



Universidad de Alcalá

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGIA FUNCIONAL Y
BIOTECNOLOGÍA

Obtención de biopolímeros de interés
industrial mediante la transformación de
residuos lignocelulósicos y ligninas
residuales por *Streptomyces*

TESIS DOCTORAL

Gabriela Domínguez Ruiz

2021



Universidad de Alcalá

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGIA FUNCIONAL Y
BIOTECNOLOGÍA

**Obtención de biopolímeros de interés
industrial mediante la transformación de
residuos lignocelulósicos y ligninas
residuales por *Streptomyces***

TESIS DOCTORAL

Gabriela Domínguez Ruiz

Director: D. Manuel Hernández Cutuli

Co-directora: D^a. María Eugenia Eugenio Martín

2021

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una beca de formación por la Fundación Carolina en convenio con la Universidad Central de Venezuela y la Universidad de Alcalá. Así mismo, los proyectos de investigación dentro de los cuales se ha desarrollado esta tesis han sido financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (CTQ2014-56038- C3-1R y CTQ2014 56038-C3-2R).

AGRADECIMIENTOS

Porque para poder llegar aquí, no hubiese sido posible sin la ayuda, el apoyo y la paciencia de muchas personas que estuvieron combatiendo esta batalla a mi lado, brindándome aliento, fuerzas y sobre todo esperanzas... ¡A todas esas personas quiero gritarles a TODO PULMÓN GRACIAS!

Primeramente, a Dios por darme vida y acompañarme en todo momento.

A mis hijos por ser mi motor y mi fortaleza. A mi madre por estar siempre presente a pesar de la distancia, por enseñarme a encarar las adversidades con valentía y por todo su amor incondicional. A mi familia, por siempre estar. A mi prima Denisse por estar y hacer más ligera la carga.

A mi director Dr. Manuel Hernández Cutuli, por todo su esfuerzo y dedicación. Por todo su conocimiento, orientaciones, enseñanzas, por su paciencia y comprensión, por todo su apoyo, pero sobre todo por su amistad y fraternidad, indudablemente sin su ayuda no hubiera sido posible. Gracias infinitas.

A mi co-directora Dra. María Eugenia Eugenio, gracias por toda su dedicación, ayuda y disposición siempre. Su persistencia, paciencia y motivación han sido fundamentales para mi formación. Gracias por ser amiga.

A la Dra. María Enriqueta Arias, por toda su dedicación, horas de trabajo y por compartir su experiencia conmigo, ha sido un verdadero placer compartir este trabajo a su lado. Pero sobre todo gracias por su cariño, por su aliento en momentos de dificultad, por su esperanza, por su cercanía y por hacerme sentir en casa.

A la Dra. Juana Rodríguez y Dra. Carmen Fajardo, por sus sonrisas siempre, por compartir sus conocimientos y estar siempre dispuestas a ayudarme, por escucharme y estar siempre a mi lado cuando lo necesite.

A mi amiga Dra. Natalia Gómez Casanova, dicen que quien encuentra un amigo encuentra un tesoro, gracias por tu amistad, por siempre estar a mi lado y por acompañarme en todo, gracias por todos los momentos vividos. A todos mis demás compañeros y amigos del Departamento, del laboratorio y del Grupo de

Investigación, quienes me acogieron con los brazos abiertos, Paco, Irene, Sole, Chelo, José Luis, Antonio, Adriano. Así como, Marga, Raquel y David por toda su ayuda en la ejecución de algunos análisis y por compartir sus conocimientos. Gracias a Alba Blánquez por abrirme las puertas del laboratorio, por compartir sus conocimientos y ayudarme a iniciar este proyecto. A todos los pasantes que me acompañaron y ayudaron, especialmente a Barbara y Daniel.

A Gemma Montalvo y Fernando Ortega, por compartir sus conocimientos y ayudarme siempre que así lo necesite.

Al Dr. Leonardo Casano Mazza, coordinador del Programa de Doctorado en Biología Funcional y Biotecnología, por su siempre disposición y oportuna respuesta desde la primera vez que lo contacte para la solicitud de la beca doctoral.

Al Vicerrector Francisco J. de la Mata de la Mata, María Carmen de la Peña y todo el equipo del Vicerrectorado de Investigación y Transferencia de la Universidad de Alcalá por todo su apoyo incondicional en las gestiones y ayudas adicionales que necesite para culminar este proyecto.

A Carol, Carolina, Evany, Emily, Chenchó y Hamlet quienes conocí en España y se convirtieron en mis hermanos, gracias por todo su apoyo y momentos vividos, sin ustedes este camino no hubiese sido posible. A todos los amigos que esta experiencia multicultural me regalo, Madelen, Teresa, Adriana, Christian, Alina, Michell, Mabel, Bere, Majito, Lu, Consu, Micaela, Paula, Lola. ¡Gracias!

A mi amigo y director espiritual Pbro. Diego Canales, por ser mi pastor, guía y apoyo. Por su persistencia y motivación para alcanzar esta meta. A todos lo que siempre me acompañaron con palabras de aliento y motivación, Pbro. Javier Ortega, Pbro. José Hernández, Pbro. Arturo Otero, Mercedes, Mari José, Pilar, Blanca, a todos gracias.

A todos los que mi cabeza no pudo extraer esta noche. ¡GRACIAS!

A Dios

A mis hijos, Mati y JuanDi

A mi madre

RESUMEN

El agotamiento de los recursos petrolíferos y la mayor concienciación de la sociedad sobre la preservación del medio ambiente, han impulsado el desarrollo de metodologías sostenibles para transformar fuentes renovables en productos de alto valor añadido. La biomasa lignocelulósica residual como las obtenidas en prácticas agrícolas y la lignina residual procedente de la industria pastero-papelera generan graves problemas medioambientales. Así, durante los últimos años, estos residuos se han utilizado en innumerables investigaciones por su gran potencial para ser utilizados con fines biotecnológicos y/o medioambientales, generando productos de gran interés.

En este trabajo se ha llevado a cabo en primer lugar, la optimización, mediante el método estadístico Ortogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA), de las condiciones de fermentación en estado sólido (SSF) de residuos agrícolas (paja de trigo y paja de cebada) por cepas de *Streptomyces*, para ser utilizados como espesantes en la producción de oleogeles respetuosos con el medio ambiente. Así mismo, se ha evaluado el potencial de ligninas residuales (Kraft y álcali lignina) funcionalizadas con la enzima lacasa SilA como espesantes para la misma finalidad. Para ello, se optimizaron las condiciones de reacción enzimática por la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) con objeto de alcanzar el mayor grado de polimerización de las ligninas. Por otra parte, se llevó a cabo la producción y la caracterización de hidrogeles elaborados con ligninas residuales funcionalizadas con SilA y se evaluó su potencial utilidad como agentes antibacterianos y adsorbentes de contaminantes textiles. Por último, se analizó la biodegradabilidad y ecotoxicidad de los productos obtenidos.

Como resultados más relevantes cabe señalar que ambos residuos agrícolas fueron transformados con éxito por las cepas de *Streptomyces* durante el proceso SSF. La eficacia del proceso, determinada en función de la actividad enzimática y de la solubilización de la lignina, se atribuyó preferentemente a la actividad xilanasas producida por ambas cepas. La aplicación del método OPLS-DA a los resultados, permitió seleccionar como condiciones óptimas a la cepa *S. MDG 301* actuando sobre paja de trigo a 45 °C durante 7 días de incubación. La caracterización reológica de los oleogeles obtenidos a partir de paja de trigo fermentada en las condiciones óptimas seleccionadas, presentaron valores más bajos de las funciones viscoelásticas, en comparación con los oleogeles obtenidos a partir de paja de trigo sin inocular. Sin embargo, se demostró que la acción polimerizante de la lacasa SilA sobre ligninas residuales permitió la obtención de oleogeles con características reológicas comparables e incluso superiores, en algunos casos, a la de los lubricantes comerciales. Por otro lado, se obtuvieron hidrogeles con distintas proporciones de quitosano y ligninas funcionalizadas con SilA, que presentaron características fisicoquímicas versátiles para su uso en diferentes sectores industriales. Cabe señalar que la compatibilidad de ambos polímeros se consiguió merced a la acción oxidativa de la enzima sobre las ligninas, siendo aquellos formulados con 70% de quitosano y 30% de lignina, los que presentaron mayor capacidad de retención de agua y mejor matriz estructural. Además, estos hidrogeles mostraron una alta eficacia de adsorción de colorantes textiles, así como una significativa capacidad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Por último, en este trabajo se demostró que los oleogeles e hidrogeles obtenidos a base de lignocelulosa y ligninas residuales funcionalizadas presentan características adecuadas en términos de biodegradabilidad y eco-seguridad, lo que supone una estrategia innovadora dentro de las tecnologías respetuosas con el medio ambiente, cumpliendo además con los requisitos de la economía circular.

SUMMARY

The depletion of petrol resources and the great awareness of society about the preservation of the environment, have promoted the development of sustainable methodologies to transform renewable sources into products with high added value. Residual lignocellulosic biomass result of agricultural practices and the residual lignin from the pulp and paper industry generate serious environmental problems by accumulation in the field or by discharge into surface streams. Thus, in recent years, these wastes have been used in countless research works exploring its great biotechnological potential to to develop products of great industrial interest.

In this work, the optimization of the parameters that affect a Solid State Fermentation (SSF) process of two agricultural residues (wheat straw and barley straw) by selected strains of *Streptomyces* has been carried out applying the statistical method Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA). Fermented substrates were later used as thickeners in the production of environmentally friendly oleogels. Likewise, the potential use as thickener in of residual lignins (Kraft and alkali lignin) functionalized with the laccase SilA were also evaluated. Thus, the optimal enzyme reaction conditions were determined by the Response Surface Methodology (MSR) in order to achieve the highest polymerization degree of the lignins. On the other hand, the production and characterization of hydrogels made with residual lignins functionalized with SilA was carried out and their potential utility as antibacterial agents and adsorbents of textile pollutants was evaluated. Finally, the biodegradability and ecotoxicity of the products obtained were analyzed.

Most remarkable results showed that both agricultural residues were successfully transformed by *Streptomyces* strains during the SSF process. The efficiency of this process, determined as a function of the enzymatic activity and as the solubilization of lignin, was mainly attributed to the xylanase activity produced by both strains. The analysis of all results through the OPLS-DA method allowed to select the strain *S. MDG 301* growing on wheat straw at 45 °C during 7 days of incubation for further applications. The rheological characterization of the oleogels obtained from this fermented wheat straw under the selected optimal conditions, showed lower values of the viscoelastic functions compared to oleogels formulated using uninoculated wheat straw. However, it was noticeable the polymerizing action of laccase SilA on residual lignins, which allowed us to obtaining oleogels with rheological characteristics comparable and even superior, to that used in commercial lubricants. Furthermore, the polymerizing action of SilA on residual lignins was demonstrated when these functionalized lignin were used to formulate hydrogels together with different proportions of chitosan. The films obtained from these hydrogels presented versatile physicochemical characteristics for use in different industrial sectors. It is remarkable that the compatibility of both polymers (lignin and chitosan) was achieved thanks to the oxidative action of the SilA on the phenolic moiety of lignins and those films formulated with 70% chitosan and 30% lignin, presented a great water retention capacity and a good structural matrix. Moreover, these films showed a high adsorption efficiency of textile dyes, as well as a significant antibacterial capacity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Finally, the adequate characteristics in terms of biodegradability and eco-safety of oleogels and hydrogels designed in this work could assume an innovative strategy within environmentally friendly technologies and also complies with the requirements of the circular economy.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

2,4-DCP: 2,4-dicloro-fenol
ABTS: 2,2'- azinobis [3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]
AL: álcali lignina
ALF: álcali lignina funcionalizada
ANOVA: análisis de varianza
APM: Polímeros de alto peso molecular
APPL: lignina ácido soluble
ASTM: American Society for Testing and Materials
Aw: Actividad de agua
BPM: polímeros de bajo peso molecular
CAA: capacidad de absorción de agua
CCD: diseño compuesto central
CG: con glicerol
CL: grasa comercial
CMC: carboximetilcelulosa
CMCasa: actividad enzimática carboximetilcelulasa
CV: validación cruzada completa
DE3: cepa BL21 de *Escherichia coli*
DO₆₀₀: densidad óptica 600 nm
E: módulo elástico
EB: alargamiento a la rotura
FTIR: Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier
FW: sustrato fermentado
G': módulo de almacenamiento
G'': módulo de pérdida
g: fuerza g
G: guaiacilo; 3 metoxi-4-hidroxifenilo
Gn⁰: módulo plateau
H: unidad *p*-hidroxifenilo
HMDI: diisocianato de hexametileno
IPTG: Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
ISP 2: International *Streptomyces* Project
k: índice de consistencia
K: lignina Kraft
KF: lignina Kraft funcionalizada
LB: Caldo de lisogénesis
LMS: sistemas lacasa mediador
MBS: medio basal salino
MCOs: oxidorreductasas multicobre
Mi: masa inicial de la película
Md: masa de la película seca
Mf: masa final

W30: peso de las películas después de permanecer 30 minutos sumergidas en agua
W0: peso de las películas tiempo 0
MN: meganewton
kN: kilonewton
MPM: polímeros de medio peso molecular
MSR: Metodología de Superficie de Respuesta
n: índice de flujo
NIPALS: mínimos cuadrados parciales iterativos no lineales
OFW: oleogeles obtenidos a partir de FW
OPLS: Ortogonal Partial Least Squares
OPLS-DA: Ortogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis
OW: oleogeles obtenidos a partir de W
p/p: peso/peso
p/v: peso/volumen
PBS: Tampon fosfato salino
PCL: policaprolactona
PLS: Partial Least Squares
Psi: Libra por pulgada cuadrada
Q: quitosano
RI: detector de índice de refracción
rpm: revoluciones por minuto
S: siringilo; 3,5-dimetoxi-4-hidroxifenilo
SAOS: Small Amplitude Oscillatory Shear
SECO: lignano secoisolariciresinol
SG: sin glicerol
SiLA: lacasa recombinante de *Streptomyces ipomoeae*
SLACs: lacasas pequeñas de tipo cupredoxina
SOC: Caldo súper óptimo con represión catabólica
SSF: Fermentación en estado sólido
TS: Resistencia a la tracción
ufc: unidades formadoras de colonias
v/v: volumen/volumen
W: sustrato sin inocular

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. Bioeconomía: principios básicos e interés actual	1
1.2. Principales residuos biodegradables	3
1.2.1. Residuos agrícolas como fuente de biomasa lignocelulósica	3
1.2.1.1. Estructura y composición de la biomasa lignocelulósica	4
1.2.1.2. Abundancia e interés tecnológico de los residuos agrícolas	6
1.2.2. Ligninas residuales obtenidas de la industria de fabricación de pastas de celulosa y papel: procesos de obtención y alternativas de uso	8
1.2.2.1. Proceso de pastado Kraft	9
1.2.2.2. Proceso de pastado a la sosa	10
1.2.2.3. Características diferenciales de las ligninas residuales obtenidas en ambos procesos	11
1.2.2.4. Principales aplicaciones de las ligninas residuales	12
1.2.3. Quitina: naturaleza y principales fuentes	13
1.2.3.1. Exoesqueletos de crustáceos como fuente de quitina	14
1.2.3.2. Aplicaciones del quitosano	15
1.3. Transformación de residuos lignocelulósicos por Actinobacterias	15
1.3.1. Bases del proceso de fermentación en estado sólido (SSF)	15
1.3.2. Importancia del género <i>Streptomyces</i> en la degradación de lignocelulosa.	17
1.3.2.1. Características generales del género <i>Streptomyces</i>	17
1.3.3. Sistemas enzimáticos implicados en la biotransformación de lignocelulosa por <i>Streptomyces</i>	19
1.3.3.1. Xilanasas	20
1.3.3.2. Mananasas	21
1.3.3.3. Lacasas	21
1.4. Oleogeles e hidrogeles de interés industrial: necesidad de nuevas formulaciones con criterios sostenibles	23
1.4.1. Oleogeles	23
1.4.2. Hidrogeles	25
2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. Fermentación en estado sólido (SSF) de residuos agrícolas	31
3.1.1. Microorganismos utilizados	31
3.1.2. Mantenimiento y conservación de los microorganismos	31
3.1.3. Sustratos y condiciones de fermentación	31

3.1.4. Valoración de actividades enzimáticas producidas en SSF	32
3.1.4.1. Actividad xilanasa (β – (1,4) endoxilanhidrolasa)	32
3.1.4.2. Actividad mananasa (β -1,4 mananasa)	33
3.1.4.3. Actividad carboximetilcelulasa (endoglucanasa)	33
3.1.4.4. Actividad lacasa	33
3.1.4.5. Actividad peroxidasa	33
3.1.5. Obtención de álcali lignina y APPL de los sustratos fermentados	34
3.1.6. Optimización de las condiciones de producción de las enzimas y solubilización de la lignina en SSF	34
3.2. Obtención de oleogeles a partir de paja de trigo fermentada por la cepa <i>S. MDG 301</i> y caracterización de los mismos	35
3.2.1. Caracterización morfológica y química del sustrato control (W) y del sustrato fermentado por <i>Streptomyces MDG 301</i> (FW).	35
3.2.1.1. Microscopía electrónica de barrido de ambos sustratos	36
3.2.1.2. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) de ambos sustratos	36
3.2.2. Funcionalización química del sustrato fermentado	36
3.2.3. Proceso de obtención de oleogeles	37
3.2.4. Caracterización de los oleogeles obtenidos a partir de paja de trigo control (OW) y fermentada (OFW)	37
3.2.4.1. Propiedades reológicas de los oleogeles	37
3.2.4.2. Ensayo de biodegradabilidad de los oleogeles: evolución del CO ₂	38
3.2.4.3. Ensayos ecotoxicológicos de los oleogeles frente a <i>Lactuca sativa</i>	39
3.3. Obtención de oleogeles a partir de ligninas residuales (lignina Kraft y álcali lignina) funcionalizadas por la lacasa SilA de <i>Streptomyces ipomoeae</i>	39
3.3.1. Ligninas utilizadas	39
3.3.2. Producción de la lacasa SilA	40
3.3.2.1. Microorganismo productor	40
3.3.2.2. Condiciones de producción de la lacasa	40
3.3.2.3. Obtención de la forma activa de la enzima	42
3.3.2.4. Valoración de la actividad lacasa	42
3.3.3. Establecimiento de las condiciones de reacción de polimerización de las ligninas residuales con la lacasa SilA	42
3.3.3.1. Funcionalización de ligninas residuales con la lacasa SilA	42
3.3.3.2. Optimización de las condiciones de polimerización	43

