 ± 0.7 U/mg a un pH de 7 a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *T. reesei* y *A. niger* respectivamente. Realizando la comparación entre los valores de actividad obtenida de los extractos, *A. niger* mostró 34.48 % mayor actividad de celulasa comparado con el extracto de *T. reesei*. Los valores de las actividades para ambos extractos fueron variables en el rango de pH 5 a 10; mientras que las variaciones de la actividad en el rango de temperatura de 30 a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron mayores. Cianchetta et al. (2012) obtuvieron un valor máximo de actividad de celulasa de *T. reesei* de 0.33 ± 0.03 FPU/mL a un pH de 6.3 a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando zacate como sustrato.

7.3 Determinación de la mezcla óptima de extractos

Tabla 22. Resultados del programa estadístico para obtener la mezcla óptima de extractos.

Coefficientes estimados de regresión para lipasa y esterasa

Término	Coefficiente	C.D.E.	T	P	VIF
<i>Trichoderma reesei</i>	0.448	0.015	***	***	1.16
<i>Aspergillus niger</i>	0.379	0.015	***	***	1.16
Mezcla <i>T. reesei</i> & <i>A. niger</i>	-0.098	0.072	-1.35	0.189	2.42
Temperatura <i>T. reesei</i>	0.035	0.015	2.24	0.035	1.66
Temperatura <i>A. niger</i>	0.038	0.015	2.41	0.024	1.66
M. <i>T. r.</i> & <i>A. n.</i> & Temperatura	-0.075	0.072	-1.04	0.31	2.42

S=	0.041
R-Sq=	52.32 %

Press=	0.061	R-Sq(adj)=	42.39 %
R-Sq(pr)=	28.93 %		

Análisis de varianza para lipasa y esterasa (proporción de componentes)

Fuente	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regresión	5	0.045	0.045	0.009	5.27	0.002
Sólo componente						
Linear	1	0.017	0.017	0.017	10.11	0.004
Cuadrática	1	0.003	0.003	0.003	1.83	0.189
<i>T. r.</i> & <i>A. n.</i>	1	0.003	0.003	0.003	1.83	0.189
Comp*Temperatura						
Linear	2	0.022	0.017	0.008	4.93	0.016
<i>T. r.</i> & Temperatura	1	0.014	0.008	0.008	5	0.035
<i>A. n.</i> & Temp.	1	0.008	0.01	0.01	5.8	0.024
Cuadrática	1	0.001	0.001	0.001	1.08	0.31
<i>T. r.</i> & <i>A. n.</i> & Tem.	1	0.001	0.001	0.001	1.08	0.31
Error residual	24	0.041	0.041	0.001		
Falta de encaje	4	0.027	0.027	0.006	9.71	0
Error puro	20	0.014	0.014	0		
TOTAL	29	0.086				

Observaciones inusuales

Obs	Orden S	L/E	Encaje	Encaje SE	Residual	St residual
23	14	0.3	0.39	0.15	-0.09	- 2.33R

R denota un gran valor de estandarización residual

Coeficientes estimados de regresión para amilasa

Término	Coeficiente	C.D.E.	T	P	VIF
<i>Trichoderma reesei</i>	0.04	0.02	*	*	1.66
<i>Aspergillus niger</i>	0.346	0.02	*	*	1.66
Mezcla <i>T. reesei</i> & <i>A. niger</i>	0.43	0.091	4.72	0	2.42
Temperatura <i>T. reesei</i>	0.01	0.02	0.52	0.606	1.66
Temperatura <i>A. niger</i>	-0.065	0.02	-3.25	0.003	1.66
M. <i>T. r.</i> & <i>A. n.</i> & Temperatura	-0.02	0.091	-0.22	0.825	2.42

S=	0.052
R-Sq=	64.91 %

Press=	0.095	R-Sq(adj)=	57.60 %
R-Sq(pr)=	48.96 %		

Análisis de varianza para amilasa (proporción de componentes)

Fuente	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regresión	5	0.12	0.12	0.12	8.88	0
Sólo componente						
Linear	1	0.011	0.011	0.011	4.29	0.049
Cuadrática	1	0.06	0.06	0.06	22.32	0
<i>T. r.</i> & <i>A. n.</i>	1	0.06	0.06	0.06	22.32	0
Comp*Temperatura						
Linear	2	0.048	0.03	0.03	5.64	0.01
<i>T. r.</i> & Temperatura	1	0.002	0	0	0.27	0.606
<i>A. n.</i> & Temp.	1	0.045	0.028	0.028	10.57	0.003
Cuadrática	1	0	0	0	0.05	0.825
<i>T. r.</i> & <i>A. n.</i> & Tem.	1	0	0	0	0.05	0.825
Error residual	24	0.065	0.065	0.002		
Falta de encaje	4	0.055	0.055	0.013	27.98	0
Error puro	20	0.009	0.009	0		
TOTAL	29	0.186				

Observaciones inusuales

Obs	Orden S	A	Encaje	Encaje SE	Residual	St residual
5	20	0.5	0.391	0.018	0.106	2.17R
19	25	0.5	0.391	0.018	0.132	2.7R

R denota un gran valor de estandarización residual

Coeficientes estimados de regresión para xilanasa

Término	Coeficiente	C.D.E.	T	P	VIF
<i>Trichoderma reesei</i>	0.418	0.015	*	*	1.66
<i>Aspergillus niger</i>	0.464	0.015	*	*	1.66
Mezcla <i>T. reesei</i> & <i>A. niger</i>	0.267	0.07	3.83	0.001	2.42
Temperatura <i>T. reesei</i>	0.067	0.015	4.41	0	1.66
Temperatura <i>A. niger</i>	0.015	0.015	1.01	0.323	1.66
M. <i>T. r.</i> & <i>A. n.</i> & Temperatura	-0.144	0.07	-2.06	0.05	2.42

S=	0.04
R-Sq=	62.88 %

Press=	0.057	R-Sq(adj)=	55.14 %
R-Sq(pr)=	44.77 %		

Análisis de varianza para xilanasa (proporción de componentes)

Fuente	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regresión	5	0.065	0.065	0.013	8.13	0
Sólo componente						
Linear	1	0.007	0.007	0.007	4.88	0.037
Cuadrática	1	0.023	0.023	0.023	14.6	0.001
<i>T. r.</i> & <i>A. n.</i>	1	0.023	0.023	0.023	14.6	0.001
Comp*Temperatura						
Linear	2	0.027	0.031	0.015	9.9	0.001
<i>T. r.</i> & Temperatura	1	0.027	0.031	0.031	19.45	0
<i>A. n.</i> & Temp.	1	0	0.001	0.001	1.02	0.323
Cuadrática	1	0.006	0.006	0.006	4.25	0.05
<i>T. r.</i> & <i>A. n.</i> & Tem.	1	0.006	0.006	0.006	4.25	0.05
Error residual	24	0.038	0.038	0.001		
Falta de encaje	4	0.024	0.024	0.006	8.64	0
Error puro	20	0.014	0.014	0		
TOTAL	29	0.103				

Observaciones inusuales

Obs	Orden S	X	Encaje	Encaje SE	Residual	St residual
10	29	0.4	0.508	0.014	-0.085	-2.27R

R denota un gran valor de estandarización residual

Coeficientes estimados de regresión para celulasa

Término	Coeficiente	C.D.E.	T	P	VIF
<i>Trichoderma reesei</i>	0.418	0.015	*	*	1.66
<i>Aspergillus niger</i>	0.464	0.015	*	*	1.66
Mezcla <i>T. reesei</i> & <i>A. niger</i>	0.267	0.07	3.83	0.001	2.42
Temperatura <i>T. reesei</i>	0.067	0.015	4.41	0	1.66
Temperatura <i>A. niger</i>	0.015	0.015	1.01	0.323	1.66
M. <i>T. r.</i> & <i>A. n.</i> & Temperatura	-0.144	0.07	-2.06	0.05	2.42

S=	0.04
R-Sq=	62.88 %

Press=	0.057	R-Sq(adj)=	55.14 %
R-Sq(pr)=	44.77 %		

Análisis de varianza para celulasa (proporción de componentes)

Fuente	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regresión	5	0.065	0.065	0.013	8.13	0
Sólo componente						
Linear	1	0.007	0.007	0.007	4.88	0.037
Cuadrática	1	0.023	0.023	0.023	14.64	0.001
<i>T. r.</i> & <i>A. n.</i>	1	0.023	0.023	0.023	14.64	0.001
Comp*Temperatura						
Linear	2	0.027	0.031	0.015	9.9	0.001
<i>T. r.</i> & Temperatura	1	0.027	0.031	0.031	19.45	0
<i>A. n.</i> & Temperatura	1	0	0.001	0.001	1.02	0.323
Cuadrática	1	0.006	0.006	0.006	4.25	0.05
<i>T. r.</i> & <i>A. n.</i> & Temp.	1	0.006	0.006	0.006	4.25	0.05
Error residual	24	0.038	0.038	0.001		
Falta de encaje	4	0.024	0.024	0.006	8.64	
Error puro	20	0.014	0.014	0		
TOTAL	29	0.1				