3.3.4. Obtención de oleogeles a partir de lignina Kraft y álcali lignina funcionalizadas con SilA.	44
3.3.4.1. Ensayo preliminar de funcionalización de las ligninas residuales y su efecto en las características reológicas de los oleogeles	44
3.3.4.2. Optimización de las condiciones de funcionalización de ligninas residuales con SilA, elaboración de oleogeles y caracterización reológica de los mismos	44
3.3.4.2.1. Caracterización química de las ligninas residuales funcionalizadas con SilA en condiciones óptimas de reacción.	45
3.3.4.2.2. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) de las ligninas residuales funcionalizadas con SilA en condiciones óptimas de reacción.	46
3.4. Obtención y caracterización de los hidrogeles elaborados a partir de quitosano y ligninas residuales (Kraft y álcali lignina) funcionalizadas con la lacasa SilA	46
3.4.1. Biopolímeros residuales utilizados	46
3.4.2. Condiciones de obtención de los hidrogeles	46
3.4.3. Caracterización de los hidrogeles	48
3.4.3.1. Propiedades físico-químicas	48
▪ Humedad (%)	48
▪ Solubilidad (%)	48
▪ Capacidad de absorción de agua (CAA)	48
3.4.3.2. Propiedades físico-mecánicas	49
▪ Espesor	49
▪ Resistencia mecánica	49
3.5. Ensayos conducentes a evaluar el potencial tecnológico de los hidrogeles.	49
3.5.1. Evaluación de la capacidad antibacteriana de los hidrogeles	49
3.5.2. Capacidad de retención de colorantes textiles	50
3.6. Biodegradabilidad de los hidrogeles: Evolución del CO₂	51
3.7. Ensayos ecotoxicológicos frente a <i>L. sativa</i>	51
3.8. Análisis estadístico	51
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1. Producción de actividades enzimáticas y evaluación del contenido de APPL y álcali lignina en extractos obtenidos de los residuos agrícolas fermentados mediante SSF	53
4.1.1. Valoración de actividades enzimáticas y estimación de APPL y álcali lignina obtenidos a partir de los sustratos fermentados.	53

4.1.2. Aplicación del método estadístico OPLS-DA a los datos obtenidos para conocer la influencia de cada variable y de su interacción sobre la eficiencia del proceso SSF	56
4.2. Obtención y caracterización de oleogeles obtenidos a partir de paja de trigo control y fermentada en condiciones óptimas	61
4.2.1. Caracterización química y estructural de la paja de trigo control (W) y de la paja de trigo fermentada por <i>Streptomyces</i> (FW).	61
4.2.2. Características reológicas de los oleogeles obtenidos a partir de ambos sustratos	64
4.2.3. Biodegradabilidad de los oleogeles: evolución del CO ₂	67
4.2.4. Ensayo ecotoxicológico frente a <i>Lactuca sativa</i>	69
4.3. Obtención de oleogeles a partir de ligninas residuales (lignina Kraft y álcali lignina) funcionalizadas por la lacasa SilA de <i>Streptomyces ipomoeae</i>	70
4.3.1. Funcionalización de lignina Kraft y álcali lignina por la lacasa SilA	71
4.3.1.1. Establecimiento de las condiciones de reacción de polimerización de las ligninas residuales por la lacasa SilA	71
4.3.1.2. Optimización de las condiciones de polimerización mediante aplicación de la metodología de superficie de respuesta (MSR).	75
4.3.2. Obtención de oleogeles a partir de lignina Kraft y álcali lignina funcionalizadas con SilA.	76
4.3.2.1. Ensayo preliminar de funcionalización de lignina Kraft y su efecto en las características reológicas de los oleogeles	76
4.3.2.2. Caracterización reológica de los oleogeles obtenidos a partir de lignina Kraft y álcali lignina funcionalizadas con SilA.	78
4.3.2.3. Optimización de las condiciones de preparación de los oleogeles mediante aplicación de MSR	80
4.3.2.4. Caracterización reológica de los oleogeles obtenidos con ligninas residuales funcionalizadas con lacasa en condiciones óptimas de reacción	82
4.4. Obtención y caracterización de los hidrogeles elaborados a partir de quitosano y ligninas residuales (Kraft y álcali lignina) funcionalizadas con la lacasa SilA	86
4.4.1. Caracterización de los hidrogeles	86
4.4.1.1. Propiedades físico-químicas	86
▪ Contenido de humedad	88
▪ Solubilidad	90

▪	Capacidad de absorción de agua (CAA)	92
4.4.1.2.	Propiedades físico-mecánicas	93
▪	Resistencia a la tracción (TS), alargamiento a la rotura (EB) y módulo elástico (E).	93
4.5.	Ensayos conducentes a evaluar el potencial tecnológico de los hidrogeles.	95
4.5.1.	Evaluación de la capacidad antibacteriana de los hidrogeles	95
4.5.2.	Capacidad de retención de colorantes textiles	97
4.6.	Biodegradabilidad de hidrogeles: evolución del CO₂	99
4.7.	Ensayo ecotoxicológicos de los hidrogeles frente a <i>Lactuca sativa</i>	100
5.	CONCLUSIONES	102
6.	BIBLIOGRAFÍA	105
7.	ANEXOS	131

Introducción

1. INTRODUCCION

1.1. Bioeconomía: principios básicos e interés actual

El crecimiento de la población mundial que se prevé que aumente más de un 30% en los próximos 40 años, el rápido agotamiento de recursos no renovables derivados del petróleo, la dependencia energética exterior unida a la inestabilidad de precios, el aumento de la presión sobre el medio ambiente principalmente por la acumulación de CO₂ (efecto invernadero) y el cambio climático, son factores determinantes del cambio radical que debe experimentar Europa en el manejo de los recursos biológicos (BIOPLAT y SusChem-España, 2017).

Todos estos factores están suscitando el interés por la implementación de políticas cimentadas en la Bioeconomía, modelo económico basado en la utilización de recursos biológicos renovables, tales como cultivos, bosques, peces, animales y microorganismos, para producir alimentos, materiales y energía (Figura 1.1).

Este objetivo se plantea en conjunción con la posibilidad de apostar por la revalorización de recursos autóctonos, creación de nuevos modelos

productivos de alto valor añadido, dinamización del medio rural, disminución de la utilización de recursos petroquímicos e iniciativas privadas. Esta serie de medidas en paralelo con las estrategias de economía circular marcadas por la Comisión Europea, enmarcan un contexto favorable para el impulso de mejoras de sostenibilidad económica, social y medioambiental, tanto de la producción primaria como de las industrias de transformación.

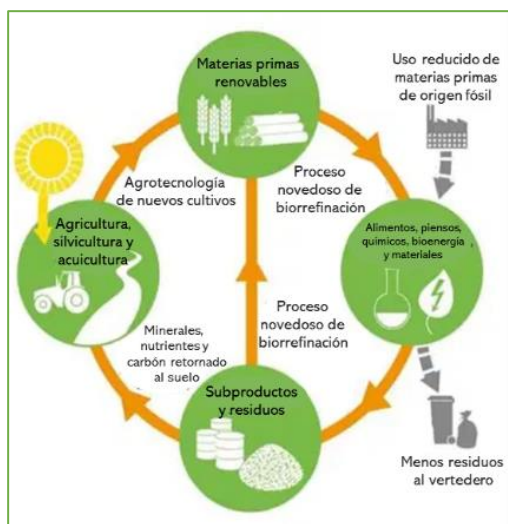


Figura 1.1. Bioeconomía en la Unión Europea.

Fuente: Estrategia Española de Bioeconomía: Horizonte 2030, 2015.

A nivel nacional, las Plataformas Tecnológicas Españolas de Biomasa para la Bioeconomía (BIOPLAT) y de Química Sostenible (SusChem-España), así como la Estrategia Española de Bioeconomía: Horizonte 2030 (2015),

sostienen que el aprovechamiento de las biomásas autóctonas contribuye a convertir residuos potencialmente problemáticos en recursos y ahorrar sustancialmente en emisiones de gases de efecto invernadero, garantizando un modelo socioeconómico basado en el desarrollo sostenible y contribuyendo activamente a mitigar la gran amenaza de la sociedad actual, el cambio climático. El aprovechamiento de residuos favorece además la bioeconomía, que implica una auténtica revolución de los sistemas productivos, estimulando la producción de recursos biológicos renovables y la conversión de estos recursos sostenibles en otros con mayor valor añadido, como bioenergía y bioproductos (biocombustibles, bioplásticos, biosurfactantes, etc.) (BIOPLAT y SusChem-España, 2017, Estrategia Española de Bioeconomía: Horizonte 2030, 2015)

El término biomasa hace referencia a toda materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, potencialmente utilizable como fuente de energía y productos químicos. Los diferentes tipos de biomásas pueden clasificarse en función de su procedencia en: agrícolas, forestales, ganaderas, industriales y domésticas. En el estudio técnico “Evaluación del potencial de energía de la biomasa 2011-2020”, publicado por el

Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDAE) se muestra la evaluación del potencial de biomasa en España de acuerdo con sus distintos orígenes y posibilidades de introducción en el mercado energético, en función de los costes estimados para su producción y disposición en el mercado. Se ha estimado que la generación de la biomasa producida es de 159 millones de t/año, incluyendo la derivada de los cultivos agrícolas, la actividad forestal, la industria alimentaria o la industria de la madera, del papel y del textil, los residuos animales y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (i Roset *et al.*, 2020).

Por otro lado, el creciente interés por implementar una química verde y sostenible ha contribuido a dirigir una especial atención hacia el aprovechamiento de polímeros que se encuentran altamente distribuidos en la naturaleza, como es el caso de la quitina, ya que constituyen un importante recurso reutilizable, prometedor, sostenible y renovable para su transformación en bio-productos de interés industrial, sin entrar en competencia con otros recursos naturales como almidones o aceites vegetales, utilizados con fines alimentarios (Floudas *et al.*, 2012). Estos son los objetivos que España pretende perseguir hasta 2030 y de los que espera

conseguir una reducción de gases de efecto invernadero, incrementar la reutilización de todo tipo de residuos, y hacer un uso más eficiente de los recursos naturales.

Resulta importante resaltar que la economía, eficiencia y éxito de estos procesos depende en gran medida de la disponibilidad y costes de la materia prima, la cual resulta clave para el desarrollo de los procesos. En este sentido, es importante analizar, a escala de laboratorio, el potencial tecnológico de los diferentes recursos naturales y/o residuos biodegradables existentes en un país, mediante el diseño de estrategias sostenibles para su transformación en bio-productos de alto valor añadido que puedan ser competitivos a nivel industrial.

1.2. Principales residuos biodegradables

Como ya se ha comentado anteriormente, la búsqueda de recursos naturales que permitan sustituir total o parcialmente el uso de combustibles fósiles en la obtención de productos de interés tecnológico es uno de los retos de la investigación actual. Entre estos recursos cabe destacar la biomasa lignocelulósica (residuos agrícolas y/o forestales, industriales, etc) y sus derivados que, al constituir el recurso

renovable más abundante sobre la tierra, se consideran candidatos genuinos para su transformación en materias primas que puedan ser utilizadas a nivel industrial de forma sostenible.

Por otro lado, también resulta prometedor desde el punto de vista tecnológico el aprovechamiento de polímeros naturales de carácter residual provenientes de distintas industrias como es el caso de la quitina y su derivado el quitosano, que, por su biodegradabilidad, biocompatibilidad y mayor reactividad ofrece un gran potencial para ser revalorizado en distintas aplicaciones con proyección industrial, contribuyendo a su vez a reducir el impacto ambiental causado por su acumulación en distintos ecosistemas

1.2.1. Residuos agrícolas como fuente de biomasa lignocelulósica

La acumulación de residuos agrícolas en los campos de labranza y la falta de una gestión correcta de los mismos supone un riesgo importante para el medio ambiente, ya que puede facilitar la propagación de plagas y enfermedades, a la vez que atrae a roedores e insectos (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2012). De aquí que, dentro de la biomasa lignocelulósica, constituyen un material

de partida importante para su transformación mediante el uso de microorganismos en diversos productos, que puedan a su vez ser utilizados como materias primas en otros procesos tecnológicos, contribuyendo de este modo a su reciclaje y valorización, objetivos claves de la economía circular.

1.2.1.1. Estructura y composición de la biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 1.2) y, dependiendo del tipo de biomasa, estos polímeros se organizan en complejos de estructuras tridimensionales no uniformes en diferentes grados y de composición relativa variable (Isikgor y Becer, 2015). La celulosa, la hemicelulosa y la lignina no se distribuyen uniformemente dentro de la pared celular vegetal.

La estructura y la cantidad de estos componentes varían según la especie, tejidos madurez de la planta. Generalmente, la biomasa lignocelulósica contiene entre el 35 y el 50% de celulosa, del 20 al 35% de hemicelulosa y del 10 al 30% de lignina (Martín-Sampedro *et al.*, 2014).

El componente principal de la biomasa lignocelulósica es la celulosa, que representa la molécula orgánica más abundante en la tierra (Ferreira, 2014). Es un polisacárido lineal, cuya unidad constituyente es el disacárido celobiosa. Su estructura se mantiene mediante extensas redes de enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares que unen firmemente las unidades de glucosa (Figura 1.2).

Por su parte, la hemicelulosa es el segundo polímero más abundante. A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa tiene una estructura heterogénea y amorfa que se compone de varios heteropolímeros incluyendo xilano, galactomanano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano. Los heteropolímeros de hemicelulosa están compuestos de diferentes monosacáridos de 5 y 6 unidades de carbono: pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y azúcares acetilados (Figura 1.2) (Isikgor y Bencer, 2015). Estos monómeros, que pueden estar metilados o acetilados, se encuentran unidos entre sí mayoritariamente por enlaces $\beta - 1,4$ excepto en el caso de los residuos de D-galactosa que se unen mediante enlaces $\beta - 1,3$ (Eriksson *et al.*, 1990).

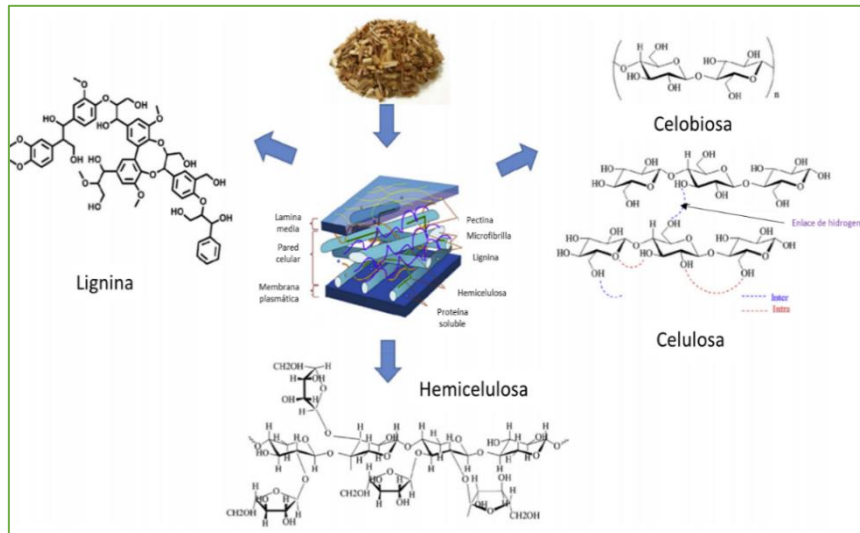


Figura 1.2. Distribución y estructura de la celulosa, la hemicelulosa y la lignina en la biomasa lignocelulósica.

Fuente: Kumar y Kesavan, 2020.

Las hemicelulosas difieren en su composición, dependiendo del tipo de planta; así, las hemicelulosas de madera dura contienen principalmente xilanos, mientras que las hemicelulosas de madera blanda contienen principalmente glucomananos (Montiel *et al.*, 1999; Schutyser *et al.*, 2018). Estos polímeros forman en la pared celular vegetal una red compleja de enlaces que proporcionan resistencia estructural al unir las fibras de celulosa en microfibrillas y formar enlaces cruzados con la lignina (Figura 1.2) (Isikgor y Bencer, 2015).

Finalmente, la lignina es un biopolímero aromático de naturaleza

fenilpropanoide, complejo, amorfo y racémico, el cual constituye entre el 15 y 35% de la madera y representa alrededor del 20% de la biomasa total de la biosfera (Ferreira, 2014). Este polímero, está formado por tres monolignoles unidos entre sí principalmente por enlaces de tipo éter y carbono-carbono. Proporciona resistencia al tejido vegetal, rigidez a la pared celular y resistencia contra insectos y patógenos (Figura 1.3) (Gosselink, 2011).

Este polímero deriva de la condensación de tres monómeros de alcohol hidroxicinámico, denominados monómeros de lignina o monolignoles: alcohol *p*-cumarílico, alcohol

coniferílico y alcohol sinapílico (Dongre y Bujanovic, 2021). La lignina es sintetizada por la polimerización de esos componentes y su proporción dentro del polímero varía entre las diferentes plantas, tipo de tejido de la planta y las distintas capas de la pared celular. Los monolignoles difieren en el grado de sustitución de los grupos metoxilos en posición C3 y C5 del anillo fenólico, lo que da lugar a las unidades *p*-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G; 3 metoxi-4-hidroxifenilo) y siringilo (S; 3,5-dimetoxi-4-hidroxifenilo) de la lignina, respectivamente (Figura 1.4). (Ralph *et al.*, 2004).

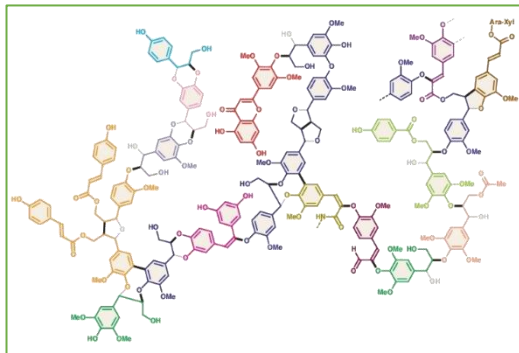


Figura 1.3. Modelo estructural de lignina de madera blanda

Fuente: Ralph *et al.*, 2019.

Los porcentajes de distribución de los monolignoles difieren en los distintos tipos de plantas; así, en las maderas blandas es predominante la estructura G, con una pequeña cantidad de unidades H, mientras que en las maderas duras coexisten las unidades S y G, con

trazas de unidades H. En las gramíneas (angiospermas herbáceas) existen proporciones similares de las unidades H, G y S (Ralph *et al.*, 2007). Por esta razón, cuando la lignina es sometida a un procesamiento adicional, las unidades G y H tienden a sufrir condensación más fácilmente debido a que la posición del C3 está libre (Figura 1.4).

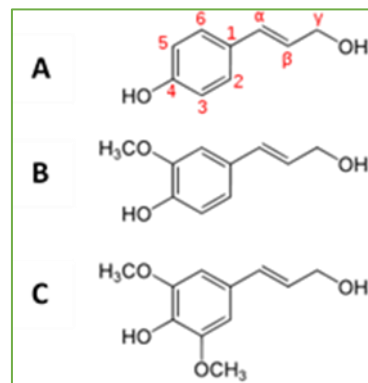


Figura 1.4. Unidades monoméricas constituyentes de la lignina: (A) alcohol cumarílico (H), (B) alcohol coniferílico (G), (C) alcohol sinapílico (S)

Fuente: Sjöström, 1993.

En consecuencia, el tipo de unidades estructurales presentes en la lignina puede determinar la reactividad de la misma, representando un parámetro importante a considerar durante su valorización (Sjöström, 1993)

1.2.1.2. Abundancia e interés tecnológico de los residuos agrícolas

En España, existen grandes superficies dedicadas a la agricultura y una gran abundancia de monte mediterráneo, donde se encuentran acumulaciones vegetales que pueden producir serios problemas en la conservación del medio ambiente. Los residuos agrícolas son todos aquellos que se generan a partir de cultivos leñosos y/o herbáceos, así como los producidos en el desarrollo de actividades propias de estos sectores (FAO, 2014). En España se generan cerca de 30,5 millones de toneladas de estos residuos cada año (i Roset *et al.*, 2011), lo que requiere una gestión adecuada de los mismos. El 35,7% de los residuos agrícolas está constituido por residuos de los cultivos de cereales, que generan unas cantidades que superan las 960.0000 t/año. La mayoría de estos residuos (43%) los aporta el cultivo de la cebada, seguido por los del trigo (25%) y el maíz (23%). Menor importancia relativa tiene la aportación de los residuos de los cultivos de avena, arroz, centeno y sorgo, que no llegan al 10%. Aún menor es la contribución de los residuos generados por los denominados "cultivos industriales" que ocupan el 6% del total. Dentro de este grupo, destacan los residuos generados por el cultivo del girasol (Cuadros, 2008). Los residuos que actualmente se queman en el campo, se consideran potencialmente disponibles para la producción de bioenergía, dado que la

quema de residuos tiene impactos negativos en el suelo y emite gases de efecto invernadero a la atmósfera (Figura 1.5) (FAO, 2020).

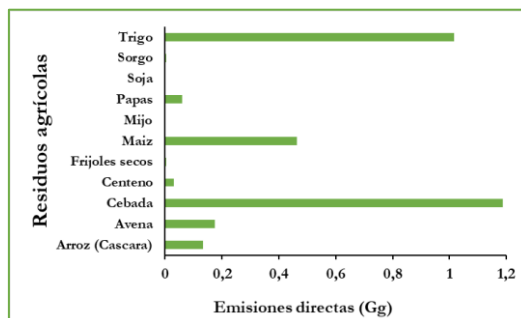


Figura 1.5. Emisiones directas generadas por distintos tipos de residuos agrícolas en España en 2017.

Fuente: FAO, 2020.

Uno de los desafíos a los que se ha enfrentado la biotecnología ha sido tratar de lograr la bioconversión de los residuos agroindustriales mediante el uso de microorganismos productores de enzimas degradadoras o inductoras de modificaciones químicas en sus componentes mayoritarios. Entre estas enzimas cabe señalar aquellas implicadas en la degradación de la celulosa y hemicelulosa, así como en la solubilización, modificación y/o degradación de la lignina, lo cual ofrece una amplia gama de posibilidades de utilización de los productos intermediarios para la obtención de otros materiales de alto valor añadido por fermentación (Behera *et al.*, 2017).

La gestión de los residuos agrícolas sigue siendo una de las principales preocupaciones ambientales en los países desarrollados, donde su reciclaje y valorización se consideran las opciones sostenibles más viables económicamente (Directiva Marco de Residuos 2008/98/CE). En este sentido, los usos más extendidos para estas biomásas residuales son la producción de energía como biocombustibles, la producción de compost, su quema con fines energéticos o simplemente para su eliminación en el campo (Kumar *et al.*, 2002). Sin embargo, estos residuos modificados química o biológicamente están siendo incorporados a diferentes segmentos de la industria. Tales aplicaciones incluyen, entre otras, su incorporación como agente de sustitución del cemento en el hormigón en diferentes formas, bien sea como geopolímero (Liang *et al.*, 2019; Nuaklong *et al.*, 2020) o refuerzo (Akinyemi y Dai, 2020; Kumar y Kesavan, 2020); sustitución de áridos (Luhar *et al.*, 2019; Raheem y Ikotun, 2020), mejorador del suelo como biocarbón (Molina-Campos *et al.*, 2020), producción de carbones activados (Ioannidou y Zabaniotou, 2017), producción de productos bioactivos (Santana-Méridas *et al.*, 2012), producción de hidrolizados agrícolas ricos en proteínas (Krull *et al.*, 2020),

como agentes en el tratamiento de agua (Neamhom, 2019), como biocomposites sustituto de los plásticos (Solle *et al.*, 2019) o como agentes aglutinantes en la fabricación de tableros de madera (Nasir *et al.*, 2019).

1.2.2. Ligninas residuales obtenidas de la industria de fabricación de pastas de celulosa y papel: procesos de obtención y alternativas de uso

Entre los residuos potencialmente biodegradables y de bajo coste que despiertan un gran interés tecnológico en la actualidad cabe destacar las ligninas, derivados de la industria de fabricación de pastas de celulosa y papel, un ejemplo de biorrefinería lignocelulósica. Las diferencias en su composición y la posibilidad de ser modificadas estructuralmente por métodos biológicos les otorga características potencialmente útiles como materias primas para su transformación en bio-productos con proyección industrial.

La industria pastero-papelera utiliza recursos naturales como la madera y el agua y genera un alto volumen de efluentes cuyo vertido produce un alto impacto ambiental (Bousios y Worrell, 2017). Los residuos producidos por la industria de la pasta y el papel son principalmente lejías residuales

derivadas de los procesos de pasteado y de blanqueo, así como lodos primarios y secundarios. Estos residuos son potenciales contaminantes del aire, el suelo y el agua (Kumar *et al.*, 2011; Lindholm-Lehto *et al.*, 2015).

La producción de pasta y papel se realiza a partir de materias primas lignocelulósicas, generalmente madera, papel reciclado, plantas o residuos agrícolas. El proceso de pasteado consiste en la transformación del sustrato vegetal en pasta de celulosa a través de la ruptura de las conexiones estructurales entre sus polímeros constituyentes, principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina. Este proceso puede ser mecánico, químico, biológico o mixto (Pourbafrani *et al.*, 2014). El objetivo de este proceso es eliminar la lignina (deslignificación) (Gellerstedt, 2009) y liberar las fibras celulósicas individuales. Así, los componentes celulósicos y parte de los hemicelulósicos de la biomasa inicial son utilizados para la fabricación de papel (Kramer *et al.*, 2009) y la fracción enriquecida en lignina se considera residual.

Entre los tipos de pasteados, los más extendidos para la producción de papel son los químicos, desde el fuertemente alcalino, hasta el fuertemente ácido. Los tres procesos de pasteado químico más

utilizados son el Kraft, pasteado al sulfito y pasteado a la sosa, siendo el pasteado Kraft el más extendido mundialmente.

La explotación industrial de la lignina residual presente en los licores de pasteado está recibiendo una especial atención por parte de los científicos y las industrias, debido a que su transformación en productos de alto valor comercial mejorará las emisiones de CO₂, la ganancia de energía neta, el manejo de los residuos y la rentabilidad de la industria de la celulosa y el papel (Ragauskas *et al.*, 2014). Por lo tanto, el uso de esta lignina para generar recursos útiles es un gran paso hacia la energía verde y la sostenibilidad ambiental (Mandeep *et al.*, 2020).

A continuación, se detallan los procesos que se han empleado en la presente Tesis para la obtención de diferentes ligninas residuales.

1.2.2.1. Proceso de pasteado Kraft

El proceso Kraft es uno de los procesos más importantes para la obtención de pasta de celulosa en las industrias pastero-papeleras, en el que se genera un residuo denominado licor negro, que posee una elevada concentración de lignina y que en la mayor parte de los casos se quema para obtener energía (Santos *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2018).

Cerca del 80% de la producción de pasta de papel se produce por esta vía, debido a que, la aplicación de este proceso permite obtener pastas más resistentes y blanqueables, utilizar una gran diversidad de especies de madera, ofrece una alta eficiencia en el reciclado de los agentes químicos empleados y utiliza ciclos cortos de cocción (Tagami, 2018).

En este proceso, la madera es generalmente tratada con un licor de cocción compuesto de una solución acuosa de hidróxido y sulfuro sódico a un pH de 13 -14, a una temperatura de 155-175 °C y con una presión de 7–10 bares. El tiempo de cocción, en condiciones de máxima temperatura, se encuentra alrededor de 1-2 horas. En estas condiciones, las fibras se liberan de la matriz de lignina y hemicelulosa mediante la disolución de la lignina y de buena parte de las hemicelulosas por acción de la lejía blanca (Chávez y Domine, 2013). Durante la cocción tienen lugar numerosas reacciones que conducen a la ruptura de los enlaces de la lignina. Las unidades monoméricas de lignina están unidas entre sí mediante diversos tipos de enlaces, siendo los enlaces eter β -O-4 el tipo de enlace dominante. Las principales reacciones de fragmentación de la lignina en medios alcalinos tienen lugar a través de la ruptura de los enlaces eter β -O-4 (Sjöström, 1993). La cantidad de enlaces

eter β -O-4 presentes en la lignina de la madera blanda es de aproximadamente el 45-50% y el 60% en la lignina de la madera dura (Santos *et al.*, 2012). Esta reacción no sólo conduce a la fragmentación de la lignina, sino también a la liberación simultánea de un nuevo grupo hidroxilo fenólico favoreciendo la disolución de la lignina en medio alcalino (Fearon *et al.*, 2020). Como resultado de este proceso, se obtiene una pasta de celulosa como producto básico para la obtención de papel y un licor negro enriquecido en lignina como residuo. A partir del licor negro se obtiene la lignina residual mediante precipitación con ácido.

1.2.2.2. Proceso de pastado a la sosa

El método comercial comúnmente utilizado para la producción de pasta de celulosa a partir de especies no leñosas es el proceso a la sosa, que utiliza como reactivo principal el hidróxido de sodio. (Potůček *et al.*, 2014). Dado que las fibras de las especies no leñosas tienen una estructura relativamente accesible y más bajo contenido en lignina que los materiales madereros, la temperatura para la fabricación de la pasta puede ser 160 °C o menor. Hay muchas similitudes entre las reacciones que se producen durante la fabricación de pasta a la sosa y la pasta tipo Kraft, tales como, la ruptura de enlaces entre la lignina y los

carbohidratos, la despolimerización de la lignina y su recondensación (Chavez y Domine, 2013; Potůček *et al.*, 2014). Estas reacciones varían en magnitud e importancia. Una de las reacciones de deslignificación más importantes y más frecuentes en la fabricación de pasta a la sosa es la reacción de escisión de enlaces β -O-4 no fenólicos, que puede tener lugar en condiciones alcalinas (Gellerstedt, 2009). La escisión del enlace β -O-4 no fenólico da como resultado la formación de un grupo final de lignina fenólica y un epóxido, que puede participar en otras reacciones a través de la activación nucleófila de NaOH (Holm, 2018). De la misma manera que en el proceso Kraft, se obtiene la pasta celulósica como producto principal y el licor de cocción enriquecido en lignina residual.

1.2.2.3. Características diferenciales de las ligninas residuales obtenidas en ambos procesos

Las características de las ligninas residuales dependerán no solamente de su origen (materia prima usada) sino también del proceso de extracción utilizado para su obtención (Tagami *et al.*, 2019; Sadeghifar y Ragauskas, 2020). Por ejemplo, el peso molecular promedio de las ligninas residuales se encuentra en el rango de 1000 a 20000 Da, pero resulta difícil definir el grado

de polimerización de una lignina en su estado natural, debido a que durante el proceso de extracción se fragmenta, experimentando cambios en sus propiedades físicas y químicas, generando fragmentos con altos contenidos fenólicos y fragmentos de bajo peso molecular (Ferreira, 2014).

Las ligninas residuales utilizadas en este trabajo derivan de los procesos del pastado Kraft y a la sosa. La lignina Kraft tiene bajo contenido en carbohidratos cuando se precipita con ácido y su peso molecular promedio puede variar aproximadamente desde 600 a 180000 Da (Tagami, 2018). Esta lignina presenta impurezas en su estructura como resultado de la formación de enlaces covalentes con especies de azufre, principalmente tioles. Estas impurezas pueden inhibir su valorización, sin embargo, tiene un gran número de grupos fenólicos lo cual hace su uso altamente atractivo.

Por ello, en la actualidad, muchos investigadores han centrado sus estudios en la incorporación de este residuo en diferentes segmentos de la industria, tales como en la producción de: pegamentos, adhesivos, antimicrobianos, antioxidantes, combustibles, bio-películas, resinas y bio-adsorbentes, entre otros (Rodríguez-Mirasol *et al.*, 1993;

Thielemans y Wool, 2004; Kouisni *et al.*, 2011; Berghel *et al.*, 2013; Klapiszewski *et al.*, 2015).

Por otro lado, la lignina obtenida en el proceso de pasteado a la sosa presenta alguna similitud con la lignina tipo Kraft ya que ambas son de bajo peso molecular, insolubles en agua, y se obtienen con bajos niveles de contaminantes. La lignina de sosa tiene una cantidad menor de cenizas y carbohidratos (Kumar *et al.*, 2020b). Entre las ligninas disponibles comercialmente, las ligninas tipo sosa son las únicas libres de azufre, siendo consideradas las más próximas a las naturales. Por tanto, este tipo de lignina es comúnmente utilizada en aplicaciones en las que se necesitan flujos térmicos y las emisiones de compuestos sulfurados volátiles son indeseables. (Chávez y Domine, 2013).

1.2.2.4. Principales aplicaciones de las ligninas residuales

En la Figura 1.6 se presentan algunos de los productos más representativos obtenidos por transformación de diferentes ligninas residuales (Gosselink, 2011).

Como se puede observar, las fibras de carbono, las resinas fenólicas y los productos químicos finos representan los productos de mayor valor agregado

derivados de este polímero (Gosselink, 2011).

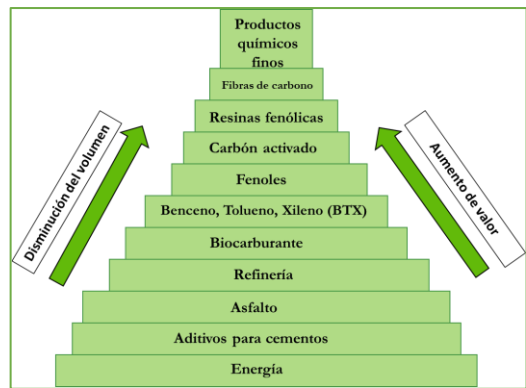


Figura 1.6. Potenciales aplicaciones de la lignina

Fuente: Gosselink, 2011.

A pesar del gran número de aplicaciones potenciales descritas, numerosos investigadores están dirigiendo actualmente sus investigaciones hacia la valorización de las ligninas residuales, con el objetivo central de modificar este compuesto polifenólico para convertirlo en valiosos productos químicos o hidrocarburos de calidad (Kumar y Dwivedi, 2020). Debido a la presencia en su estructura de un gran número de grupos funcionales, la lignina tiene un gran potencial para ser modificada química o biológicamente, lo que puede dar lugar a una mayor reactividad y conducir a la fabricación de materiales poliméricos de valor añadido con propiedades nuevas o mejoradas (Tagami, 2018) de potencial aplicación

en diferentes segmentos industriales. Entre estas aplicaciones se incluye su uso en la producción de biofenoles (Dessbesell *et al.*, 2020) y compuestos aromáticos (Abdelaziz y Hulteberg, 2017), para la conservación del suelo (Hu, 2002), producción de adhesivos (Ibrahim *et al.*, 2013), producción de biolubricantes (Blánquez *et al.*, 2017), resinas (El-Mansouri *et al.*, 2011), sustituto de resinas termoestables (Thielemans y Wool, 2005) o como protector solar en la industria cosmética (Widsten *et al.*, 2020)

Así mismo, las ligninas residuales pueden incorporarse sin ninguna modificación a otros polímeros comerciales, introduciendo así propiedades nuevas o mejoradas (Sahoo *et al.*, 2011a; Sahoo *et al.*, 2011b; Ji y Guo, 2018; Ravishankar *et al.*, 2019; Alzagameem *et al.*, 2019; Crouvisier-Urien *et al.*, 2019).