Observaciones inusuales

Obs	Orden S	C	Encaje	Encaje SE	Residual	St residual
10	29	0.4	0.508	0.014	-0.085	-2.27R

R denota un gran valor de estandarización residual

Solución de mezcla óptima global		
Extracto	Fracciones de mezcla óptima	Fracciones ajustadas
<i>T. reesei</i>	0.767	0.75
<i>A. niger</i>	0.232	0.25

Temperatura óptima	45 °C
--------------------	-------

Respuestas predichas de las variables de proceso		
Enzima	Respuesta	Valor atractivo
Lipasa/esterasa	0.437	0.196
Amilasa	0.455	0.221
Xilanasa	0.507	0.296
Celulasa	0.507	0.296
Valor atractivo para la mezcla		0.248

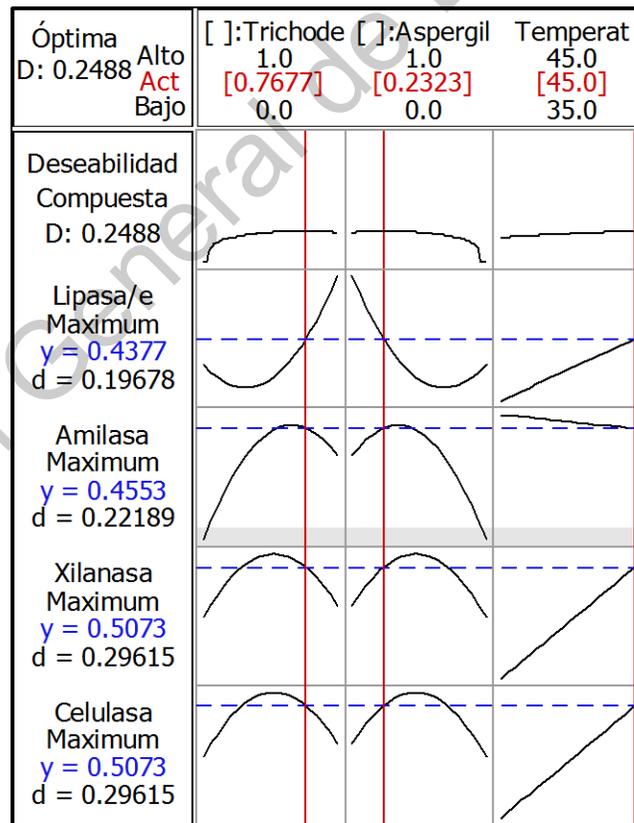


Figura 25. Gráficos de optimización trazados por el simulador.

Para realizar esta evaluación, se fijaron las condiciones las siguientes condiciones de operación: 35 y 45 °C a un pH=7, por el hecho de que son las condiciones normales a las que se encuentra el agua de proceso en las industrias recicladoras de cartón. Para establecer las mezclas a evaluar, se utilizó el método de diseño de mezcla, y los resultados de las mezclas a evaluar se muestran en la Tabla 22. A continuación, en la Figura 24 se muestran los gráficos de optimización de mezcla.

Los resultados del análisis de varianza realizado en el simulador muestran que hay diferencias significativas en los tratamientos aplicados de *T. reesei* y *A. niger*, y estos varían con la temperatura. Como si hay diferencias significativas entre ambos tratamientos y la temperatura es una variable influyente en los resultados de actividad, se procedió a realizar el análisis completo de mezcla óptima, así como las condiciones adecuadas para llevar a cabo la reacción. Para realizar esta evaluación, se fijaron las condiciones las siguientes condiciones de operación: 35 y 45 °C a un pH=7, por el hecho de que son las condiciones normales a las que se encuentra el agua de proceso en las industrias recicladoras de cartón. Para establecer las mezclas a evaluar, se utilizó el método de diseño de mezcla, y los resultados de las mezclas a evaluar se muestran en la Tabla 22. A continuación, en la Figura 24 se muestran los gráficos de optimización de mezcla. El programa arrojó las mezclas a probar, así como la mezcla óptima la cual se aproxima a 77 % de extracto de *T. reesei* y 23 % de extracto de *A. niger*, este resultado se ajustó a la fórmula 1, la cual contiene 75 % y 25 % respectivamente. La temperatura óptima se establece en 45 °C, siendo esta la que calculó el simulador.

Tabla 23. Formulaciones de las mezclas de extractos enzimáticos evaluadas.

Fórmula	Proporciones		Contenido de proteína aproximado por fórmula (mg/mL)
	Extracto <i>Trichoderma reesei</i>	Extracto <i>Aspergillus niger</i>	
1	0.75	0.25	9 ± 0.34
2	0.5	0.5	10.3 ± 0.34
3	0.25	0.75	11.5 ± 0.34
4	0	1	12.7 ± 0.34
5	1	0	7.8 ± 0.34

El contenido de proteína aproximado para cada fórmula se calculó realizando la suma de la multiplicación de la proporción por el total de proteína soluble de cada uno de los extractos como se muestra en la Ecuación 2. FTr es la proporción de *T. reesei*, PTr es el contenido de proteína del extracto de *T. reesei*, Fan es la proporción de *A. niger* y PAn es el contenido de proteína del extracto de *A. niger*.

$$\text{Contenido de proteína aproximado} = FTr * PTr + Fan * PAn \quad (2)$$

Tabla 24. Evaluación de actividad de mezclas de extractos de *T. reesei* y *A. niger* para lipasa/esterasa a las condiciones establecidas.

Evaluación a 35 °C

F	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3		±	
1	0.37	0.3	0.33	0.223	0.177	0.197	0.199	±	0.023
2	0.427	0.44	0.427	0.229	0.237	0.229	0.232	±	0.004
3	0.31	0.363	0.323	0.145	0.172	0.151	0.156	±	0.014
4	0.323	0.363	0.343	0.137	0.155	0.146	0.146	±	0.009
5	0.41	0.453	0.43	0.288	0.321	0.303	0.304	±	0.016

Evaluación a 45 °C

F	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3		±	
1	0.49	0.43	0.473	0.348	0.303	0.336	0.329	±	0.023
2	0.413	0.38	0.38	0.290	0.265	0.265	0.274	±	0.014
3	0.39	0.403	0.393	0.273	0.283	0.275	0.277	±	0.005
4	0.46	0.387	0.427	0.326	0.271	0.301	0.299	±	0.028
5	0.483	0.43	0.503	0.343	0.303	0.358	0.335	±	0.029

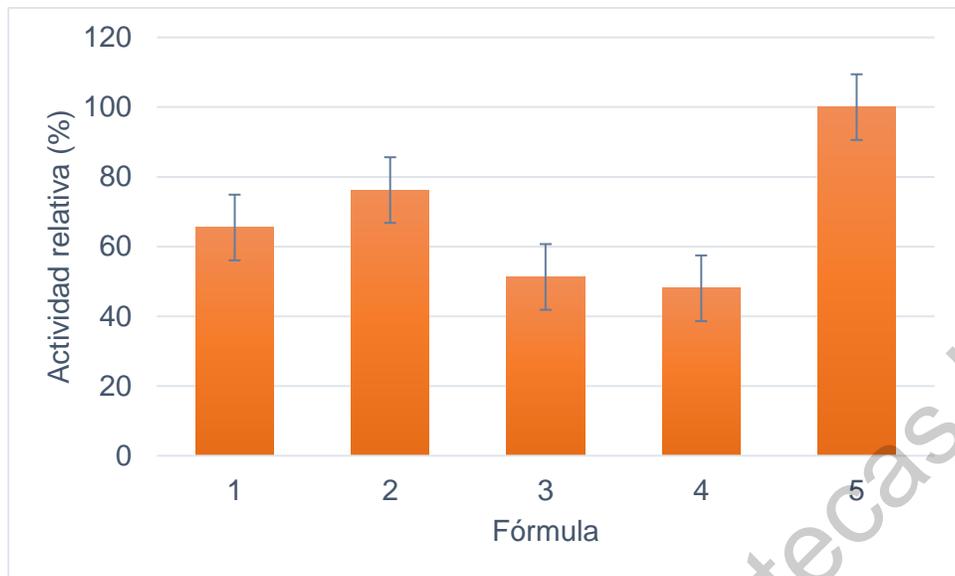


Figura 26. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de *T. reesei* y *A. niger* de lipasa/esterasa a 35 °C a un pH 7.