1.2.3. Quitina: naturaleza y principales fuentes

La quitina es el principal componente fibroso del exoesqueleto de artrópodos como el cangrejo, el camarón y la langosta, así como de la pared celular de algunos hongos. (Wu *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016). Es un polisacárido de unidades de N-acetil-glucosamina unidas por enlaces β -1,4 (poli β -N-acetil-

glucosamina). Es altamente insoluble en agua y disolventes orgánicos debido a los enlaces de hidrógeno que presenta la molécula, lo cual restringe sus aplicaciones (Balanta *et al.*, 2010). Sin embargo, presenta una tasa de reposición tan alta en la biosfera que se estima duplica a la de la celulosa, por lo que constituye un importante recurso reutilizable (Rinaudo y Goycoolea, 2019).

Con objeto de hacer uso de la quitina, la mayor parte de la misma se procesa para hacerla soluble, mediante una fuerte desacetilación alcalina para obtener quitosano (Lárez, 2008).

El quitosano, que es soluble en soluciones ácidas ($\text{pH} < 6,0$), se define como un derivado total o parcialmente desacetilado de la quitina y fue descubierto por Rouget en 1859 mientras calentaba quitina con hidróxido de potasio concentrado, lo cual indujo su desacetilación (Raafat *et al.*, 2008). Cuando la reacción de desacetilación elimina al menos un 50% de los grupos acetilos de la quitina, se convierte en quitosano (poli β -N-acetil-glucosamina-co- β -glucosamina), siendo la quitina y el quitosano copolímeros de la N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina unidas por enlaces glucosídicos (Figura 1.7).

Por otro lado, cuando el grado de desacetilación alcanza el 100%, el polímero se conoce como quitano.

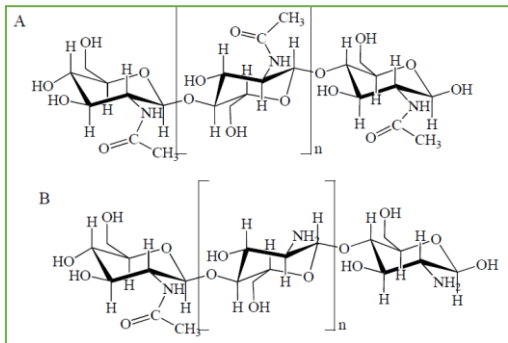


Figura 1.7. Estructura química de la quitina acetilada (A) y el quitosano (B)

Fuente: Aranaz *et al.*, 2009.

1.2.3.1. Exoesqueletos de crustáceos como fuente de quitina

En los últimos años, la industria de los crustáceos ha experimentado una expansión significativa, que en la actualidad se estima en un 9,6% de la producción acuícola mundial (FAO, 2018). En numerosos países, incluido España, la mayor cantidad de crustáceos se comercializa pelado; su transformación, por tanto, implica la eliminación de cabezas y caparazones, lo que representa una gran cantidad de residuos sólidos (40-50% del peso total). Estos residuos altamente perecederos son fuente de proteína (35-40%), quitina (10-15%), minerales (10-15%) y carotenoides (Sachindra *et al.*, 2005). La quitina se recupera principalmente de

los residuos producidos por la industria alimentaria marina donde sólo del 20 al 30% del peso vivo de estas especies se aprovecha como alimento humano y el 70-80 % corresponde a vísceras y exoesqueleto, obteniéndose entre el 20 y 30% de este biopolímero del tratamiento de estos residuos (Becerra-Jiménez *et al.*, 2011). El significativo incremento en la cantidad de residuos resultantes del procesamiento industrial de mariscos (conchas de cangrejo, camarones, gambas, krill y langostas) ha llegado a constituir un serio problema tanto para el medio ambiente como para las plantas de procesamiento. Alrededor de un 45% del marisco procesado procede de camarones, concretamente de su exoesqueleto y cefalotórax.

Particularmente, los exoesqueletos de camarón contienen una alta concentración de quitina, de la cual es posible obtener quitosano a través de un proceso químico de N-desacetilación, tal como se ha comentado previamente (Hernández-Cocoletzi *et al.*, 2009). Sin embargo, la extracción del polímero se ve limitada debido a la escasez del material residual en ciertas temporadas del año o tiempos de veda, y por esta razón, se pueden utilizar otras fuentes como las paredes celulares de los hongos (Nwe y Stevens, 2002). Así, la utilización de micelio fúngico residual proveniente de procesos industriales fermentativos

(Zhang *et al.*, 2000; Pleissner y Venus 2016) puede paliar la escasez estacional de estos polímeros. La quitina de la pared celular de hongos es fácilmente extraíble, y como el caso anterior, transformada en quitosano. El micelio de diversos hongos Ascomycetos incluyendo, *Zygomycetes*, *Basidiomycetes* y *Deuteromycetes*, se considera una fuente alternativa de quitina y quitosano (Khalaf, 2004).

1.2.3.2. Aplicaciones del quitosano

El quitosano ha despertado un gran interés científico e industrial desde finales de los años 70 debido a su particular estructura macromolecular, su biocompatibilidad, su biodegradabilidad y otras propiedades funcionales intrínsecas. El quitosano y sus derivados tienen aplicaciones prácticas en las industrias alimentaria, cosmética, farmacéutica, química, textil y papelería, así como aplicaciones en medicina (Morin-Crini *et al.*, 2019). Sin embargo, las propiedades mecánicas relativamente deficientes de este polímero y su baja solubilidad (en determinadas condiciones) y estabilidad térmica restringen su aplicación. En la actualidad, un tema constante en la investigación de nuevos materiales es la modificación de los polímeros naturales, lo que da lugar al desarrollo de nuevos derivados con propiedades únicas

(Argüelles-Monal *et al.*, 2018). En el caso del quitosano, por ejemplo, su mezcla con otros polímeros, así como lograr introducir modificaciones químicas y/o biológicas en su estructura, están siendo considerados una forma prometedora de ampliar su rango de aplicación (El-Hefian *et al.*, 2014; Negm *et al.*, 2020; Bakshi *et al.*, 2020).

1.3. Transformación de residuos lignocelulósicos por Actinobacterias

De todos los grupos bacterianos en los que se ha descrito su implicación en la biodegradación de la lignocelulosa, cabe destacar las Actinobacterias y dentro de éstas su género más representativo, el género *Streptomyces* (Berrocal *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2005; Blánquez *et al.*, 2017; Borrero-López *et al.*, 2017). En los últimos 20 años, la elucidación del mecanismo degradativo utilizado por este género con vistas a su aplicación biotecnológica y/o ambiental ha sido uno de los principales objetivos del grupo de degradación microbiana de la lignocelulosa (MICRODEG) de la Universidad de Alcalá (UAH).

1.3.1. Bases del proceso de fermentación en estado sólido (SSF)

Se denomina proceso de fermentación en estado sólido (SSF) a cualquier proceso biotecnológico en el que los

microorganismos se desarrollan sobre materiales insolubles o sustratos sólidos en ausencia de agua libre (Bhargav *et al.*, 2008). Estas características se ajustan bien al Plan de Acción de Economía Circular de la Comisión Europea que comprende varias acciones para promover la eficiencia de los recursos y los procesos hacia un mundo más sostenible con menos producción de residuos (Estrategia Española de Bioeconomía: Horizonte 2030, 2015).

En la actualidad, las aplicaciones de estos procesos SSF a partir de residuos agrícolas son muy diversas y entre ellas cabe señalar el pretratamiento de los mismos para obtener pasta de papel (bio-pasteo), estimulación del crecimiento microbiano para la producción de cultivos iniciadores (starters) o la producción de metabolitos de alto valor (ácidos orgánicos, pigmentos, aromas) y enzimas (Bourgine *et al.*, 2021).

Diversos autores han comparado la eficacia de los procesos de fermentación en estado sólido y en cultivo sumergido, estableciendo una serie de ventajas e inconvenientes para la SSF (Hesseltine, 1972; Cannel y Moo-Youn, 1980; Nigan y Sigh, 1994; Shraddha y Joshi, 2020).

La SSF es un sistema más parecido a las condiciones naturales y al utilizar menos

volumen de agua se reducen el volumen del fermentador y los costes de producción, disminuyendo la cantidad de efluentes contaminantes; la aireación es más sencilla y no necesita agitación o mezclado continuo, lo que facilita el escalado, utilizando, en general, reactores de diseño sencillo. Sin embargo, presenta gran dificultad para la cuantificación de la biomasa debido a la dificultad para separar el micelio del residuo sólido, el sustrato requiere un pretratamiento como molienda, homogeneizado o pre-hidrólisis y resulta necesario utilizar volúmenes de inóculos grandes.

Por otra parte, presenta dificultad para el mantenimiento y control de variables y a esto hay que añadir las numerosas interrelaciones existentes entre los diferentes parámetros involucrados en el proceso, con la consiguiente generación de datos limitados y dispersos, por lo que la aplicación de modelos matemáticos para la predicción eficaz y optimización de datos puede suponer una herramienta valiosa para superar dichos inconvenientes (Figura 1.8) (Manan y Webb, 2017).

Entre los factores que se deben optimizar para conseguir el éxito de un proceso SSF cabe destacar, el tamaño de partícula del sustrato, el tipo de inóculo, nivel de humedad/actividad de agua

(aw), la temperatura, el pH y la transferencia de oxígeno. La selección del sustrato va a depender de varios factores, tales como coste y disponibilidad, y se debe tener en cuenta que el sustrato no sólo aporta los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo, sino que sirve también de anclaje para las células microbianas (Couto y Sanromán, 2006).

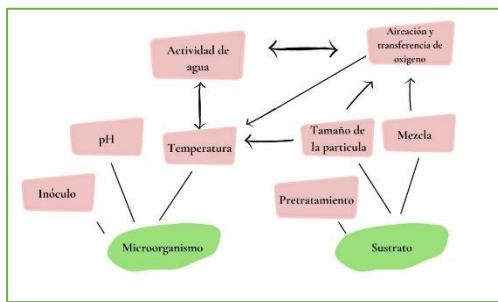


Figura 1.8. Esquema de las interacciones de los factores que afectan al proceso SFF

Fuente: Manan y Webb, 2017.

1.3.2. Importancia del género *Streptomyces* en la degradación de lignocelulosa.

1.3.2.1. Características generales del género *Streptomyces*

El género más representativo dentro del orden Actinomycetales es *Streptomyces*, que se encuadra dentro de la familia *Streptomycetaceae* de la clase Actinobacteria (Goodfellow y Cross, 1984). Está constituido por bacterias

filamentosas Gram positivas que tienen un ciclo de vida complejo y muy diferenciado, tanto morfológica como fisiológicamente (Figura 1.9). El ciclo comienza con la germinación de esporas monogenómicas, las cuales en condiciones de cultivo adecuadas germinan, dando lugar a un entramado de hifas que constituyen el micelio sustrato fuertemente adherido al medio sólido (Champness, 2000). La capacidad de este microorganismo de excretar enzimas hidrolíticas facilita la descomposición de los nutrientes del medio para la obtención de componentes de reserva y metabolitos secundarios. Cuando se agotan los nutrientes del medio, el crecimiento vegetativo se detiene y empiezan a desarrollarse hifas menos ramificadas que forman el micelio aéreo, el cual se eleva sobre el micelio sustrato para facilitar la dispersión (Chater *et al.*, 2010).

Este micelio aéreo se desarrolla a expensas del micelio sustrato y, sus hifas, altamente hidrofóbicas, se alargan y sufren un proceso de curvatura, de forma espiral en muchas especies y el filamento se tabica de manera múltiple. Cada uno de los compartimentos monogenómicos formados, dará lugar a las llamadas conidiosporas. Tras la maduración de las conidiosporas, se dispersan para colonizar nuevos nichos e iniciar un nuevo ciclo biológico (Jones y Elliot, 2018). Se ha descrito un nuevo modelo del ciclo de *Streptomyces*, donde se diferencian dos tipos de micelio-

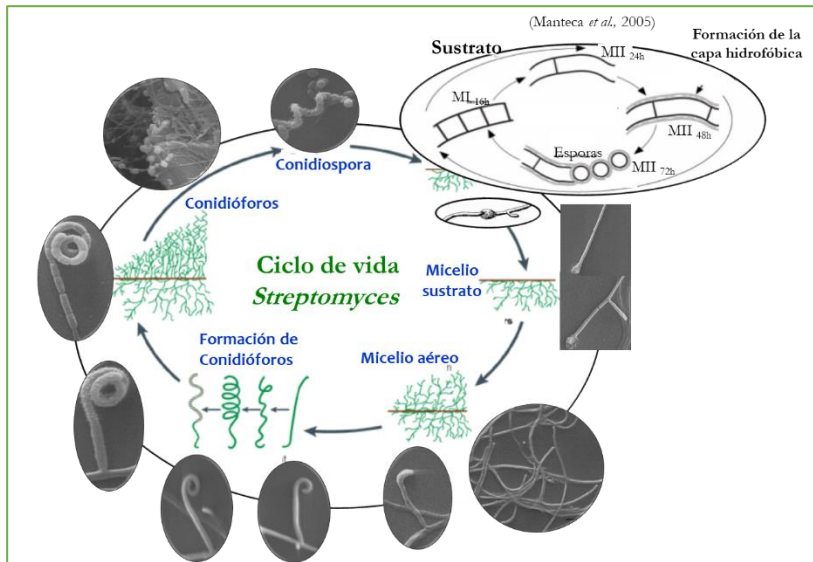


Figura 1.9. Ciclo de vida de *Streptomyces*, donde se muestran las distintas etapas del proceso de diferenciación celular del microorganismo.

sustrato, uno que se desarrolla tras la germinación de las esporas dando lugar a hifas formadas por segmentos vivos y muertos, y un micelio secundario, formado a partir de los segmentos viables del micelio primario (Manteca *et al.*, 2005). Este micelio secundario puede ser considerado como el complejo micelio sustrato de los anteriores ciclos descritos, donde se comenzaría a sintetizar la cubierta proteica hidrofóbica, desarrollándose así el micelio aéreo que terminaría con la esporulación (Blánquez, 2015).

En cuanto a su exigencia nutricional, los estreptomicetos son quimiorganotrofos, pudiendo utilizar una amplia gama de compuestos como fuente de carbono, tales como azúcares, alcoholes,

aminoácidos, ácidos orgánicos y algunos compuestos aromáticos. Adicionalmente, la mayoría producen enzimas extracelulares, lo cual les permite utilizar compuestos más complejos como almidón y celulosa, hidrocarburos, lignina, taninos, etc. (Madigan *et al.*, 2004).

Por último, cabe destacar la gran importancia biotecnológica de estas bacterias como productoras de una gran variedad de metabolitos secundarios bioactivos entre los que cabe señalar: antibióticos, agentes antitumorales, inmunosupresores, antivíricos, antifúngicos, insecticidas, sideróforos, antiparasitarios, inhibidores de enzimas, pigmentos, inmunomoduladores, estimuladores del crecimiento de

plantas, herbicidas y muchos otros (Kieser *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2003; Hopwood, 2007).

1.3.3. Sistemas enzimáticos implicados en la biotransformación de lignocelulosa por *Streptomyces*

Las enzimas como biocatalizadores industriales ofrecen numerosas ventajas sobre los procesos químicos tradicionales en lo que respecta a la sostenibilidad y la eficiencia del proceso. La catálisis enzimática se ha aplicado para procesos comerciales en las industrias farmacéutica, alimentaria y de bebidas (Chapman *et al.*, 2018).

La capacidad de *Streptomyces* para colonizar diferentes hábitats va unida a una gran diversidad metabólica, jugando un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos de degradación. Esta alta capacidad degradativa se debe a la producción de un arsenal de enzimas extracelulares que les permiten degradar polímeros insolubles de material orgánico presente en el suelo, restos vegetales e incluso pequeños organismos que les sirven de sustento (McCarthy y Williams, 1992). Entre las enzimas implicadas en la degradación de distintos polímeros naturales cabe destacar enzimas hidrolíticas tales como xilanasas (López *et al.*, 1998; Antonopoulos *et al.*, 2001), mananasas

(Montiel *et al.*, 2002), celulasas (Deobald y Crawford, 1987), quitinasas (Kawase *et al.*, 2006), proteasas (Rao *et al.*, 1998) y amilasas (Yin *et al.*, 1997), entre otras.

Así mismo, estos microorganismos tienen la capacidad de producir enzimas de carácter oxidativo, como es el caso de peroxidasas y lacasas. En cuanto al papel que juegan los estreptomicetos en la deslignificación de la lignocelulosa, se ha descrito la implicación de las lacasas y peroxidasas antes mencionadas, cuya acción sobre el residuo lignocelulósico produce la solubilización del polímero de lignina en forma de APPL (Polímero de Lignina Precipitable por ácidos) (Crawford, 1978) y la oxidación de sus unidades fenólicas constituyentes (Blánquez *et al.*, 2017)

Es importante destacar el potencial interés industrial de estas enzimas para el blanqueo de la pasta de papel, la deslignificación y la degradación de contaminantes industriales (Antonopoulos *et al.*, 2001; Arias *et al.*, 2003; Skálová *et al.*, 2009; Molina-Guijarro *et al.*, 2009; Eugenio *et al.*, 2011; Martín-Sampedro *et al.*, 2015; Blánquez *et al.*, 2016). También se ha demostrado el potencial de las lacasas como agente polimerizante, lo que abre una nueva posibilidad de uso de estas enzimas en diferentes segmentos industriales (Moya *et al.*, 2011).

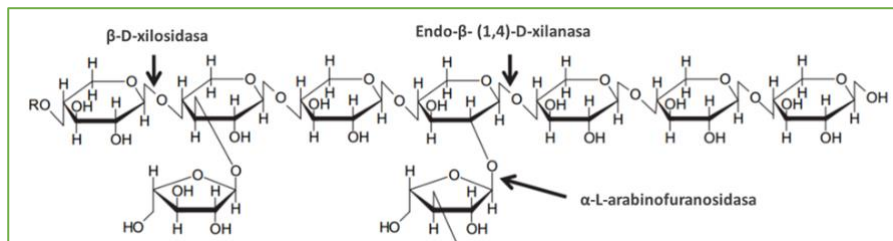


Figura 1.10. Modo de acción de la xilanasas

Fuente: Dornez *et al.*, 2009.

1.3.3.1. Xilanasas

Las xilanasas son enzimas que degradan el xilano, que es un heteropolisacárido muy abundante en la naturaleza, justo detrás de la celulosa y, por tanto, una fuente muy importante de carbono renovable (Bajpai, 2014).

Las xilanasas (3.2.1.8) son enzimas que hidrolizan los enlaces glicosídicos β-1,4 del xilano. El modo de acción de estas enzimas sobre el xilano se muestra en la Figura 1.10. Como se puede observar, el complejo xilanasas está compuesto por un repertorio de enzimas hidrolíticas, unas que atacan la cadena principal, β-1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8), que rompen enlaces en el interior de la molécula dando lugar a xilooligosacáridos, y β-xilosidasas (EC 3.2.1.37) que atacan los xilooligosacáridos dando xilosa, y las llamadas enzimas accesorias que eliminan los residuos de las cadenas laterales (α-L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) (Dornez *et al.*, 2009).

Las xilanasas son actualmente consideradas enzimas de gran interés biotecnológico, habiendo demostrado su utilidad en varios procesos industriales. De hecho, estas enzimas se utilizan, entre otras aplicaciones, en el tratamiento de piensos para liberar azúcares de tipo pentosa, en el blanqueo biológico de las pastas de papel, como aditivos alimentarios en la industria panificadora y cervecera, como ingredientes de detergentes para el lavado de ropa o como preparaciones para el cuidado de tejidos (Juturu y Wu, 2012; Shrivastava *et al.*, 2016).

Es precisamente la capacidad de las endo-β-1,4-xilanasas para disminuir la viscosidad de los xilanos de cereales, la base para su aplicación en la industria panadera y en la obtención de alimentos para animales (Juturu y Wu, 2012). Para su utilización en la producción de xilooligosacáridos utilizados como aditivos alimentarios y prebióticos, no se requiere la presencia de enzimas

desramificantes y desesterificantes (Samanta *et al.*, 2015).

1.3.3.2. Mananasas

Los mananos son el componente principal de la fracción de hemicelulosa de las maderas blandas y de estructuras especializadas como semillas de plantas, donde juegan un papel importante en la resistencia mecánica (Zhang *et al.*, 2000; Beg *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2002). La estructura y naturaleza heterogénea de los mananos requiere para su degradación de la estrecha asociación y sinergia de una gran diversidad de enzimas tales como β -mananasa (EC 3.2.1.78), exo β -manosidasa (EC 3.2.1.25), β -glucosidasa (EC 3.2.1.21), acetil manano esterasas (EC 3.1.1.6) y α -galactosidasa (EC 3.2.1.22) (Kumar y Kapoor, 2017)

Las β -mananasas (β -1,4-d-manano mananohidrolasas) (EC 3.2.1.78) son hidrolasas de tipo endo que catalizan la hidrólisis aleatoria de enlaces manosídicos β -1,4 en los polisacáridos β -1,4-manano, glucomanano y galactomanano, liberando β -1,4 mananooligosacáridos cortos que pueden hidrolizarse a manosa por β -manosidasas (Dhawan y Kaur, 2007; Moreira y Filho, 2008). Las mananasas son utilizadas en varios procesos industriales, como la extracción de

aceites vegetales de semillas de leguminosas y la reducción de la viscosidad de los extractos de café durante la fabricación de café instantáneo (Tamaru *et al.*, 1995; Kansoh y Nagieb, 2004; Dhawan y Kaur 2007). Así mismo, en la industria de pastas de celulosa y el papel, las mananasas pueden actuar como agentes biológicos en el bioblanqueo de pastas de maderas blandas (Zhang *et al.*, 2000; Clarke *et al.*, 2000). Se ha descrito la capacidad de la endo- β -mananasa producida por *Streptomyces ipomoeae* para mejorar la calidad de la pasta Kraft de pino, que se puso de manifiesto por un aumento de la blancura de la pasta y la ausencia en la variación de los valores de viscosidad. Así mismo, la utilización de las enzimas en el blanqueo de las pastas de celulosa supone un ahorro en el consumo de productos químicos y una disminución de las cargas ambientales (Montiel *et al.*, 2002).

1.3.3.3. Lacasas

Las lacasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, habiéndose descrito para estas enzimas una gran diversidad de funciones y la característica de presentar una amplia especificidad de sustrato (Machczynski *et al.*, 2004).

Las lacasas (benzenodiol:dioxígeno oxidorreductasas, E.C. 1.10.3.2) pertenecen a la familia de las oxidorreductasas multicobre (MCOs), que se caracterizan por poseer átomos de cobre en su centro activo (Reinhammar y Malmström, 1981). Catalizan la oxidación de un amplio rango de moléculas fenólicas a radicales fenoxilo y también aminas aromáticas, utilizando el oxígeno como aceptor final de electrones en un proceso acoplado a la reducción del oxígeno a agua (Thurston, 1994; Solomon *et al.*, 1996;).

La arquitectura del polipéptido consiste típicamente en tres dominios de tipo cupredoxina, unidad básica de las oxidasas multicobre y de otras proteínas del cobre (Nakamura y Go, 2005) Entre las bacterias se han descrito lacasas con tres dominios en *Escherichia coli* (CueO) (Lawton *et al.*, 2009) y *Bacillus subtilis* (CotA) (Martins *et al.*, 2002), pero las más comunes en este grupo de microorganismos son las lacasas con dos dominios de tipo cupredoxina como es el caso de las llamadas lacasas pequeñas (SLACs) en los géneros *Streptomyces* (Majumdar *et al.*, 2014; Blánquez *et al.*, 2017), *Amycolatopsis* (Singh *et al.*, 2017a) y *Nitrosomonas* (Lawton *et al.*, 2009), entre otros.

Las unidades no fenólicas de la lignina son, sin embargo, recalcitrantes a la acción directa de las lacasas (Huber *et al.*,

2016). La oxidación de estas unidades requiere la participación de pequeñas moléculas de naturaleza aromática conocidas como mediadores, denominándose al sistema oxidativo en su conjunto sistema lacasa-mediador o LMS. En este sistema, la lacasa oxida en primer lugar al mediador y el mediador oxidado oxida a continuación las unidades no fenólicas de la lignina, lo que amplía el rango oxidativo de las lacasas (Bourbonnais y Paice, 1990; Christopher *et al.*, 2014).

Aunque las lacasas de hongos presentan un potencial de oxidación 100 veces superior al de las bacterias, suelen tener unos márgenes de actuación de pH y temperatura más restringidos. El hecho de que las lacasas bacterianas presenten una mayor versatilidad de actuación en un margen más amplio de condiciones ambientales y una mayor facilidad de manipulación genética ha dado lugar a que estas enzimas se contemplen en la actualidad como una alternativa muy interesante a las lacasas fúngicas con vistas a su utilización en diversas aplicaciones industriales y actividades destinadas a la protección ambiental.

Se ha descrito que las lacasas desempeñan diversas funciones en la naturaleza y en los organismos que las producen, entre las que cabe señalar: la síntesis y degradación de la lignina,

pigmentación, esporulación, patogenicidad y desintoxicación de fenoles (Blánquez *et al.*, 2017).

Las lacasas han recibido mucha atención de los investigadores en las últimas décadas debido a su capacidad para oxidar compuestos fenólicos y no fenólicos (en asociación con mediadores, sistemas LMS) relacionados con la lignina, así como contaminantes ambientales altamente recalcitrantes, lo que las hace muy útiles para ser aplicadas en varios procesos biotecnológicos (Couto y Herrera, 2006; Molina-Guijarro *et al.*, 2009; Moya *et al.*, 2011; Blánquez *et al.*, 2016; Dash y Sahoo, 2021).

Así mismo, se ha demostrado la capacidad de la lacasa de *Streptomyces ipomoeae* (SilA) para polimerizar las ligninas, como consecuencia del aumento de la reactividad de sus moléculas. Los resultados obtenidos con SilA han revelado que esta enzima tiene potencial para ser aplicada en la modificación de ligninas residuales derivadas de procesos industriales para obtener biopolímeros de alto valor añadido y otros materiales de interés tecnológico (Moya *et al.*, 2011).

1.4. Oleogeles e hidrogeles de interés industrial: necesidad de nuevas formulaciones con criterios sostenibles

Como se ha comentado anteriormente, en los últimos años se ha incentivado la investigación en el desarrollo de nuevos materiales “eco-amigables” en prácticamente todas las áreas industriales debido a la conciencia social de proteger el medio ambiente; en este aspecto, los polímeros biodegradables encajan a la perfección con ese objetivo. Así mismo, el uso de materias primas abundantes como la lignina y el quitosano resulta de gran interés para lograr con éxito su biotransformación y generación de productos de interés industrial, tales como oleogeles e hidrogeles, que hemos planteado como objetivo fundamental de este trabajo.

1.4.1. Oleogeles

Los oleogeles son sistemas microestructurados complejos compuestos por un disolvente orgánico hidrofóbico y una sustancia, frecuentemente una molécula anfifílica, capaz de formar una red tridimensional que inmoviliza el medio continuo (Hinze *et al.*, 1996).

Los oleogeles pueden tener varias aplicaciones industriales y en este trabajo nos centramos en evaluar su idoneidad para fabricar grasas lubricantes. La American Society for Testing and Materials (ASTM) define una grasa lubricante como un material sólido, o semi-fluido, constituido por un agente

espesante disperso en un líquido lubricante, donde pueden ser incluidos otros ingredientes, para mejorar ciertas propiedades específicas, tales como su estabilidad mecánica, resistencia a la corrosión, consistencia, color, resistencia al calor, entre otros (ASTM, 2015). Por tanto, las grasas lubricantes se pueden considerar suspensiones coloidales en las que un agente espesante sólido, normalmente un jabón metálico (Núñez *et al.*, 2011), se encuentra disperso en una matriz líquida, por lo general un aceite mineral, formando un entramado tridimensional tipo gel. La consistencia de la grasa es determinada, fundamentalmente, por la estructura base que forma el espesante cristalizado, normalmente formando entrelazamientos, y que da lugar a una estructura fibrosa donde el aceite se encuentra atrapado. La forma de este esqueleto base es controlada mediante tratamientos termo-mecánicos durante la preparación de la grasa lubricante (Sánchez *et al.*, 2011a).

Se estima un consumo global de grasas lubricantes de 1,3 millones de toneladas, y solamente el 1% de las mismas son producidas a partir de aceites biodegradables (Panchal *et al.*, 2017). Por esta razón, existe una preocupación generalizada en este sector por reemplazar los componentes de las grasas no biodegradables por otros

biodegradables de forma que las grasas lubricantes mantengan su funcionalidad, pero con un menor impacto sobre el medioambiente. En este sentido, el número de publicaciones científicas relacionadas con el desarrollo de biolubricantes se ha visto incrementado en los últimos años (Singh *et al.*, 2017b; Zainal *et al.*, 2018).

Dado que el componente mayoritario de una grasa lubricante es el aceite base, la mayoría de las investigaciones se centraron en un principio en obtener formulaciones biodegradables reemplazando los aceites minerales tradicionalmente empleados por aceites de origen vegetal, aun manteniendo espesantes metálicos en la formulación (Adhvaryu *et al.*, 2005). Sin embargo, puesto que el contenido en espesante puede oscilar entre un 3% y un 30% en peso, y dado que los espesantes con mejores prestaciones son los jabones de litio, surge una clara necesidad de desarrollar nuevos agentes espesantes renovables que confieran prestaciones técnicas adecuadas. Por todo ello, el desarrollo de bioespesantes a partir de polímeros naturales, supone una alternativa medioambientalmente respetuosa a los polímeros sintéticos procedentes de la industria petroquímica (poliuretanos, polipropileno, polietileno, etc) que, o bien no son biodegradables, o bien resultan de procesos de

producción altamente tóxicos para el ser humano.

Entre los polímeros naturales, se encuentran algunos materiales celulósicos como las pastas de papel y diferentes derivados de la celulosa que ya han sido probados como espesantes para la producción de bio-lubricantes (Borrero-López *et al.*, 2020). En este estudio, se obtuvieron bio-lubricantes con propiedades reológicas comparables a las mostradas por las grasas lubricantes tradicionales, pero las estabilidades físicas y mecánicas fueron ligeramente inferiores. Por todo lo anterior, la aplicación de la lignina como agente espesante para la fabricación de grasas lubricantes como una nueva vía de valorización aún mejoras ecológicas, económicas y sociales (Borrero-Lopez *et al.*, 2018b). De aquí que el diseño de estrategias que permitan mejorar la reactividad de la lignina, de tal forma que su posterior interacción con el aceite lubricante sea eficiente, sin afectar a los parámetros que definen su calidad, sea un reto en la investigación actual.

1.4.2. Hidrogeles

Los hidrogeles son redes tridimensionales, flexibles y porosas que se hinchan en agua y fluidos biológicos debido a la presencia de grupos

hidrófilos como el hidroxilo, el carboxilo y la amida (Hoffman, 2012). La gelificación puede lograrse mediante diversos mecanismos, que abarcan el entrelazamiento físico de las cadenas de polímeros, las interacciones electrostáticas y la reticulación química covalente (Zhang y Khademhosseini, 2017). Estos polímeros se preparan según su aplicación en forma de esfera (Farhoudian *et al.*, 2016), película (Zhou *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015), anillo (Zhou *et al.*, 2017) y membranas tubulares (Li *et al.*, 2019).

La naturaleza rica en agua de los hidrogeles los hace ampliamente aplicables a muchas áreas de la industria. Sin embargo, en general, estos materiales presentan una baja resistencia mecánica y una alta sensibilidad a las condiciones ambientales. Por esta razón, se han realizado numerosos intentos para desarrollar películas basadas en mezclas de diferentes biopolímeros o conteniendo rellenos (Rhim *et al.*, 2013), plastificantes naturales (Vieira *et al.*, 2011) o nanopartículas (Rhim y Ng, 2007), con el objetivo de mejorar sus propiedades específicas, especialmente en la industria del plástico.

Como biopolímero fenólico de carácter residual, la lignina ofrece un atractivo potencial como relleno y aditivo, especialmente con respecto a la

modificación de polímeros biodegradables. Se han descrito diversos trabajos sobre termoplásticos rellenos de lignina, como es el caso de los constituidos por polipropileno (Toriz *et al.*, 2002), proteína de soja (Chen *et al.*, 2006), ácido láctico (Li *et al.*, 2003), policaprolactona (PCL) (Nitz *et al.*, 2001) y otros polímeros biodegradables. Los resultados han mostrado que normalmente la adición de lignina deteriora las propiedades mecánicas de los plásticos debido a su baja miscibilidad. Sin embargo, en algunas investigaciones se ha logrado el aumento de la resistencia a la tracción y la temperatura de transición vítrea al añadir lignina (Chen *et al.*, 2009; Ji y Guo, 2018).

Lamentablemente, el quitosano y la lignina son polímeros no compatibles con la termodinámica, ya que el quitosano es un polímero hidrófilo, mientras que la lignina es hidrofóbica. Por lo tanto, su combinación conduce a un sistema bifásico con una distribución de agregados de lignina (Núñez-Flores *et al.*, 2013). En la preparación de hidrogeles de quitosano, la incorporación de lignina genera pequeños agregados distribuidos homogéneamente en la película, los cuales debilitan ligeramente la red, reflejándose en las propiedades mecánicas (Crouvisier-Urión, *et al.*,

2017). Para tratar de paliar estos problemas, se están desarrollando estudios encaminados hacia la búsqueda de estrategias que utilizan métodos físicos, químicos o biológicos para mejorar la compatibilidad entre el quitosano y la lignina, teniendo como base las grandes ventajas que ofrecen ambos polímeros para ser utilizados con fines industriales.

Planteamiento del trabajo y objetivos

2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

Este trabajo se enmarca dentro de la línea de investigación del grupo MICRODEG de la Universidad de Alcalá, que se desarrolla en el Departamento de Biomedicina y Biotecnología desde hace varios años. Dentro de esta línea se han aportado resultados importantes relacionados con la elucidación de los sistemas enzimáticos implicados en la degradación de los componentes principales de la lignocelulosa por cepas seleccionadas de *Streptomyces*. Entre estas aportaciones cabe destacar el aislamiento y caracterización de distintos grupos de enzimas tales como xilanasas, mananasas, esterases, peroxidasas y lacasas producidas por este microorganismo tanto en cultivo sumergido como en fermentación en estado sólido (SSF). Además, se han realizado estudios para conocer el potencial de aplicación de estos microorganismos y/o sus enzimas en procesos industriales y medioambientales. Así, se ha demostrado su adecuación para ser utilizados en distintas etapas de la fabricación de pasta de celulosa y papel (biopasteo de residuos agrícolas y de maderas, bioblanqueo de pastas químicas de celulosa), así como en la decoloración y detoxificación de efluentes (licores negros) derivados de esta industria. En cuanto a las aplicaciones medioambientales se ha

demostrado la capacidad de estos microorganismos para degradar y detoxificar una gran diversidad de colorantes textiles y contaminantes emergentes presentes en el agua. Entre las enzimas caracterizadas destaca por sus propiedades físico-químicas y catalíticas la lacasa producida por *Streptomyces ipomoeae* (Si1A), la cual ofrece un potencial de actuación en un rango muy amplio de pH y temperatura, características de gran interés con vistas a su aplicación industrial.