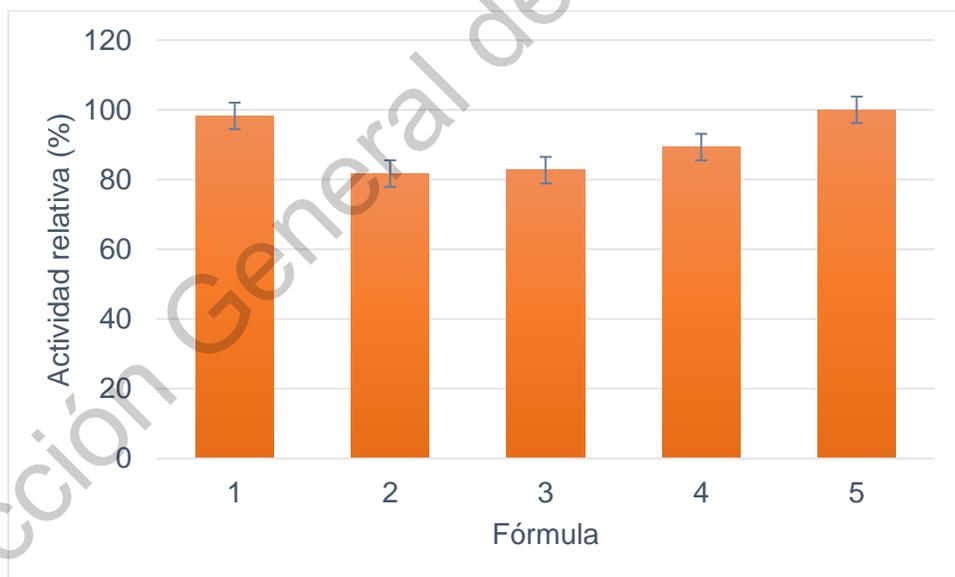


Figura 27. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de *T. reesei* y *A. niger* de lipasa/esterasa a 45 °C a un pH 7.

Tabla 25. Evaluación de actividad de mezclas de extractos de *T. reesei* y *A. niger* para amilasa a las condiciones establecidas.

Evaluación a 35 °C

F	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3		±	
1	0.480	0.497	0.507	48.1	49.9	51.0	49.7	±	1.5
2	0.490	0.520	0.523	43.3	46.2	46.5	45.3	±	1.8
3	0.490	0.457	0.500	38.7	35.8	39.5	38.0	±	1.9
4	0.437	0.433	0.380	30.8	30.5	26.3	29.2	±	2.5
5	0.373	0.397	0.387	42.0	45.0	43.7	43.6	±	1.5

Evaluación a 45 °C

F	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3		±	
1	0.457	0.393	0.417	52.7	44.5	47.6	48.2	±	4.1
2	0.383	0.393	0.41	43.2	44.5	46.7	44.8	±	1.7
3	0.497	0.523	0.473	57.7	61.1	54.7	57.8	±	3.2
4	0.237	0.237	0.237	24.7	24.7	24.7	24.7	±	0.0
5	0.443	0.407	0.467	50.9	46.3	53.9	50.4	±	3.8

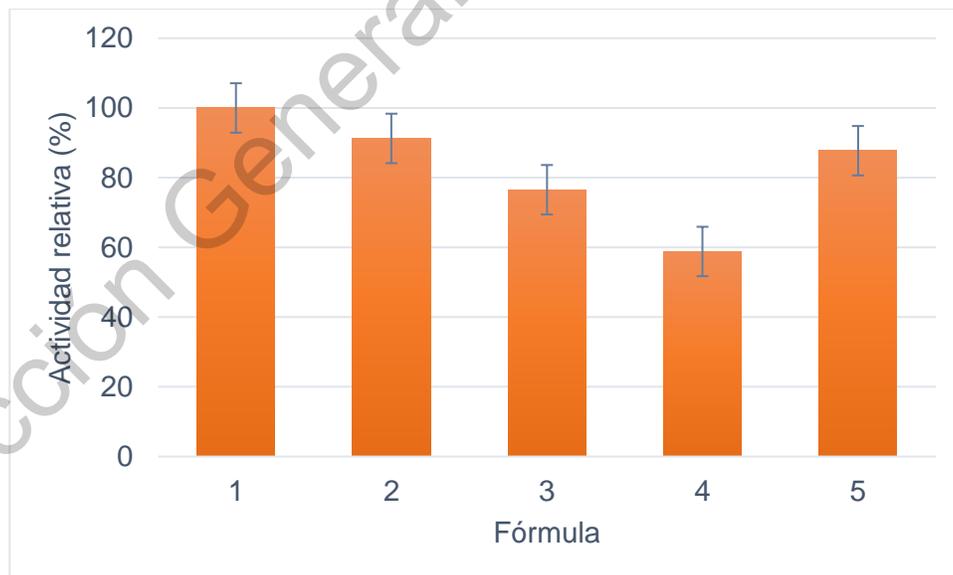


Figura 28. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de *T. reesei* y *A. niger* de amilasa a 35 °C a un pH 7.

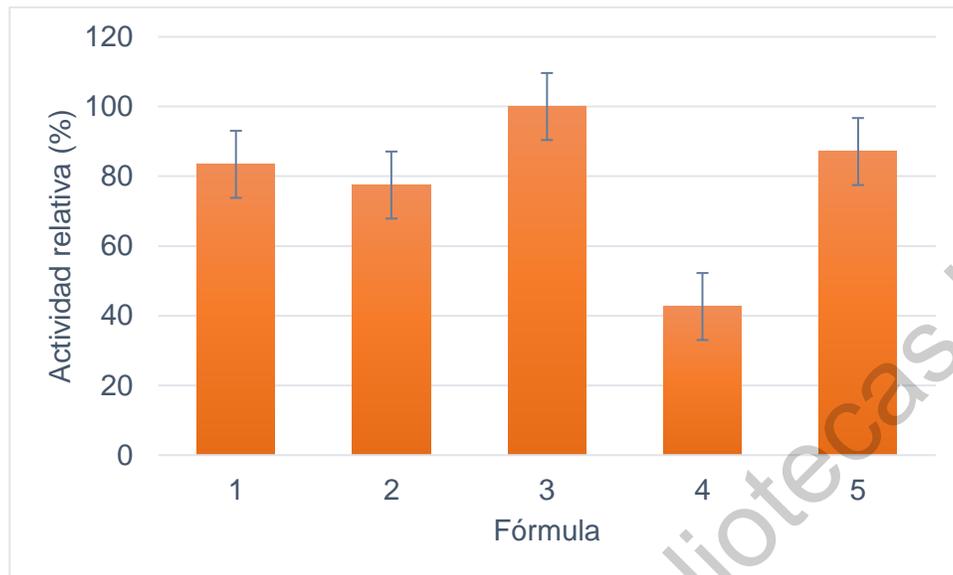


Figura 29. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de *T. reesei* y *A. niger* de amilasa a 45 °C a un pH 7.

Tabla 26. Evaluación de actividad de mezclas de extractos de *T. reesei* y *A. niger* para xilanas a las condiciones establecidas.

Evaluación a 35 °C

F	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3		±	
1	0.407	0.433	0.397	40.0	42.9	38.9	40.6	±	2.0
2	0.490	0.520	0.520	43.3	46.2	46.2	45.2	±	1.7
3	0.533	0.563	0.503	42.4	45.0	39.8	42.4	±	2.6
4	0.400	0.470	0.427	27.9	33.4	30.0	30.4	±	2.8
5	0.363	0.390	0.357	40.7	44.1	39.9	41.6	±	2.2

Evaluación a 45 °C

F	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3		±	
1	0.423	0.497	0.457	48.3	57.7	52.7	52.9	±	4.7
2	0.52	0.533	0.517	60.7	62.3	60.3	61.1	±	1.1
3	0.577	0.5	0.55	67.9	58.1	64.5	63.5	±	5.0
4	0.46	0.43	0.49	53.0	49.2	56.9	53.0	±	3.8
5	0.51	0.5	0.52	59.4	58.1	60.7	59.4	±	1.3

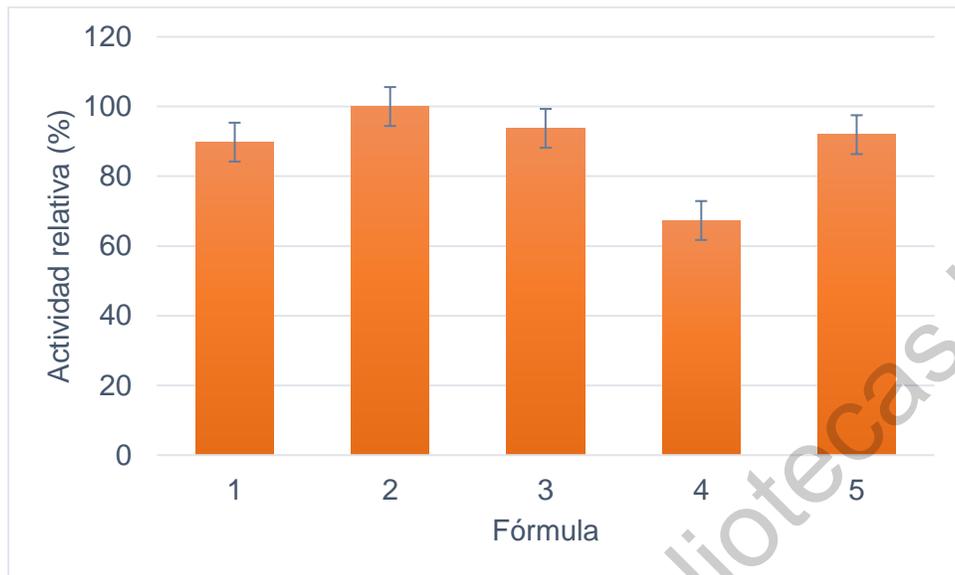


Figura 30. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de *T. reesei* y *A. niger* de xilanasa a 35 °C a un pH 7.