Actualmente, el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos con fines tecnológicos se contempla como un reto importante en investigación. Uno de los ejemplos lo constituye la industria de fabricación de lubricantes que está interesada en sustituir espesantes de origen químico (jabones de litio) por otros materiales biodegradables. Hasta el momento, se han hecho intentos de utilizar materiales celulósicos como pastas de papel y diferentes derivados de la celulosa como espesantes para la producción de bio-lubricantes, y aunque sus propiedades reológicas resultaron comparables a las mostradas por las grasas lubricantes tradicionales, su estabilidad física y mecánica no alcanzaron los estándares comerciales. A partir de este resultado nos planteamos en este trabajo comprobar si residuos agrícolas fermentados por cepas seleccionadas de *Streptomyces* pudieran resultar adecuados para ser utilizados

como agentes espesantes de oleogeles en la fabricación de lubricantes.

Por otro lado, nuestro interés por la búsqueda y aprovechamiento de materias primas renovables nos ha conducido a analizar si polímeros residuales de la industria papelera como lignina Kraft o álcali lignina y desechos de la industria pesquera como quitina y su derivado quitosano pudieran ser revalorizados y transformados en productos de alto valor añadido. Sin embargo, la baja reactividad de las ligninas y las limitaciones físico-químicas del quitosano suponen un impedimento a su posible utilización. De aquí, nuestro interés en utilizar la lacasa SilA antes mencionada para funcionalizar (incrementar la reactividad) las ligninas residuales y analizar si los polímeros resultantes de la acción enzimática también pueden ser susceptibles de ser utilizados como espesantes en la fabricación de grasas lubricantes. Por otro lado, nos planteamos también estudiar si la utilización conjunta de las ligninas residuales funcionalizadas con SilA y el quitosano, permite mejorar la compatibilidad de ambos polímeros y ampliar como consecuencia el rango de aplicaciones industriales de los hidrogeles obtenidos.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es diseñar nuevas formulaciones de oleogeles e hidrogeles con proyección industrial haciendo uso

de polímeros residuales transformados por *Streptomyces* y/o sus enzimas, y lograr que cumplan a su vez las exigencias actuales de sostenibilidad medioambiental.

Los objetivos específicos de esta Tesis se detallan a continuación:

- 1.- Optimizar, mediante aplicación del método estadístico OPLS-DA, el proceso de fermentación en estado sólido (SSF) de paja de trigo y paja de cebada por cepas seleccionadas de *Streptomyces*.
- 2.- Elaborar y caracterizar nuevos oleogeles utilizando como espesante paja de trigo fermentada por *Streptomyces*.
- 3.- Optimizar mediante la aplicación del Método de Superficie de Respuesta (MSR), el proceso de polimerización de lignina Kraft y álcali lignina de paja de trigo llevado a cabo con la lacasa SilA de *S. ipomoeae*.
- 4.- Desarrollar y caracterizar los oleogeles obtenidos al utilizar como espesante las ligninas residuales funcionalizadas con SilA.
- 5.- Formular, caracterizar y explorar posibles aplicaciones tecnológicas de los hidrogeles obtenidos con distintas proporciones de quitosano y ligninas residuales funcionalizadas con SilA.
- 6.- Analizar la biodegradabilidad y ecotoxicidad de los oleogeles e hidrogeles obtenidos.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Fermentación en estado sólido (SSF) de residuos agrícolas

3.1.1. Microorganismos utilizados

Para la realización de este trabajo se utilizaron dos cepas de *Streptomyces* aisladas en nuestro laboratorio a partir de distintos tipos de suelos y que fueron denominadas *Streptomyces spp.* MDG 301 y *Streptomyces spp.* MDG 147. Dichas cepas se encuentran depositadas en la colección de microorganismos del Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá.

3.1.2. Mantenimiento y conservación de los microorganismos

Los microorganismos se cultivaron rutinariamente hasta su esporulación en placas Petri que contenían el medio de cultivo ISP 2 (International *Streptomyces* Project) de la siguiente composición (g L⁻¹): extracto de levadura, 4; extracto de malta, 10; dextrosa, 4; agar, 20. El pH del medio se ajustó a 7,2 y posteriormente se esterilizó a 121 °C durante 20 min.

Las placas inoculadas con suspensiones de esporas de la cepa *S.* MDG 147 se incubaron a 28 °C hasta alcanzar un adecuado grado de desarrollo y

esporulación del micelio (5-7 días) y las placas correspondientes a la cepa *S.* MDG 301, se incubaron a 45 °C hasta alcanzar la esporulación del micelio (2-4 días). Para su conservación durante largos períodos de tiempo, suspensiones de esporas de cada cepa, una vez eliminados los restos de micelio por filtración, se cubrieron con 5 ml de glicerol al 20 % (v/v) y se mantuvieron a -20 °C.

3.1.3. Sustratos y condiciones de fermentación

Como sustratos de la fermentación SSF se utilizaron dos residuos agrícolas muy abundantes en España como son la paja de trigo (*Triticum aestivum var. maestro*) y paja de cebada (*Hordeum vulgare*) que fueron amablemente proporcionados por agricultores de Guadalajara (España). Ambos sustratos se molieron en un molino de aspas (Janke & Kunkel) con el fin de obtener un tamaño de partícula de 40 mesh y se esterizaron posteriormente en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

El preinóculo se preparó mediante el cultivo de suspensiones estandarizadas de esporas de las cepas *S.* MDG 301 y *S.* MDG 147 (10⁷ ufc mL⁻¹) en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían medio basal salino (MBS) (Crawford, 1978) modificado de la siguiente

composición (g L^{-1}): KH_2PO_4 , 1; Na_2HPO_4 , 1,6; NaCl , 0,2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,058; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2. Al medio se le añadió además 1 mL L^{-1} de una solución de oligoelementos cuya composición en g L^{-1} es la siguiente: $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,64; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,11; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,79; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15. El medio se esterilizó a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos. Los cultivos se incubaron en agitación (200 rpm) a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ o $45 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento.

Los sustratos, una vez esterilizados, se distribuyeron en un fermentador constituido por bandejas de acero inoxidable y se suplementaron con medio de cultivo MBS estéril ($5,4 \text{ mL g}^{-1}$ de sustrato) hasta alcanzar una humedad del 85%. Esta humedad que se mantuvo durante el proceso de fermentación mediante el soplado de aire estéril humidificado y filtrado a través de una membrana con un tamaño de poro $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ cada 12 h. Los sustratos, una vez inoculados con el micelio de cada cepa (preinóculo), se incubaron a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ o $45 \text{ }^\circ\text{C}$, de acuerdo con la cepa utilizada durante 7 días. En el transcurso del proceso de fermentación, se tomaron muestras de los cultivos, en las que se evaluó la producción de distintas actividades enzimáticas y se determinaron los rendimientos de APPL y de álcali lignina. Como control se utilizaron

sustratos no inoculados sometidos a las mismas condiciones de fermentación.

3.1.4. Valoración de actividades enzimáticas producidas en SSF

Para la valoración de las actividades enzimáticas, se extrajeron del fermentador 10 g d de cada uno de los sustratos transformados por las cepas con 15 mL de agua destilada a los 2, 4 y 7 días de incubación. Las mezclas se sometieron a sornicación en un baño de ultrasonido (Ultrasons, Selecta), durante 15 minutos y se filtraron a continuación a través de papel de filtro Whatman N° 1 para obtener el extracto enzimático crudo. Todos los ensayos enzimáticos se hicieron por triplicado.

3.1.4.1. Actividad xilanasa (β – (1,4) endoxilanhidrolasa)

La actividad xilanasa se cuantificó mediante la valoración de los azúcares reductores liberados por la enzima en la mezcla de reacción, con el método de Somogyi Nelson (Somogyi, 1945). Para su valoración se utilizó como sustrato arabinóxilano al 0,5% (p/v) en tampón fosfato 10 mM , pH 7. La mezcla de reacción estaba formada por $25 \text{ }\mu\text{L}$ del extracto enzimático en $75 \text{ }\mu\text{L}$ de tampón fosfato y $100 \text{ }\mu\text{L}$ de la solución de sustrato. Dicha mezcla se incubó a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos. Se realizaron

simultáneamente blancos de enzima y de sustrato para ser utilizados como controles. Una unidad de actividad xilanasas se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de xilosa por minuto bajo las condiciones óptimas de reacción.

3.1.4.2. Actividad mananasa (β -1,4 mananasa)

El sustrato utilizado para la valoración de la actividad mananasa fue LGB (Locust bean gum) al 1% (p/v) en tampón fosfato 10 mM, pH 7 y se siguió el mismo procedimiento empleado para la determinación de la actividad xilanasas. Tras el periodo de incubación, se valoraron los azúcares reductores con el método de Somogyi Nelson (Somogyi, 1945), refiriéndose los datos a una curva patrón de glucosa. Una unidad de actividad mananasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de glucosa en un minuto.

3.1.4.3. Actividad carboximetilcelulasa (endoglucanasa)

Para determinar dicha actividad se utilizó como sustrato carboximetilcelulosa (CMC) al 0,4% en tampón fosfato 10 mM, pH 7, siguiéndose el mismo procedimiento empleado para la determinación de las actividades enzimáticas anteriormente

mencionadas. Tras el periodo de incubación, se valoraron los azúcares reductores con el método de Somogyi Nelson (Somogyi, 1945), refiriéndose los datos a una curva patrón de glucosa. Una unidad de actividad carboximetilcelulasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de glucosa en un minuto.

3.1.4.4. Actividad lacasa

La valoración de la actividad lacasa extracelular se realizó según el método estándar de Werner *et al.* (1970), basado en la oxidación de ABTS (2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]). La oxidación del ABTS se monitorizó por el aumento de absorbancia a 436 nm de una mezcla de reacción que contenía ABTS 50 mM en tampón acetato 100mM pH 4,5. Las valoraciones se realizaron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Hitachi modelo U-2001. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto. El coeficiente de extinción molar (ϵ) para el ABTS a 436 nm es de 29300 M cm^{-1} .

3.1.4.5. Actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa se valoró utilizando como sustrato 2,4-dicloro-fenol (2,4-DCP) 5mM en tampón

TRIS/HCl 100 mM pH 7,5, 4-aminoantipirina 3,2 mM y H₂O₂ 10 mM. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 1 mL (250 µL de tampón, 500 µL de solución problema, 100 µL de 2,4-DCP y 50 µL de H₂O₂); esta mezcla se incubó a 50 °C durante 3 minutos y se midió la absorbancia a 510 nm cada 30 segundos. Una unidad de actividad peroxidasa se define como la cantidad de enzima que oxida un µmol de 2,4 DCP por minuto.

3.1.5. Obtención de álcali lignina y APPL de los sustratos fermentados

Para la obtención de la álcali lignina de los residuos transformados por las cepas, se aplicó el método de extracción con NaOH 0,1 M, descrito por Hernández-Coronado *et al.*, (1997). Para ello, a muestras de los cultivos tomadas tras 2, 4 y 7 días de incubación e introducidas en matraces Erlenmeyer se añadieron 100 mL de NaOH 0,1 M por cada 5 gramos de sustrato y a continuación, se sometieron en autoclave a 100 °C durante 1 hora. Posteriormente, el contenido de cada matraz se filtró a través de papel Whatman N° 54 y el filtrado se lavó de nuevo con 200 mL de NaOH 0,1 M. El sobrenadante resultante se acidificó con HCl concentrado, hasta un valor de pH entre 1,5-2. La lignina precipitada se

recogió por centrifugación a 12000 g durante 10 minutos y se lavó dos veces con agua destilada. Finalmente, se liofilizó en un liofilizador Cryodos-50 (Telstar) y se estimó gravimétricamente el peso seco de la álcali lignina solubilizada.

Para la obtención de APPL se siguió el mismo procedimiento, pero la extracción de la lignina se realizó con agua.

3.1.6. Optimización de las condiciones de producción de las enzimas y solubilización de la lignina en SSF

La herramienta estadística utilizada para la optimización de las condiciones de la producción de las enzimas y solubilización de la lignina en SSF, se basó en la aplicación del método SIMCA (Sartorius Stedim Bio-tech, Aubagne, Francia). Este método nos permite identificar la significancia del efecto de los factores que influyen en el proceso (tipo de sustrato, cepa, temperatura, días de fermentación) y seleccionar las mejores condiciones para la producción enzimática y la solubilización de la lignina (estimada como álcali lignina y APPL) por cada cepa. Se utilizó el método de Proyecciones ortogonales a estructuras latentes - Análisis Discriminante (OPLS-DA) para

discriminar el efecto de las variables estudiadas. El software se configuró para calcular los intervalos de confianza de los parámetros utilizando un nivel de confianza del 95 %, mientras que el nivel de significación utilizado para calcular los límites críticos de la distancia de los modelos y la elipse T2 de Hotelling se fijó en 0,05 (confianza del 95 %). Los datos se centraron y escalaron previamente (varianza unitaria) para eliminar cualquier peso debido a las variables o a la magnitud de las observaciones.

El análisis se realizó utilizando un algoritmo de mínimos cuadrados parciales iterativos no lineales (NIPALS), una validación cruzada completa (CV) que incluía una prueba de incertidumbre, y $1/SDev$ como pesaje. Dado que el OPLS-DA responde a la complejidad del modelo (Bylesjö *et al.*, 2006) y para evitar el exceso de ajuste, se estableció un CV repetido 10 veces para estimar el número relevante de componentes en los modelos OPLS (Shenk y Westerhaus, 1995).

No obstante, para evitar el exceso de ajuste y seguir teniendo el número óptimo de factores adecuados para generar un modelo de predicción, se utilizaron tres variables latentes en todos los casos.

3.2. Obtención de oleogel a partir de paja de trigo fermentada por la cepa *S. MDG 301* y caracterización de los mismos

La aplicación del método estadístico OPLS-DA para establecer las condiciones óptimas de fermentación de los residuos agrícolas por las cepas de *Streptomyces* utilizadas, permitió seleccionar como cepa más eficiente en función de su actividad enzimática y capacidad de solubilización de la lignina a *S. MDG 301* utilizando como sustrato paja de trigo tras 7 días de incubación a 45 °C. Por esta razón, se utilizó dicho sustrato fermentado para preparar los oleogel, utilizando como control a efectos comparativos oleogel obtenidos a partir de paja de trigo sin inocular y sometida a las mismas condiciones.

3.2.1. Caracterización morfológica y química del sustrato control (W) y del sustrato fermentado por *Streptomyces MDG 301* (FW)

Al final del proceso SSF (7 días de incubación) se tomaron muestras del sustrato fermentado (FW), así como del sustrato sin inocular (W), que se sometieron a un proceso de secado a 60 °C, previo a la realización de los análisis. La composición química de las ligninas se analizó según el procedimiento

NREL (National Renewable Energies Laboratory, 2010). Así, tras una hidrólisis ácida de las muestras, el residuo sólido resultante se denominó lignina insoluble (lignina Klason), mientras que el líquido se analizó para determinar el contenido en carbohidratos mediante cromatografía líquida de alta resolución (1260 HPLC, Agilent, Waldbronn, Alemania, equipada con Hi-PlexPb y un detector de índice de refracción (RI) G1362A). Se empleó agua ultrapura bombeada a una velocidad de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ como fase móvil a $70 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.1.1. Microscopia electrónica de barrido de ambos sustratos

Las muestras W y FW se observaron en un microscopio electrónico de barrido digital Zeiss DMS-950, dotado de un dispositivo automático de exposición y un sistema de fotografía Polaroid. Las muestras se introdujeron en cápsulas de papel Whatman N° 1 de unos 6 mm de diámetro y se fijaron con glutaraldehído al 5% (v/v) en tampón cacodilato sódico 200 mM pH 7,2 durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se lavaron 2 veces durante 10 minutos en tampón cacodilato sódico 200 mM pH 7,2 y seguidamente, se deshidrataron gradualmente en concentraciones crecientes de etanol – acetona (Merck) según el siguiente

protocolo: 10 minutos en etanol absoluto al 25%; 10 minutos en etanol absoluto al 70%; 10 minutos en etanol absoluto al 90%; 10 minutos en etanol absoluto al 100% (repetir 2 veces) y al menos una noche en acetona anhidra. Una vez fijadas las muestras, se realizó el punto crítico de secado, en un secador Polaron E300. Por último, las muestras se colocaron en portaobjetos circulares de 2,5 cm de diámetro, se metalizaron con oro-paladio en un metalizador Polaron 5400 y se observaron en el microscopio electrónico de barrido digital.

3.2.1.2. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) de ambos sustratos

Los espectros FTIR de ambos sustratos se realizaron en un equipo JASCO FT/IR 4200 (Jasco Inc. Japón), con una escala de absorbancia de 600 a 4000 cm^{-1} de número de onda y con una resolución de 1 cm^{-1} (Jiménez-López *et al.*, 2020).

3.2.2. Funcionalización química del sustrato fermentado

El sustrato fermentado se lavó varias veces con agua destilada y se filtró al vacío para eliminar las sales y otros componentes solubles en agua incluidos en los preinóculos y no consumidos por

Streptomyces. Posteriormente, se secó a 60 °C hasta que no se liberara agua, lo que se comprobó realizando análisis termogravimétricos. Ambos sustratos (control y fermentado) se sometieron a un proceso de molienda hasta un tamaño máximo de 0,25 mm en un molino rotatorio IKA MF 10 basic WERKE.

La reacción de funcionalización se llevó a cabo seleccionando la proporción 1:2 paja/1,6 diisocianato de hexametileno (HMDI) (p/p) siguiendo el protocolo descrito por Borrero-López *et al.*, 2017. Resumiendo, ambos residuos se introdujeron en un recipiente de dos cuellos de fondo redondo donde se agitaron de forma suave con 100 mL de tolueno bajo atmósfera inerte durante 30 min. Posteriormente, a la paja con el tolueno se le adicionó el HMDI y la trietilamina (que actúa como catalizador).

La reacción de funcionalización se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación, se eliminaron el tolueno y la trietilamina residuales mediante un rotavapor (R110, Büchi).

3.2.3. Proceso de obtención de oleogeles

Los residuos agrícolas funcionalizados se mezclaron con aceite de ricino a una concentración del 15% (p/p) y a temperatura ambiente, durante 24 horas, utilizando un agitador RW20 IKA equipado con un sistema de agitación en forma de ancla. Finalmente, los oleogeles se almacenaron a temperatura ambiente para su posterior caracterización (Borrero-López *et al.*, 2017).

3.2.4. Caracterización de los oleogeles obtenidos a partir de paja de trigo control (OW) y fermentada (OFW)

La calidad de los oleogeles obtenidos junto con la del lubricante comercial Castrol Optipit® (Castrol Limited, UK), que contiene litio como agente espesante y que se utilizó como control a efectos comparativos, se evaluó mediante su caracterización reológica que se llevó a cabo en el Departamento de Ingeniería Química, Campus de “El Carmen” de la Universidad de Huelva.

3.2.4.1. Propiedades reológicas de los oleogeles

El comportamiento viscoelástico lineal de los oleogeles obtenidos con FW y W se analizó mediante barridos de frecuencia y test de flujo viscoso respectivamente, en ARES (Rheometric Scientific, Reino Unido) y Marte

(Thermo Scientific, Alemania). Se utilizaron geometrías serradas placa-placa de 25 y 20 mm de diámetro, respectivamente. Los barridos de frecuencia se alcanzaron entre 100-0,03 rad s^{-1} , mientras que los barridos de flujo viscoso se obtuvieron dentro del rango de 0,03-100 s^{-1} en incrementos escalonados de la velocidad de corte. El rango viscoelástico lineal se obtuvo mediante barridos de esfuerzo o tensión.

Para obtener solamente un valor a efectos comparativos, se determinó el "módulo de Plateau" (G_n^0), que se calculó como el valor del módulo de almacenamiento donde la tangente de pérdida era mínima.

Por otro lado, se obtuvo el comportamiento típico de adelgazamiento por cizallamiento de estructuras altamente complejas, por lo que se aplicó el modelo de ley de potencia para ajustar los valores: $\eta = k \cdot \dot{\gamma}^n$, donde k y n son índices de consistencia y flujo, respectivamente. Estos dos parámetros proporcionan información fiable sobre el comportamiento del oleogel, por lo que se procedió a su cálculo.

3.2.4.2. Ensayo de biodegradabilidad de los oleogeles: evolución del CO_2

Las pruebas de evaluación de la biodegradabilidad de los oleogeles obtenidos y del lubricante mineral comercial se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos publicados previamente por otros autores (Hernández y García, 2003). El ensayo determina la biodegradación del oleogel durante un período de incubación, midiendo la evolución del CO_2 en muestras de suelo que contenían los oleogeles a evaluar y el suelo no tratado con fines comparativos. En resumen, matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 g de un suelo fresco estándar disponible comercialmente dotado de microbiota activa (Lufa 2.2; LUFA Speyer, Germany) suplementado con cada lubricante y otro que contenía el suelo control, se incubaron durante 40 días a 28 °C. Los suelos tenían una humedad inicial del 22% (p/p) que se mantuvo durante el ensayo. A lo largo del tiempo de incubación, se midió el dióxido de carbono producido por la respiración de los microorganismos presentes en el suelo y para ello, se capturó en 10 mL de una solución de hidróxido de sodio (0,5 M); a continuación, se añadieron 5 mL de cloruro de bario (0,5 M), y el hidróxido residual se tituló con HCl 0,5 N. Se calculó el dióxido de carbono acumulado. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

3.2.4.3. Ensayos ecotoxicológicos de los oleogeles frente a *Lactuca sativa*

Los ensayos de ecotoxicidad se realizaron a tiempo 0 (t0) y a los 40 días de adición de los oleogeles en el suelo (t40). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La fitotoxicidad del lubricante comercial Castrol Optipit® (Castrol Limited, UK) y la de los bio-lubricantes (oleogeles) se evaluó utilizando *L. sativa* L. cultivar Trocadero como organismo modelo y siguiendo protocolos previamente publicados con mínimas modificaciones (Selim *et al.*, 2012). En resumen, las semillas de *L. sativa* se esterilizaron con etanol al 70% (v/v) durante 10 minutos y se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril. Se colocaron 50 g de suelo con cada lubricante en una placa Petri y se sembraron 10 semillas por placa. Se utilizó un suelo control sin la adición de lubricante con fines comparativos. Se añadieron 4 mL de agua destilada sobre las placas, que se reemplazaban periódicamente para mantener la humedad. Las placas Petri se sellaron con una tapa agujereada para permitir el intercambio de aire y evitar pérdidas de humedad, se incubaron en la oscuridad durante 48 h (temperatura ambiente), y después bajo un fotoperíodo de 16 h. Tras 72 h, se contaron las semillas germinadas. De acuerdo con Rede *et al.*, (2019), después

de siete días de exposición, se midió la longitud máxima de las raíces para evaluar el desarrollo de las plantas. Los ensayos se consideraron válidos si la germinación en el ensayo con suelo control era $\geq 80\%$ y la longitud de la raíz llegaba hasta 2 mm.

3.3. Obtención de oleogeles a partir de ligninas residuales (lignina Kraft y álcali lignina) funcionalizadas por la lacasa SilA de *Streptomyces ipomoeae*

Nuestro interés por el aprovechamiento de residuos con fines industriales mediante la aplicación de métodos biológicos nos condujo a realizar una serie de ensayos dirigidos a la obtención de oleogeles a partir de ligninas residuales tratadas enzimáticamente con la lacasa SilA previamente obtenida y caracterizada en nuestro laboratorio.

3.3.1. Ligninas utilizadas

Para la preparación de los oleogeles se partió de dos ligninas residuales, una comercial (lignina Kraft, Sigma Aldrich) y la álcali lignina obtenida en nuestro laboratorio a partir del residuo lignocelulósico de paja de trigo siguiendo el método descrito en el apartado 2.1.5.

3.3.2. Producción de la lacasa SilA

3.3.2.1. Microorganismo productor

La producción de la enzima recombinante SilA se llevó a cabo según el protocolo descrito previamente por Molina-Guijarro *et al.* (2009). La enzima nativa SilA fue producida en nuestro laboratorio por la cepa *Streptomyces ipomoeae* CECT 3341 pero dada la baja productividad de la enzima por la cepa salvaje el gen codificante de la misma se clonó y sobreexpresó en la cepa *Escherichia coli* BL21.

3.3.2.2. Condiciones de producción de la lacasa

Los medios de cultivo, su composición y las cepas de microorganismos utilizados se presentan en las Tablas 3.1. Los componentes específicos de los medios de cultivo y su función se presentan en la Tabla 3.2.

Para la producción de la lacasa se transformaron células competentes de la cepa BL21 (DE3) con el plásmido pET28-SclA que contenía el gen de la lacasa SilA y a continuación se sembraron en placas de medio LB suplementadas con kanamicina ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, las células del cultivo se transfirieron a un matraz de 250 mL con 40 mL del mismo medio y

se incubaron de igual modo hasta alcanzar la fase exponencial (DO₆₀₀: 0,5-1), sirviendo este cultivo como preinóculo. La producción de la enzima se llevó a cabo en matraces de 1 L con 250 mL de medio LB suplementado con kanamicina, que fueron inoculados con 4 mL del preinóculo anterior e incubados a 37°C y 200 rpm. Cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial, se cambió su temperatura de incubación a 16°C , se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM y se incubó a esa temperatura durante 2 horas. Transcurrido el tiempo, las células se recogieron por centrifugación a 12000 g durante 10 minutos y a 4°C . El sedimento obtenido se lavó con tampón PBS y se centrifugó en las mismas condiciones. Las células recogidas se guardaron congeladas a -20°C hasta su procesamiento.

Para obtener la proteína recombinante de la fracción citoplasmática soluble, las células se resuspendieron en 50 μL de tampón fosfato 10 mM pH 7. Seguidamente, las células se rompieron en una prensa French® (Sim-Aminco) tras tres pases a 1500 psi, enfriando previamente la celda de ruptura y recogiendo el lisado celular en un tubo inmerso en hielo. Por último, el lisado se centrifugó a 15000 g durante 10 minutos y a 4°C , con el fin de separar el sobrenadante que contenía la enzima soluble de los restos celulares precipitados.

Tabla 3.1. Cepas y medios de cultivo utilizados para la producción de la lacasa SiLA

Cepa		Medio de cultivo
<i>Streptomyces</i>		
<i>Streptomyces ipomoeae</i>	Cepa productora de la lacasa nativa	<p>GAE (Glucosa – Asparagina - Extracto de levadura) (Hernández <i>et al.</i>, 1994)</p> <p>Composición:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Solución A (g L⁻¹): glucosa, 10; asparagina 1, extracto de levadura 0,5; agar, 20. - Solución B (g L⁻¹): K₂HPO₄, 0,5. - Solución C (g L⁻¹): MgSO₄·7H₂O, 0,99; FeSO₄·7H₂O, 0,021.
<i>Escherichia coli</i>		
BL21 (DE3) (Invitrogen)	Sobreexpresión de proteínas recombinantes	<p>LB (Caldo de lisogénesis) (Bertani, 1951). Composición (g L⁻¹): triptona, 10; extracto de levadura, 5; NaCl, 10; agar (medio sólido), 15. El pH se ajustó a 7,2 con NaOH. Se esterilizó a 121 °C durante 20 minutos.</p> <p>SOC (Caldo súper óptimo con represión catabólica) (Hanahan, 1983). Composición (g L⁻¹): triptona, 20; extracto de levadura, 5; NaCl, 0,5; KCl, 0,18; glucosa, 3,6. Se esterilizó a 115 °C durante 30 minutos. Después de esterilizar se añadió un pequeño volumen de una solución estéril de MgCl₂, de forma que la concentración final fuese de 10 mM.</p>

Tabla 3.2. Componentes específicos de los medios de cultivo y su función

Componente	Función
Kanamicina	Antibiótico utilizado para seleccionar bacterias portadoras de plásmidos que confieren resistencia a este antibiótico, como es el caso de pET28a.
Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG)	Compuesto utilizado para inducir la expresión de los genes clonados en pET28a

3.3.2.3. Obtención de la forma activa de la enzima

Al extracto crudo obtenido tras la ruptura de las células de *E. coli* inducidas, se le añadió sulfato de cobre (II) hasta una concentración de 1 mM, con el fin de que la proteína captase el cobre necesario para completar su centro activo y con ello conseguir que la enzima recombinante tuviese actividad. El extracto obtenido se incubó con el cobre durante 3 horas en hielo y a continuación se introdujo en una bolsa de diálisis y se dializó a 4 °C frente a 5 litros de tampón fosfato 10 mM pH 7, durante una noche, con el fin de eliminar el exceso de cobre no unido a la proteína. La muestra se guardó congelada a -20 °C.

3.3.2.4. Valoración de la actividad lacasa

La valoración de la actividad enzimática lacasa se realizó del mismo modo ya descrito en el apartado 3.1.4.4.

3.3.3. Establecimiento de las condiciones de reacción de polimerización de las ligninas residuales con la lacasa SilA

La capacidad de la lacasa SilA para funcionalizar las ligninas residuales y de ese modo aumentar su reactividad se

estimó mediante la determinación del grado de polimerización alcanzado por las ligninas por la acción enzimática.

3.3.3.1. Funcionalización de ligninas residuales con la lacasa SilA

Antes del tratamiento enzimático de las ligninas con la enzima se solubilizaron ambas en NaOH 0,05 M. Con objeto de seleccionar las mejores condiciones de reacción se ensayó la eficacia en la polimerización de las ligninas de distintas mezclas que contenían en un volumen de 1 mL de los siguientes componentes: tampón fosfato 100 mM, pH 7, lacasa SilA (1 U por g de lignina) y lignina a diferentes concentraciones (0,25; 0,75; 1,25 g L⁻¹). Las mezclas se incubaron a diferentes tiempos (10, 20 y 30 min) a 45 °C. (Molina-Guijarro *et al.*, 2009; Arias *et al.*, 2003). El pH final de cada muestra se ajustó a pH 7-8 con tampón fosfato 50 mM.

Para evaluar la eficacia del tratamiento enzimático, los polímeros de lignina presentes en la mezcla control no sometida a tratamiento enzimático y los obtenidos tras el tratamiento con SilA se separaron en función de su masa molecular mediante cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión molecular en un HPLC 1260 Infinity Binary (Agilent) equipado con una precolumna Polargel-M Guard de 50 x 7,5 mm (p / n PL1117-1800) y una

columna Polargel-M de 300 x 7,5 mm (p / n PL1117-6800) conectada en serie y acoplada a un detector de diodos (DAD). Se usó tampón fosfato 50 mM pH 8 como fase móvil con un flujo de 1 mL min⁻¹ y una temperatura de columna de 25 ° C. De cada muestra, se tomaron alícuotas de 20 µL usando un autoinyector Agilent 1200 Infinity. Los perfiles cromatográficos de elución se monitorizaron a 254 nm durante 20 minutos. La cuantificación relativa de las masas moleculares de los polímeros correspondientes a los perfiles cromatográficos obtenidos se estableció mediante el método de “cortar y pesar” (Pietrzyk y Frank, 1979). El rango de masas moleculares de los polímeros se estableció en función del tiempo de retención de los mismos.

3.3.3.2. Optimización de las condiciones de polimerización

Para tratar de optimizar las condiciones de polimerización de las ligninas residuales por la lacasa se empleó la metodología de superficie de respuesta (MSR), la cual incluye un conjunto de métodos y procedimientos matemáticos y estadísticos que permiten obtener un modelo polinomial de bajo orden para representar la variable de interés en función de los factores involucrados, y así ubicar las combinaciones de los

factores que generan una respuesta óptima.

Con la técnica MSR se pretendió optimizar la capacidad de funcionalización de las ligninas por la lacasa SilA y como consecuencia incrementar el grado de polimerización de las ligninas. Para ello, se utilizó un diseño factorial 3² con 3 puntos centrales (Tabla 3.3), a fin de identificar los factores que influyen en el proceso y obtener un modelo polinomial cuadrático que represente las variables respuestas obtenidas.

Tabla 3.3. Niveles de estudio de los factores que influyen sobre la polimerización de las ligninas Kraft y álcali lignina por la lacasa SilA.

		Niveles		
Factores		-1	0	1
X ₁	Concentración lignina (g L ⁻¹)	0,25	0,75	1,25
X ₂	Tiempo (min)	10	20	30

El coeficiente de regresión de los polinomios de respuesta se estimó mediante un modelo de regresión lineal múltiple, una prueba t de Student y un análisis de varianza. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico Statgraphics® Centurion XV.

3.3.4. Obtención de oleogeles a partir de lignina Kraft y álcali lignina funcionalizadas con SilA.

Una vez comprobada la capacidad de funcionalización de las ligninas residuales por la lacasa SilA, se planteó evaluar la adecuación de estas ligninas para ser utilizadas como espesante en la fabricación de oleogeles, en comparación con controles obtenidos con las ligninas tratadas con la enzima inactivada.

3.3.4.1. Ensayo preliminar de funcionalización de las ligninas residuales y su efecto en las características reológicas de los oleogeles

Como paso previo se ensayó cómo afectan distintas condiciones de funcionalización de las ligninas con la lacasa a las características reológicas de los oleogeles. Para ello, se incubaron a 45 °C durante diferentes tiempos (1, 2 y 3 h) mezclas de reacción enzimática (100 mL) que contenían: 100 µM de tampón fosfato pH 8, agua destilada, lignina Kraft o álcali lignina (80g L⁻¹) y lacasa (1U por g). Las muestras, una vez concluida la reacción de funcionalización, se acidificaron con HCl a pH 2 para la precipitación de la lignina y se incubaron a 4 °C durante 24 horas. Tras este período, se

centrifugaron a 9000g durante 20 min. Las diferentes ligninas funcionalizadas se secaron a 60 °C durante 48 h. Los controles se prepararon en las mismas condiciones utilizando la enzima inactivada por calor.

Las ligninas funcionalizadas se molieron previamente en un mortero para evitar los acúmulos formados durante el tratamiento. A continuación, se añadieron 4 g de lignina a un reactor de acero inoxidable de 100 mL, junto con aceite de ricino (14 g) y HMDI (2 g). La mezcla se agitó durante 24 h con un agitador IKA RW20 acoplado a un impulsor de anclaje. El recipiente se mantuvo a 24 °C mediante un baño de agua.

Una vez finalizado el proceso, los oleogeles se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 mes para asegurar que el diisocianato libre reaccionara y la muestra no pudiera sufrir ningún cambio estructural interno. La caracterización reológica de los oleogeles obtenidos se realizó del mismo modo ya descrito en el apartado 3.2.4.1.

3.3.4.2. Optimización de las condiciones de funcionalización de ligninas residuales con SilA, elaboración de oleogeles y caracterización reológica de los mismos

Una vez corroborada la influencia de la polimerización de ligninas residuales por SilA en el comportamiento reológico de los oleogeles, se desarrolló un diseño factorial 3^2 con 3 puntos centrales para evaluar la influencia de las variables concentración de lignina (g L^{-1}) y tiempo de incubación (h) sobre los parámetros reológicos de los oleogeles. La caracterización reológica de los oleogeles obtenidos se realizó del mismo modo ya descrito en el apartado 3.2.4.1.

Con objeto de optimizar las condiciones de elaboración de los oleogeles se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) con los datos obtenidos del diseño factorial. Esta técnica permite identificar los factores que influyen en el proceso y obtener un modelo polinómico cuadrático que representa las respuestas obtenidas. Se empleó un diseño compuesto central (CCD) con dos variables independientes (concentración de lignina (g L^{-1}) y tiempo de incubación (h) (Tabla 3.4). Las funciones de respuesta medidas fueron las características reológicas de los oleogeles (G_n^0). Todos los ensayos se llevaron a cabo en las mismas condiciones de pH y temperatura descritas anteriormente y se utilizó 1 U de lacasa por g de lignina.