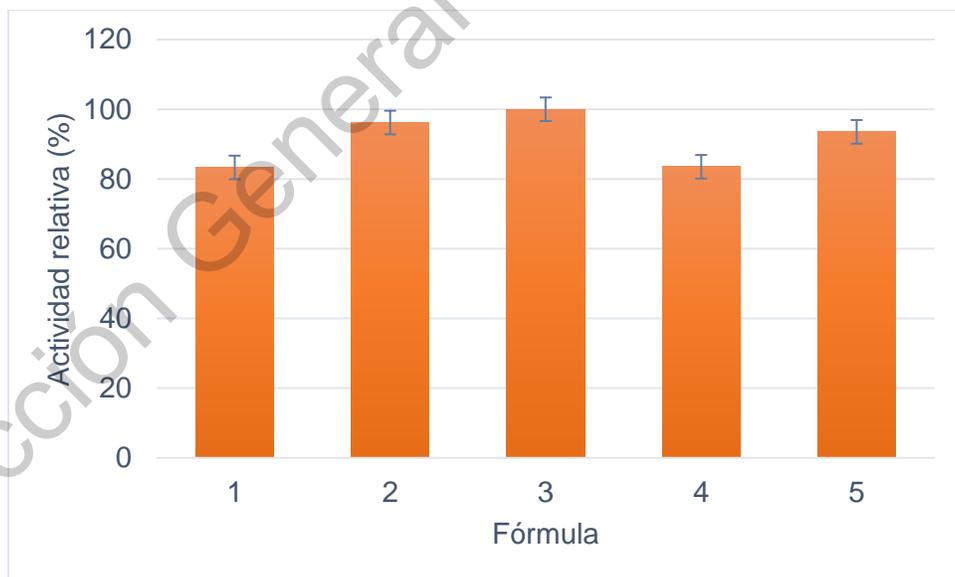


Figura 31. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de *T. reesei* y *A. niger* de xilanasa a 45 °C a un pH 7.

Tabla 27. Evaluación de actividad de mezclas de extractos de *T. reesei* y *A. niger* para celulasa a las condiciones establecidas.

Evaluación a 35 °C

F	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3		±	
1	0.41	0.460	0.427	6.7	7.6	7.0	7.1	±	0.5
2	0.357	0.390	0.363	5.1	5.6	5.2	5.3	±	0.3
3	0.390	0.413	0.377	5.0	5.3	4.8	5.1	±	0.3
4	0.397	0.400	0.403	4.6	4.7	4.7	4.7	±	0.0
5	0.297	0.337	0.307	5.4	6.2	5.6	5.7	±	0.4

Evaluación a 45 °C

F	Absorbancias			U/mg			U/mg promedio		
	1	2	3	1	2	3		±	
1	0.43	0.417	0.37	8.2	7.9	6.9	7.7	±	0.7
2	0.537	0.53	0.467	10.5	10.3	9.0	9.9	±	0.8
3	0.483	0.467	0.453	9.3	9.0	8.7	9.0	±	0.3
4	0.5	0.533	0.487	9.7	10.4	9.4	9.8	±	0.5
5	0.443	0.493	0.538	8.5	9.5	10.5	9.5	±	1.0

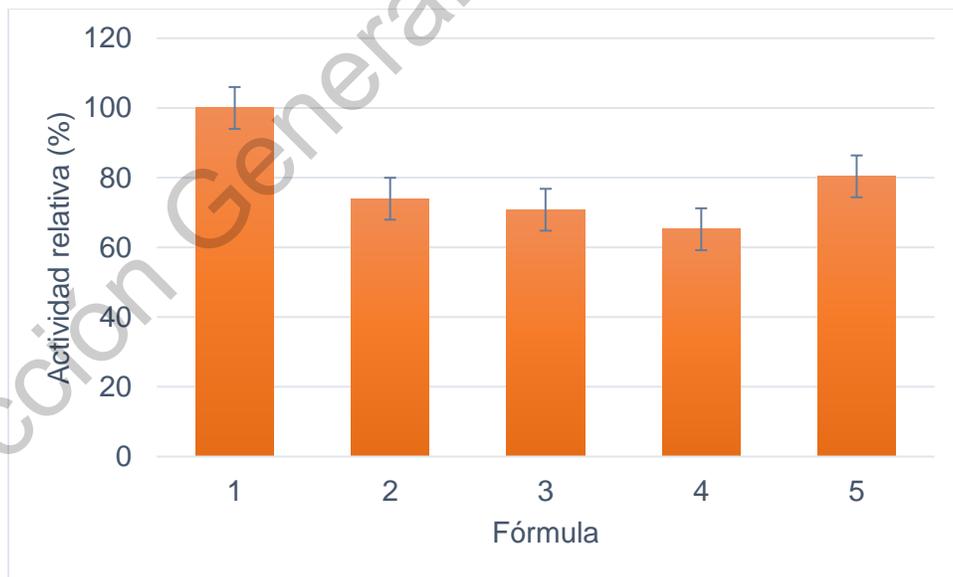


Figura 32. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de *T. reesei* y *A. niger* de celulasa a 35 °C a un pH 7.

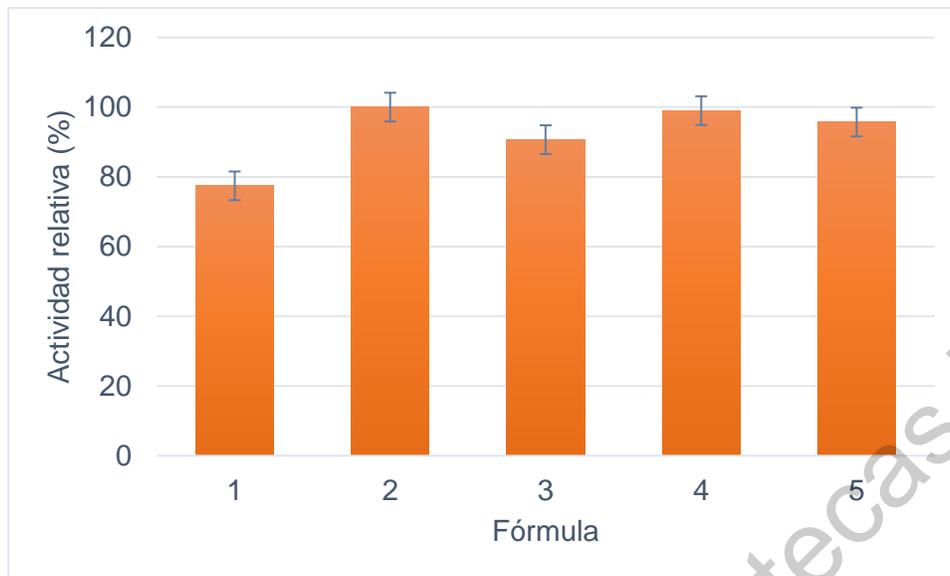


Figura 33. Actividades relativas obtenidas por las fórmulas probadas para la actividad de *T. reesei* y *A. niger* de celulasa a 45 °C a un pH 7.

Tabla 28. Resultados de actividad máxima de las mezclas de extractos de *T. reesei* y *A. niger* a un pH de 7 a 35 °C.

Resultados de actividad máximos de mezclas de extractos de <i>Trichiderma reesei</i> y <i>Aspergillus niger</i>		
Evaluación	U/mg	Fórmula
Esterasa/Lipasa	0.3 ± 0.016	5
Amilasa	49.7 ± 1.5	1
Xilanasas	45.2 ± 1.7	2
Celulasa	7.1 ± 0.5	1

Tabla 29. Resultados de actividad máxima de las mezclas de extractos de *T. reesei* y *A. niger* a un pH de 7 a 45 °C.

Resultados de actividad máximos de mezclas de extractos de <i>Trichiderma reesei</i> y <i>Aspergillus niger</i>		
Evaluación	U/mg	Fórmula
Esterasa/Lipasa	0.335 ± 0.029	5
Amilasa	57.8 ± 3.2	3
Xilanasa	63.5 ± 5.0	3
Celulasa	9.9 ± 0.8	2

Como se puede observar en los resultados máximos obtenidos, la actividad para lipasa/esterasa es mejor cuando se utiliza solamente el extracto de *T. reesei* (fórmula 5) a 45 °C. Mientras que las actividades de amilasa y xilanasa fueron máximas a 45 °C cuando se aplicó la fórmula 3 para ambos casos. La actividad de celulasa mostró valor máximo cuando la fórmula 2 fue a 45 °C.

Analizando los valores de actividad de la mezclas de los extractos de *T. reesei* y *A. niger* obtenidos para la lipasa/esterasa a 35 y 45 °C, se puede decir que la mejor fórmula es la 5, obteniendo máximos valores de actividad para ambas evaluaciones. El valor de actividad obtenido de la fórmula 5 a 35 °C es 10 % menor la actividad a 45 °C, siendo las actividades calculadas 0.304 ± 0.016 y 0.335 ± 0.029 U/mg respectivamente. Además, la evaluación muestra que hay un mejor desempeño en la actividad de la lipasa/esterasa cuando no se mezcla el extracto de *T. reesei* a 35 °C. Mientras que a 45 °C, la actividad mostrada por la fórmula 1 (óptima) se aproxima al valor de la fórmula 5, siendo 0.329 ± 0.023 y 0.335 ± 0.029 U/mg respectivamente. La actividad de la mezcla de extractos óptima (fórmula 1)

aumentó cuando se incrementó la temperatura; pero no superó a la actividad de la fórmula 5.

Los valores máximos de actividad calculados para la amilasa, a 35 °C los fueron dados por las fórmulas 1 y 2, siendo 49.7 ± 1.5 U/mg y 45.3 ± 1.8 U/mg respectivamente. A 35 °C, la actividad aumentó cuando se mezclaron los extractos y se iba incrementando la concentración del extracto de *T. reesei*. Así mismo, se obtuvo un valor considerable de actividad cuando sólo se aplicó este extracto, siendo de 43.6 ± 1.5 U/mg. Además, la actividad se vió afectada cuando se incrementó la concentración del extracto de *A. niger* en las fórmulas. A 45 °C, la actividad de la fórmula 1 permaneció similar, dando 48.2 ± 4.1 U/mg, pero en esta ocasión, no fue máxima. La fórmula 3 (50 % de ambos extractos) superó en más de 10 % a la segunda actividad mayor obtenida (fórmula 5), siendo 57.8 ± 3.2 y 50.4 ± 3.8 respectivamente y en un 16.6 % al valor de la actividad de la fórmula 1. Para este caso, la actividad de la fórmula 3 y la fórmula 5 se vio beneficiada por el aumento de la temperatura, mientras que para las fórmulas 2 y 4, sucedió lo contrario.

Las actividades obtenidas de xilanasas aumentaron cuando la temperatura se incrementó para todas las fórmulas. A 35 °C, los valores máximos fueron exhibidos por las fórmulas 2, 3 y 5, dando 45.2 ± 1.7 , 42.4 ± 2.6 y 41.6 ± 2.2 U/mg respectivamente. El valor de actividad de la fórmula 2 excede en más del 10 % al que mostró la fórmula 1 (40.6 ± 2.0 U/mg). Mientras que a 45 °C, los valores máximos de actividad fueron dados por las fórmulas 2, 3 y 5, siendo 61.1 ± 1.1 , 63.5 ± 5 y 59.4 ± 1.3 U/mg respectivamente. El valor máximo mostrado por la fórmula 3 excede en más del 15 % al valor de la actividad calculado para la fórmula 1.

En la evaluación de la actividad de la celulasa, todas las actividades aumentaron cuando se incrementó la temperatura, en excepción a la fórmula 1, el resultado del tratamiento para ambas evaluaciones fue similar, siendo de 7.1 ± 0.5 y 7.7 ± 0.7 U/mg respectivamente. En la evaluación a 35 °C, el valor de la actividad de la fórmula 1 fue máximo, pero a 45 °C, los valores máximos fueron obtenidos por las fórmulas 2, 4 y 5 (aunque el valor de la fórmula 3 sea considerable, de 9.0 ± 0.3

U/mg) siendo 9.9 ± 0.8 , 9.8 ± 0.5 y 9.5 ± 1.0 U/mg respectivamente. Para la evaluación a 45 °C, el valor máximo de actividad fue mostrado por la fórmula 2, excediendo en más del 20 % a la actividad de la fórmula 1.

La mezcla óptima calculada por el simulador indica que (ajustada a 75 % de extracto de *T. reesei* y 25 % de extracto de *A. niger*), resultó ser la mejor cuando se evaluó la actividad de amilasa y celulasa a 35 °C. La actividad de la fórmula 1 aumento al incremento la temperatura para el caso de las actividades de lipasa/esterasa, amilasa y xilanasa, pero para el caso de la actividad de la celulasa y amilasa, los valores de actividad permanecieron similares.

Amaro-Reyes et al. (2016) calcularon la actividad de amilasa y xilanasa de un co-cultivo de *T. reesei* y *A. niger*, en la cual, sólo la actividad de amilasa de *A. niger* aumentó cuando se trabajó en co-cultivo con *T. reesei*. Para evaluar a la actividad de la xilanasa, el co-cultivo no fue la mejor alternativa ya que las actividades más altas las obtuvieron con el monocultivo o extracto enzimático de *T. reesei*. Florencio et al. (2016), al mezclar extractos enzimáticos de *A. niger* y *T. reesei*, lograron aumentar la actividad de celulasa para la degradación de bagazo de caña hasta 15 veces más.

7.4. Aplicación de los extractos al agua de proceso.

Para todas las evaluaciones, los resultados no fueron satisfactorios debido al bajo porcentaje de remoción de stickies presentes en el agua. A continuación, se muestran los resultados de las evaluaciones a 45 °C.

Tabla 30. Resultados de la aplicación de los extractos y su efecto en la remoción de stickies.

Tiempo de evaluación 24 horas

Fórmula	# de Stickies antes	# de Stickies después	% de remoción
<i>A. niger</i>	23.0 ± 1.41	20.8 ± 1.26	10.84
<i>T. reesei</i>	32.3 ± 2.50	30.5 ± 1.29	5.74
Fórmula 3	28.5 ± 1.29	26.3 ± 1.26	8.57

Tiempo de evaluación 2 horas

Fórmula	# de Stickies antes	# de Stickies después	% de remoción
<i>A. niger</i>	21.8 ± 0.96	19.8 ± 0.96	10.13
<i>T. reesei</i>	21.0 ± 0.82	19.3 ± 0.50	9.09
Fórmula 3	27.5 ± 1.29	25.5 ± 1.29	7.84

Tiempo de evaluación 5 horas

Fórmula	# de Stickies antes	# de Stickies después	% de remoción
<i>A. niger</i>	36.5 ± 1.29	34.0 ± 0.82	7.35
<i>T. reesei</i>	32.3 ± 2.22	30.5 ± 1.29	5.74
Fórmula 3	36.3 ± 1.71	34.3 ± 1.26	5.84

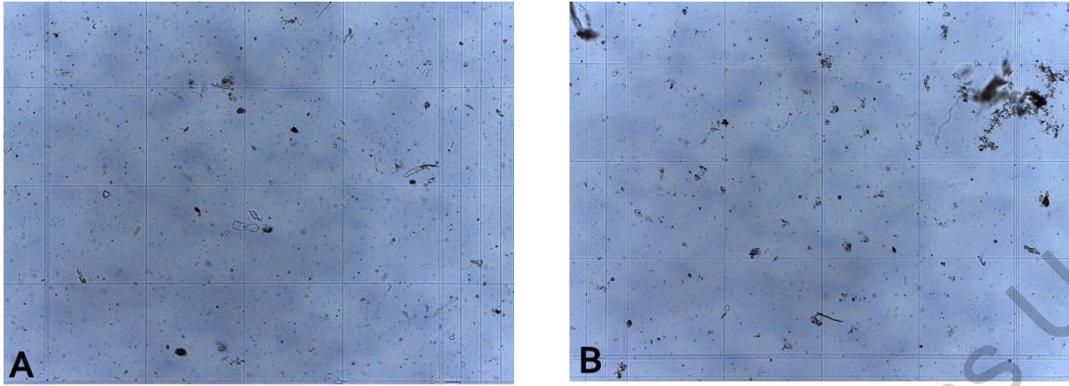
Tiempo de evaluación 7 horas

Fórmula	# de Stickies antes	# de Stickies después	% de remoción
<i>A. niger</i>	37.8 ± 1.50	34.3 ± 0.96	10.22
<i>T. reesei</i>	32.8 ± 1.26	29.5 ± 1.29	11.02
Fórmula 3	32.5 ± 1.29	29.5 ± 0.58	10.17

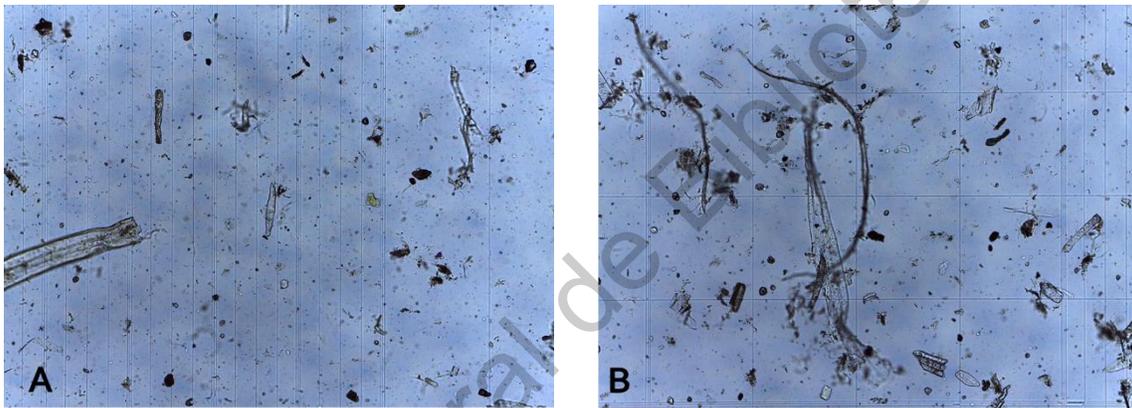
Tiempo de evaluación 5 horas

Fórmula	# de Stickies antes	# de Stickies después	% de remoción
<i>Citriczyme</i>	28.3 ± 0.96	18.3 ± 1.71	54.79

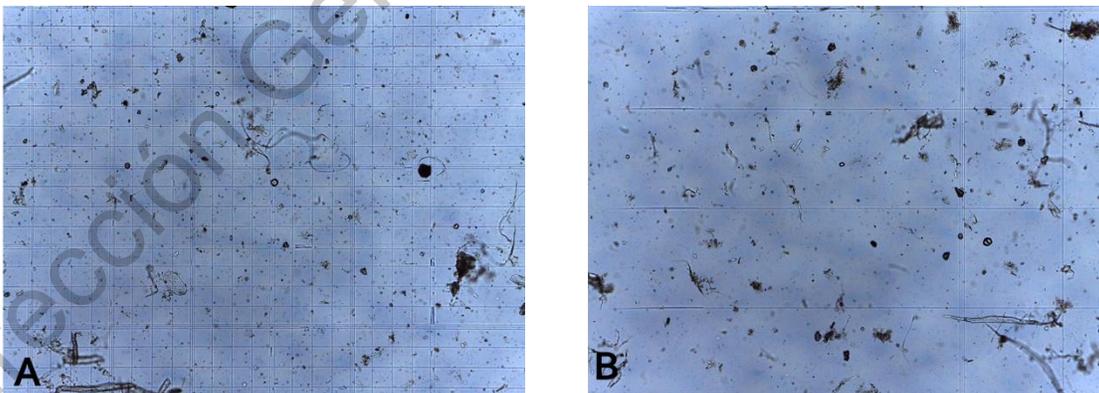
Aspergillus niger



Trichoderma reesei

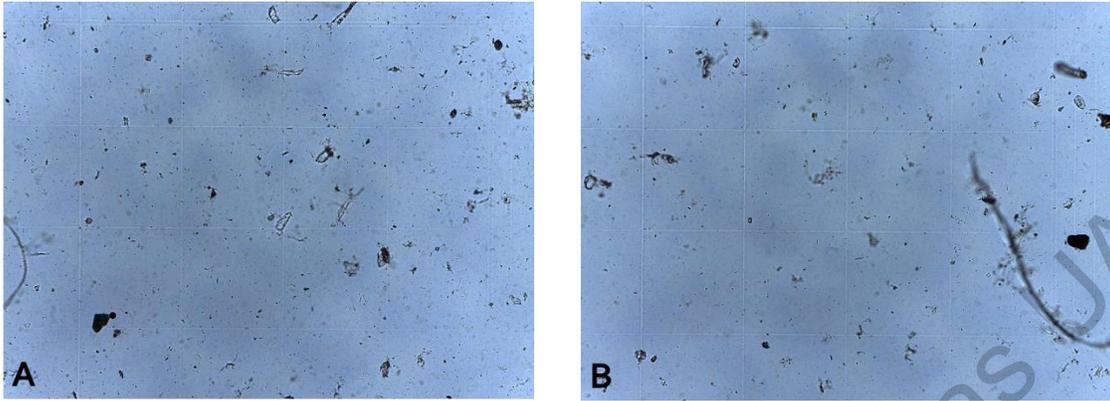


Fórmula 3

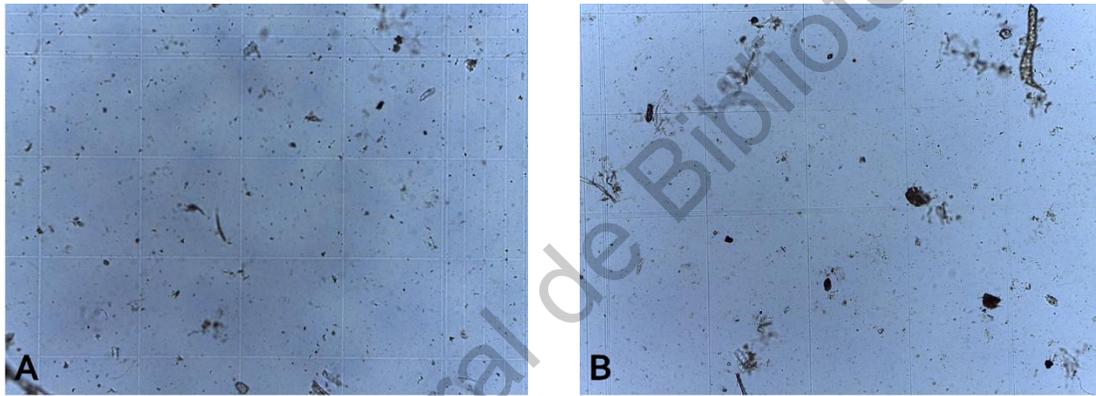


Figuras 34. Tratamiento de 24 horas. A: Imagen del agua antes del tratamiento.
B: imagen del agua después del tratamiento.

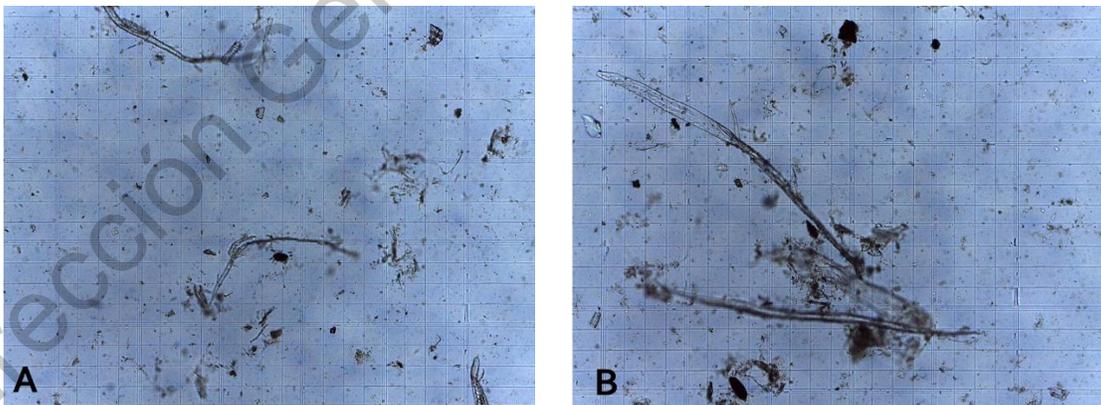
Aspergillus niger



Trichoderma reesei

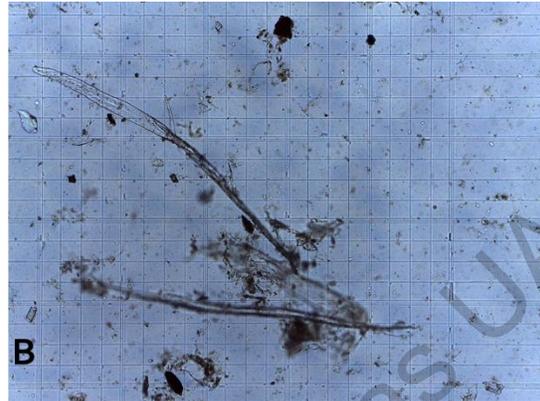
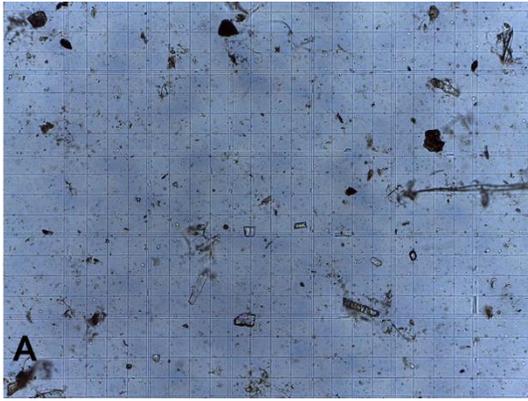


Fórmula 3

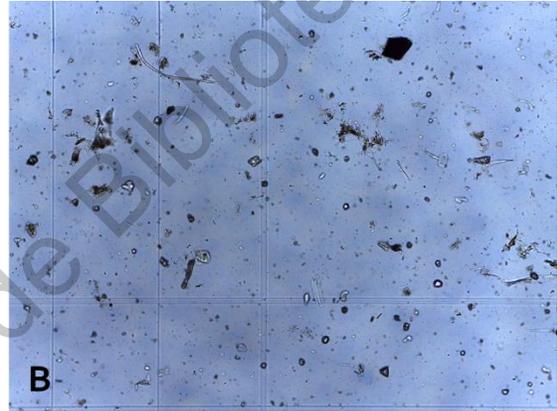


Figuras 35. Tratamiento de 2 horas. A: Imagen del agua antes del tratamiento.
B: imagen del agua después del tratamiento

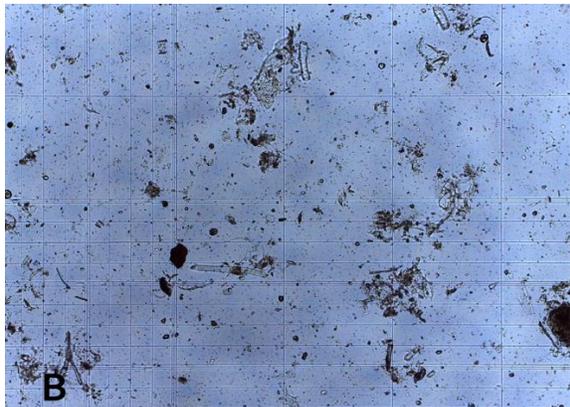
Aspergillus niger



Trichoderma reesei

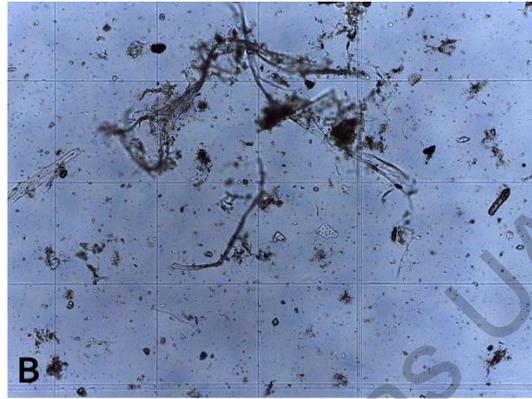
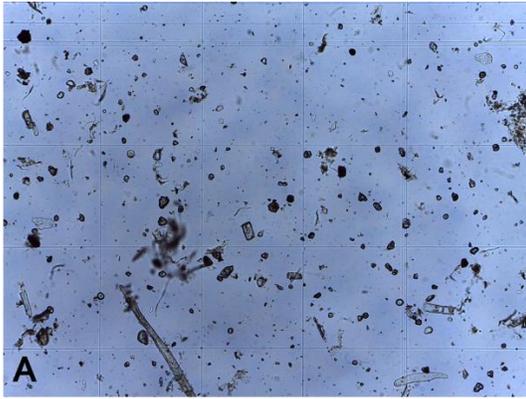


Fórmula 3

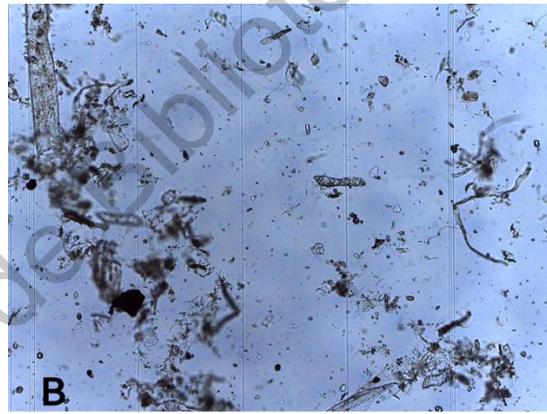
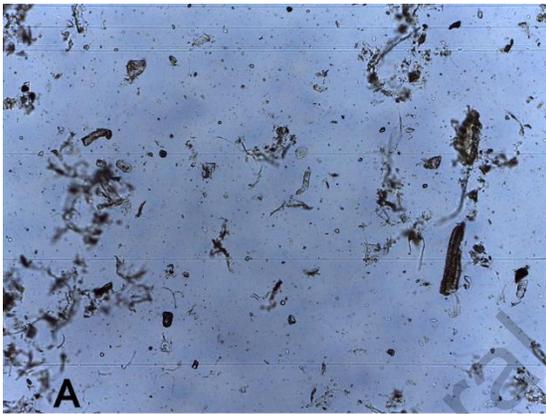


Figuras 36. Tratamiento de 5 horas. A: Imagen del agua antes del tratamiento.
B: imagen del agua después del tratamiento.

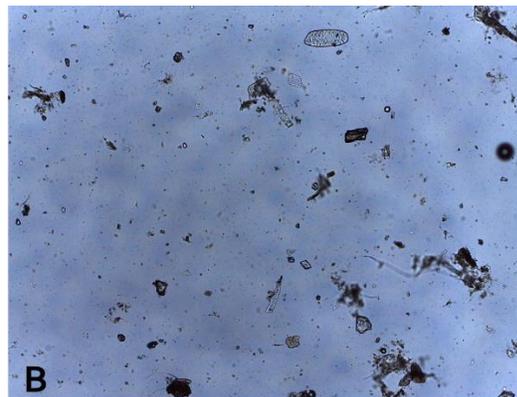
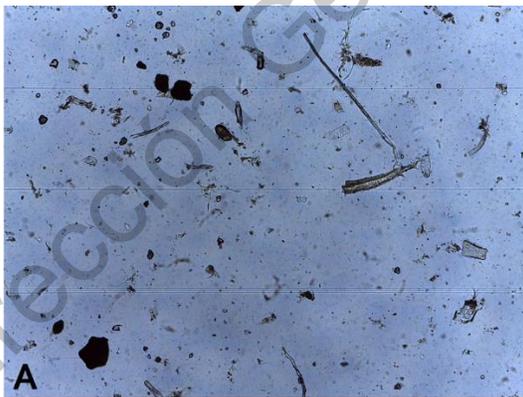
Aspergillus niger



Trichoderma reesei

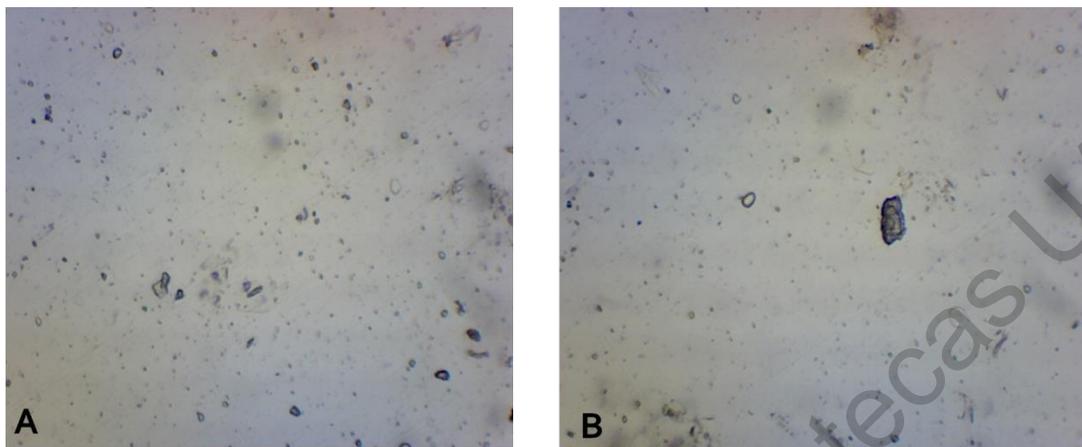


Fórmula 3



Figuras 37. Tratamiento de 7 horas. A: Imagen del agua antes del tratamiento.
B: imagen del agua después del tratamiento.

Tratamiento comercial, Citriczyme (Citricstar Ultra)



Figuras 38. Tratamiento de 5 horas. A: Imagen del agua antes del tratamiento.
B: imagen del agua después del tratamiento.

Como se puede observar en los resultados, los extractos enzimáticos crudos de *T. reesei* y *A. niger* no pudieron remover más del 10 % del contenido de stickies del agua de proceso problema. El máximo valor obtenido fue cuando se hizo la aplicación del extracto de *A. niger* por 24 horas a 45 °C, removiendo el 10.84 % de los stickies. Zhang et al. (2017) evaluó esterasa termofílica y obtuvo una remoción de stickies del 68.9 %, mientras que el tratamiento comercial de Citriczyme (Citricstar ultra) removió más del 50 % en un periodo de 5 horas de incubación.

Generalmente para la degradación enzimática de polímeros adhesivos del agua de proceso se utilizan esterasa o lipasa. Las evaluaciones de los extractos producidos no fueron muy efectivos debido a la baja actividad de dichas enzimas en el extracto. Por las actividades calculadas de los extractos producidos, es posible que estos puedan utilizarse como catalizadores en el proceso de formación de las fibras de celulosa en el proceso de reciclado de cartón.

8 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los extractos enzimáticos crudos producidos por *A. niger* y *T. reesei* a partir de pasta de cartón reciclado removieron una pequeña parte de stickies del agua de proceso. Podemos concluir además que, los resultados de actividad obtenidos de celulasa, amilasa y xilanasas, demuestran que el extracto puede ser utilizado en el proceso de desfibrado para facilitar la obtención de celulosa a partir del cartón. Así mismo, se demostró que la pasta del cartón reciclado es buen sustrato para la producción de enzimas hidrolíticas si se utiliza *T. reesei* y *A. niger* como hongos productores.

A futuro, se tiene pensado evaluar los extractos producidos en el proceso de desfibrado del cartón, así como producir extractos de *A. niger* y *T. reesei* a partir de un sustrato con el que puedan producir enzimas específicas para la degradación de los polímeros adhesivos (aceites, grasas, etc.) y probar dichos extractos en el agua de proceso.

9 REFERENCIAS

Amaro-Reyes, A., García-Almendárez, B. E., Vázquez-Mandujano, D. G., Amaya-Llano, S., Castaño-Tostado, E., Guevara-González, R. G. y 2. Regalado, C. 2013. Homologue expression of a fungal endo-1, 4- β -D-xylanase using submerged and solid substrate fermentations. *Afr. J. Biotechnol.* 10(10), 1760-1767.

Babbar, N., Oberoi, H.S. 2014. Enzymes in value-addition of agricultural and agro-industrial residues. In: Brar, S.K., Verma, M. (Eds.), *Enzymes in Value-Addition of Wastes*. Nova Publishers, pp. 29–50 (Chapter 2).

Castro F., Ana B. P. Pinheiro, Edileusa C. M. Gerhardt, Marco A. S. Oliveira, Ione P. Barbosa-Tessmann. 2017. Production, purification, and characterization of a novel serine-esterase from *Aspergillus westerdijkiae*. *Journal of basic Microbiology*. DOI: 10.1002/jobm.201700509.

Chauhan PS, Sharma P, Puri N, et al. 2014. Purification and characterization of an alkali-thermostable b-mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 and its application in manno-oligosaccharides preparation having prebiotic potential. *Eur Food Res Technol.* 2014;238:927–936.

Chi-Wen Lin, Chih-Hung Wu, Dang-Thuan Tran, MingChe Shih, Wen-Hsiung Li, Chiu-Fen Wu. 2011. Mixed culture fermentation from lignocellulosic materials using thermophilic lignocellulose-degrading anaerobes. *Process Biochemistry*, 46: 489-493.

Damien M, Catherine J, Patrice D, Christopher B. 2010. Enhanced mechanical properties of partially beta-amylase trimmed starch for material application. *Carbohydr. Poly.* 80(3): 747-752.

Dhillon, Gurpreet S., Kaur, Surinder. 2016. *Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production*. Elsevier. ISBN: 978-0-12-802392-1. pP 1-30.

Domínguez Ríos, M. D. C., Hernández Contreras, R. G., & Medina Hernández, R. M. (2017). *Innovación Y Sustentabilidad De La Industria De Papel En México*

(Innovation and Sustainability in the Mexico Paper Industry). *Revista Global de Negocios*, 5(5), 87-97.

Gopalan N, Rodríguez-Duranc LV, Saucedo-Castanedac G, Nampoothiria KM. 2015. Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: a versatile enzyme for biorefining of biomass. *Bioresour Technol* 2015;193:534–44.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of biological chemistry*, 177(2), 751-766.

Groñqvist S, Hakala TK, Kamppuri T et al. 2014. Fibre porosity development of dissolving pulp during mechanical and enzymatic processing. *Cellulose* 21:3667–3676

Gurung, N., et al. 2013. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International* 2013:329121 18 p.

Hatanaka K. 2012. Incorporation of fluorous glycosides to cell membrane and saccharide chain elongation by cellular enzymes. *Top Curr Chem* 308:291–306.

Jaiswal A, Preet M. and Tripti B. 2017. Production and Optimization of Lipase Enzyme from Mesophiles and Thermophiles. *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 9:3. DOI: 10.4172/1948-5948.1000355.

John J. 2017. Amylases- Bioprocess and Potential Applications: A Review. *Intl. J. Bioinformatics and Biological Sci.:* (V. 5 n.2, p. 41-50): December 2017.

Joshi, S., Satyanarayana, T., 2015. In vitro engineering of microbial enzymes with multifarious applications: prospects and perspectives. *Bioresource Technology* 176, 273–283.

Juturu, V., Wu, J.C., 2012. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnology. Advances* 30 (6), 1219–1227.

Kazunari T, Imanaka T. 2011. The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *J.Biosci. Bioeng.* 87: 557-565.

Kulkarni Sayali, Patil Sadichha and Satpute Surekha. 2013. Microbial Esterases: An overview. *International journal of applied sciences.* ISSN: 2319-7706 Volume 2 Number 7 (2013) pp. 135-146.

Kulkarni, N., Shendye, A., & Rao, M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 411–456.

Kumar D, Chauhan PS, Puri N, et al. 2014. Production of alkaline thermostable protease by immobilized cells of alkalophilic *Bacillus* sp. NB 34. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2014;3:1063–1080.

Kumar, V., & Shukla, P. 2015. Functional aspects of xylanases toward industrial applications. In P. Shukla (Ed.), *Frontier discoveries and innovations in interdisciplinary microbiology* (pp.157–165). Berlin: Springer.

Kumar V., Kumar D., Shkula P. 2018. Engineering Thermostable Microbial Xylanases Toward its Industrial Applications. *Molecular Biotechnology.* 60:226–235.

Li B, Wang Z, WuS et al. 2013. Effects of adhesive aging on the characteristics of stickies and their removal during paper recycling. *Ind Eng Chem Res* 52:9698–9704.

Licursi D, Antonetti C, Martinelli M et al. 2016. Monitoring/ characterization of stickies contaminants coming from a papermaking plant-Toward an innovative exploitation of the screen rejects to levulinic acid. *Waste Manag* 49:469–482.

Lopes D., Fraga L. Fleur L., Macedo G. 2011. Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately?. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 31(3): 608-613, jul.-set. 2011.

Metsämuuronen S, Lyytikäinen K, Backfolk K et al. 2013. Determination of xylo-oligosaccharides in enzymatically hydrolysed pulp by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Cellulose* 20:1121–1133.

Nguyen GS, Kourist R, Paravidino M et al. 2010. An enzymatic toolbox for the kinetic resolution of 2- (Pyridin-x-yl)but-3- yn-2-ols and tertiary cyanohydrins. *Eur J Org Chem* 14: 2753–2758.

Pleiss, J., Fischer, M. y Schmid, R. D.1998. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids* 93, 67-80.

Ramnath L., B. Sithole, and R. Govinden. 2016. Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. *Can. J. Microbiol.* 63: 179–192.

Sharma R., Chisti Y., Uttam Chand Banerjee. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances.* 19 (2001) 627–662.

Saucedo Corona A. R., Saucedo J.T., Guzmán Corona M., Sanjuán Dueñas R., Delgado Fornué E., Silva Guzmán J.A. and Vélez H. 2015. Impact of electric charge density of the system in the structure of paper. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales Vol.6 (28):* 142-155.

Saxena A. & Singh Chauhan P. 2016. Role of various enzymes for deinking paper: a review, *Critical Reviews in Biotechnology*, DOI: 10.1080/07388551.2016.1207594.

Sayali K, Sadichha P, Surekha S. 2013. Microbial esterases: an overview. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2013;2:135–46.

Sharma, A., & Satyanarayana, T. 2013. Microbial acid-stable α -amylases: characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochem.* 48(2), 201-211.

Singh V, Pandey VC, Agrawal S. 2013. Potential of *Laceyella sacchari* strain B42 crude xylanase in biobleaching of kraft pulp. *Afr J Biotechnol* 12(6):570–579.

Sondhi S, Sharma P, George N, et al. 2015. A novel extracellular thermo-alkali-stable laccase from *Bacillus tequilensis* SN4 having potential to biobleach softwood pulp. *Biotech.* 2015;5:175–185.

Vaquero ME, Barriuso J, Martinez MJ et al. 2016. Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:2047–2061.

Virk AP, Puri M, Gupta V, et al. 2013. Combined enzymatic and physical deinking methodology for efficient ecofriendly recycling of old newsprint. *PLoS ONE*. 2013;8:e72346.

Walia A, Mehta P, Chauhan A, Shirkot CK. 2013. Optimization of cellulase-free xylanase production by alkalophilic *Cellulosimicrobium* sp. CKMX1 in solid-state fermentation of apple pomace using central composite design and response surface methodology. *Ann Microbiol* 63:187–198.

Walia A, Mehta P, Chauhan A, Kulshrestha S, Shirkot CK. 2014. Purification and characterization of cellulase-free low molecular weight endo b-1, 4 xylanase from an alkalophilic *Cellulosimicrobium cellulans* CKMX1 isolated from mushroom compost. *World J Microbiol Biotechnol* 30:2597–2608.

Walia A, Mehta P, Guleria S, Shirkot CK. 2015. Modification in the properties of paper by using cellulase-free xylanase produced from alkalophilic *Cellulosimicrobium cellulans* CKMX1 in biobleaching of wheat straw pulp. *Can J Microbiol* 61:1–11.

Walia A., Shiwani Guleria. Preeti Mehta. Anjali Chauhan. Jyoti Parkash. 2017. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *Biotech*. 7:11 DOI 10.1007/s13205-016-0584-6.

Ysambertt F., Delgado N., González T., Bravo B., Chávez G., Márquez N. e Infante M. 2009. Reacciones de esterificación-sulfonación asistidas por microondas de ligninas kraft: Influencia de los cambios estructurales sobre la tensión superficial

Zhang Z., Lan D., Zhou P., Li J., Yang B., Wang Y. 2017. Control of sticky deposits in wastepaper recycling with thermophilic esterase. *Cellulose* (2017) 24:311–321. DOI 10.1007/s10570-016-1104-x.