Tabla 3.4. Niveles de estudio de los factores que condicionan la funcionalización de las ligninas residuales por la lacasa SilA y las características reológicas de los oleogeles

		Niveles		
Factores		-1	0	1
X_1	Concentración lignina (g L^{-1})	50	75	100
X_2	Tiempo (h)	1	2	3

El coeficiente de regresión de los polinomios de respuesta se estimó mediante un modelo de regresión lineal múltiple, una prueba t de Student y un análisis de varianza. Se utilizó el programa Statgraphics® Centurion XV para analizar los datos y obtener las gráficas de la superficie de respuesta de los polinomios.

3.3.4.2.1. Caracterización química de las ligninas residuales funcionalizadas con SilA en condiciones óptimas de reacción

Al finalizar el tiempo de reacción en condiciones óptimas, se liofilizaron las muestras en un liofilizador Cryodos-50 (Telstar). La composición química de las ligninas fue analizada según el procedimiento NREL (National

Renewable Energies Laboratory, 2010) ya descrito en el apartado 3.2.1.

3.3.4.2.2. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) de las ligninas residuales funcionalizadas con SilA en condiciones óptimas de reacción

Los espectros FTIR de las ligninas residuales funcionalizadas se realizaron según la metodología ya descrita en el apartado 3.2.1.2.

3.4. Obtención y caracterización de los hidrogeles elaborados a partir de quitosano y ligninas residuales (Kraft y álcali lignina) funcionalizadas con la lacasa SilA

3.4.1. Biopolímeros residuales utilizados

Para la preparación de los hidrogeles se partió de dos ligninas residuales, una comercial (lignina Kraft, Sigma Aldrich) y álcali lignina obtenida en nuestro laboratorio a partir de paja de trigo siguiendo el método descrito en el apartado 3.1.5. Ambos tipos de ligninas residuales se solubilizaron en una solución de NaOH 0,1 M para obtener una concentración de 20 g L⁻¹. Dichas ligninas se sometieron a la acción enzimática de la lacasa (1 U por g) durante 1,98 h a 45 °C. La solución de

quitosano se preparó disolviendo quitosano comercial (75-85% desacetilación, Sigma-Aldrich) en una solución acuosa de ácido acético glacial al 2% (p/p) para obtener una concentración de quitosano de 20 g L⁻¹.

3.4.2. Condiciones de obtención de los hidrogeles

Las películas formadas a partir de las mezclas de quitosano/lignina (Kraft o álcali lignina) se obtuvieron por evaporación (Chen *et al.*, 2009). La solución de lignina funcionalizada o no se agregó lentamente en diferentes proporciones de quitosano obteniéndose tres formulaciones (90% quitosano: 10% lignina; 70% quitosano: 30% lignina y 50% quitosano: 50% lignina) bajo agitación vigorosa durante 4 h a 28 °C. Finalmente, la mezcla se vertió en una placa de Petri. Las películas obtenidas se secaron a 50 °C en una estufa durante 24 horas para eliminar los disolventes. La codificación de los hidrogeles obtenidos para su posterior evaluación se muestra en la Tabla 3.5. Los espesores de las películas tenían aproximadamente 0,09 mm. Se evaluó asimismo el efecto de la adición de glicerol al 1% (p/p) a las muestras. Como control a efectos comparativos, se utilizaron hidrogeles obtenidos de ligninas que no se habían sometido a la acción de la lacasa.

Tabla 3.5. Composición de los diferentes hidrogeles obtenidos a partir de ligninas residuales (Kraft y álcali lignina), quitosano y glicerol.

Muestra	Quitosano (%)	Lignina (%)	Tipo lignina	Glicerol	Funcionalización (SiA)
K50/50 CG	50	50	Kraft	1%	-
K70/30 CG	70	30	Kraft	1%	-
K90/10 CG	90	10	Kraft	1%	-
KF50/50 CG	50	50	Kraft	1%	1U g ⁻¹
KF70/30 CG	70	30	Kraft	1%	1U g ⁻¹
KF90/10 CG	90	10	Kraft	1%	1U g ⁻¹
K50/50 SG	50	50	Kraft	-	-
K70/30 SG	70	30	Kraft	-	-
K90/10 SG	90	10	Kraft	-	-
KF50/50 SG	50	50	Kraft	-	1U g ⁻¹
KF70/30 SG	70	30	Kraft	-	1U g ⁻¹
KF90/10 SG	90	10	Kraft	-	1U g ⁻¹
AL50/50 CG	50	50	Álcali	1%	-
AL70/30 CG	70	30	Álcali	1%	-
AL90/10 CG	90	10	Álcali	1%	-
ALF50/50 CG	50	50	Álcali	1%	1U g ⁻¹
ALF70/30 CG	70	30	Álcali	1%	1U g ⁻¹
ALF90/10 CG	90	10	Álcali	1%	1U g ⁻¹
AL50/50 SG	50	50	Álcali	-	-
AL70/30 SG	70	30	Álcali	-	-
AL90/10 SG	90	10	Álcali	-	-
ALF50/50 SG	50	50	Álcali	-	1U g ⁻¹
ALF70/30 SG	70	30	Álcali	-	1U g ⁻¹
ALF90/10 SG	90	10	Álcali	-	1U g ⁻¹
Q CG	100	-	-	1%	-
Q SG	100	-	-	-	-

CG: con glicerol; **SG:** sin glicerol; **K:** lignina Kraft; **AL:** álcali lignina; **KF:** lignina Kraft funcionalizada; **ALF:** álcali lignina funcionalizada; **Q:** quitosano.

3.4.3. Caracterización de los hidrogeles

3.4.3.1. Propiedades físico-químicas

- **Humedad (%)**

Para determinar el contenido de agua de los hidrogeles, las películas obtenidas se pesaron antes y después de secarse en un horno a 80 °C durante 48 h. El contenido de agua en las películas se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{M_i - M_d}{M_i} \times 100$$

donde M_i es la masa de la película original (g) y M_d es la masa de la película seca (g). El contenido de agua de la película se presenta como H_2O/g (Rubilar *et al.*, 2013).

- **Solubilidad (%)**

La solubilidad en agua de las películas se determinó según el método descrito por Rubilar *et al.*, 2013. La solubilidad se define como la fracción de la masa seca solubilizada después de 48 h de inmersión en agua y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Solubilidad en agua} = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100$$

siendo M_i la masa inicial y M_f la masa final (g) de la muestra. Se realizaron tres réplicas para cada muestra.

- **Capacidad de absorción de agua (CAA)**

La capacidad de absorción de agua o de hinchamiento de las muestras analizadas se midió a temperatura ambiente. Se utilizaron muestras de 2 cm², previamente pesadas y colocadas en recipientes con 10 mL de agua durante 30 minutos. El peso húmedo de los hidrogeles se determinó por el porcentaje de agua absorbida en la superficie de las muestras, secando el exceso de agua con papel de filtro. Posteriormente, se pesaron las muestras y el porcentaje de absorción de agua por las películas se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{CAA (\%)} = (W_{30} - W_0) \times 100$$

donde W_{30} corresponde al peso de las películas después de permanecer 30 minutos sumergidas en agua y W_0 el peso de las mismas a tiempo 0.

3.4.3.2. Propiedades físico-mecánicas

- **Espesor**

Para la medida del espesor de las películas obtenidas se utilizó un micrómetro de puntas SUHL/DDR con una resolución de 0,001 mm. El espesor de cada película se midió en 10 puntos diferentes a temperatura ambiente, considerando la media de estos valores como su espesor (Peng *et al.*, 2013).

- **Resistencia mecánica**

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles se evaluaron mediante un ensayo de tracción utilizando una máquina de ensayo universal Instron modelo 3345 (Instron Engineering Corporation, Norwood, MA, USA). Los hidrogeles se cortaron en piezas rectangulares (80 × 10 mm). La separación inicial del agarre y la velocidad de la cruceta se fijaron en 40 y 4 mm min⁻¹, respectivamente. Se realizaron al menos 4 mediciones para cada muestra. El módulo de Young (E), la resistencia a la tracción (TS) y la elongación a la rotura (EB) se determinaron a partir de las curvas de tensión-deformación. Teniendo en cuenta la densidad aparente de cada

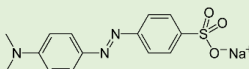
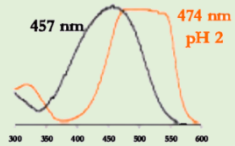
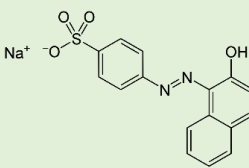
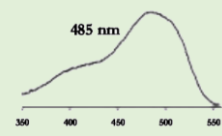
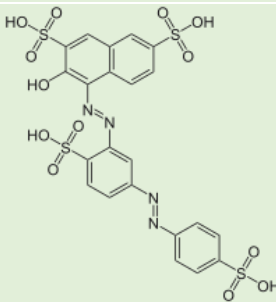
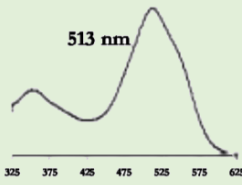
hidrogel, también se calculó el módulo de Young específico (MN m Kg⁻¹) y el índice de tracción (kN m Kg⁻¹) (Jiménez-López *et al.*, 2020).

3.5. Ensayos conducentes a evaluar el potencial tecnológico de los hidrogeles.

3.5.1. Evaluación de la capacidad antibacteriana de los hidrogeles

Para evaluar la capacidad antimicrobiana de los hidrogeles se utilizó el método de suspensión directa de colonias (Picazo, 2000). La capacidad antimicrobiana se ensayó frente a dos cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. A partir de una placa de cultivo de 18 a 24 horas se tomaron varias colonias con un asa y se ajustó el inóculo a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de MacFarland (1,5x10⁸ ufc mL⁻¹). En tubos de ensayos que contenían esta dilución se adicionaron las muestras de hidrogeles, cortadas en rectángulos (2 × 1 cm) e incubadas a 37 °C durante 24 h a 100 rpm. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas y se inocularon placas que contenían los medios selectivos para cada microorganismo, es decir, MacConkey II y agar Manitol Salado para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente.

Tabla. 3.6. Colorantes utilizados en el ensayo. Nombre de los compuestos, tipo, estructura química, espectro característico a pH 2 y 5, longitud de onda de máxima absorbancia (λ_{\max}).

Nombre	Tipo	Estructura química	Espectro
Methyl Orange	Azo		
Orange II	Azo		
Ponceau SS	Diazo		

Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Tras el proceso de incubación se procedió al recuento de colonias (ufc mL⁻¹). Con fines comparativos, se utilizó un tubo control sin la adición de la muestra.

3.5.2. Capacidad de retención de colorantes textiles

Para este ensayo, se seleccionaron los hidrogeles con mayor capacidad de absorción de agua que contuviesen tanto

las ligninas funcionalizadas como sin funcionalizar. Las muestras se cortaron en rectángulos (2 × 1 cm) y se prepararon 3 concentraciones de los colorantes (100 μM, 500 μM y 1 mM) (Tabla 3.6). A continuación, los hidrogeles se incubaron en 10 mL de la solución del colorante en las siguientes condiciones: 28 °C, 100 rpm y oscuridad y se tomaron muestras trascurridas 24 h. La degradación de los colorantes por los hidrogeles de lignina/quitosano se estimó por medición de la pérdida de

color en un espectrofotómetro Hitachi modelo U-2001. Se utilizaron como controles con fines comparativos las soluciones de colorantes sin la adición del hidrogel. La descripción de los colorantes incluidos en el estudio se presenta en la Tabla 3.6, donde se muestran los máximos de absorción y su estructura química.

3.6. Biodegradabilidad de los hidrogeles: Evolución del CO₂

La evaluación de la biodegradabilidad de los hidrogeles se realizó del mismo modo ya descrito en el apartado 3.2.4.2.

3.7. Ensayos ecotoxicológicos frente a *L. sativa*

Los ensayos ecotoxicológicos se realizaron utilizando el mismo protocolo descrito en el apartado 3.2.4.3.

3.8. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los resultados se llevaron a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI Versión 16.2.04 (62-bits).

Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Producción de actividades enzimáticas y evaluación del contenido de APPL y álcali lignina en extractos obtenidos de los residuos agrícolas fermentados mediante SSF

En estudios previos del grupo de investigación se había demostrado que los estreptomicetos son capaces de degradar residuos agrícolas en condiciones SSF (Berrocal *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2016; Blánquez *et al.*, 2017). En este trabajo se seleccionaron dos cepas de *Streptomyces* aisladas en el laboratorio, denominadas S. MDG 147, con objeto de analizar su perfil enzimático sobre dos residuos agrícolas, paja de trigo y paja de cebada, y posteriormente, optimizar las condiciones del proceso analizando el efecto combinado de distintas variables que condicionan el éxito del mismo. Además del perfil enzimático de ambas cepas, se evaluó la capacidad de solubilización de la lignina de los sustratos por la acción enzimática, mediante estimación de los rendimientos de APPL y de álcali lignina obtenidos de los residuos fermentados.

4.1.1. Valoración de actividades enzimáticas y estimación de APPL y álcali lignina obtenidos a partir de los sustratos fermentados.

En los sustratos fermentados bajo condiciones SSF se valoraron actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de hemicelulosas (xilanasas y mananasas), celulosa (carboximetil celulasa, CMCasa) y lignina (lacasas y peroxidadas) a los 2, 4 y 7 días de incubación, y a dos temperaturas (28 y 45 °C). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.1. A esos mismos tiempos y temperaturas se determinó el contenido de APPL y de álcali lignina presente en los extractos obtenidos de los sustratos fermentados, presentándose los resultados obtenidos en la Tabla 4.2.

En ninguno de los extractos obtenidos a partir de los dos sustratos fermentados se detectó actividad lacasa ni peroxidasa, probablemente debido a la adsorción de las enzimas a los sustratos, lo que dificulta su recuperación (Furukawa *et al.*, 2013). No obstante, es importante señalar que en estudios anteriores llevados a cabo con otras cepas de *Streptomyces* en condiciones SSF se detectó actividad lacasa, poniendo de manifiesto la capacidad de este microorganismo para producir enzimas oxidativas relacionadas con la degradación de la lignina (Blánquez *et al.*, 2017).

Tabla 4.1. Producción de actividades enzimáticas extracelulares durante el crecimiento de *S. MDG147* y *S. MDG 301* en diferentes condiciones de SSF. Todos los valores que se indican son la media de tres determinaciones (n=3).

Sustrato	Temperatura (C°)	Cepa	Día	Xilanasas (U/mL)	CMCasa (U/mL)	Mananasa (U/mL)
Trigo	28	301	2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Trigo	28	301	4	0,63±0,06	0,01±0,01	0,01±0,02
Trigo	28	301	7	0,26±0,10	0,03±0,01	0,00±0,0
Trigo	28	147	2	1,35±0,29	0,90±0,10	1,23±0,65
Trigo	28	147	4	8,16±0,20	1,76±0,01	6,31±0,13
Trigo	28	147	7	6,66±0,34	0,88±0,02	3,68±0,14
Trigo	45	301	2	31,11±1,21	10,19±1,29	0,00±0,00
Trigo	45	301	4	32,78±0,16	8,76±0,10	0,00±0,00
Trigo	45	301	7	33,91±0,52	7,43±0,31	0,00±0,00
Trigo	45	147	2	0,52±0,05	0,15±0,01	0,08±0,00
Trigo	45	147	4	4,25±1,75	1,18±0,02	4,30±0,13
Trigo	45	147	7	1,10±0,51	0,00±0,00	0,00±0,00
Cebada	28	301	2	3,73±1,34	0,48±0,05	0,72±0,10
Cebada	28	301	4	7,15±1,46	0,61±0,13	0,28±0,23
Cebada	28	301	7	7,47±1,52	0,53±0,12	0,04±0,04
Cebada	28	147	2	1,50±0,56	0,59±0,23	0,00±0,00
Cebada	28	147	4	1,07±0,08	0,00±0,00	0,00±0,00
Cebada	28	147	7	0,87±0,01	0,34±0,16	1,16±0,10
Cebada	45	301	2	5,35±0,40	1,25±0,05	1,22±0,11
Cebada	45	301	4	22,85±1,88	1,16±0,09	0,77±0,12
Cebada	45	301	7	27,95±1,58	1,55±0,2	0,69±0,19
Cebada	45	147	2	1,13±0,63	0,46±0,070	0,00±0,00
Cebada	45	147	4	2,433±0,61	0,17±0,00	0,37±0,14
Cebada	45	147	7	5,71±1,35	0,30±0,04	1,15±0,01

Tabla 4.2. Estimación del contenido de APPL y álcali lignina en los extractos obtenidos de los residuos fermentados durante el crecimiento de *S. MDG147* y *S. MDG 301* en diferentes condiciones de SSF. Todos los valores que se indican corresponden a la media de tres determinaciones (n=3)

Sustrato	Temperatura (C°)	Cepa	Día	APPL (g)	Álcali-lig (g)
Trigo	28	301	2	0,10±0,01	0,21±0,01
Trigo	28	301	4	0,14±0,03	0,24±0,01
Trigo	28	301	7	0,17±0,00	0,61±0,00
Trigo	28	147	2	0,03±0,01	0,55±0,03
Trigo	28	147	4	0,10±0,00	1,31±0,02
Trigo	28	147	7	0,06±0,01	1,46±0,02
Trigo	45	301	2	0,17±0,00	0,54±0,01
Trigo	45	301	4	0,11±0,00	0,72±0,01
Trigo	45	301	7	0,17±0,00	1,38±0,01
Trigo	45	147	2	0,07±0,03	0,49±0,01
Trigo	45	147	4	0,10±0,00	0,43±0,02
Trigo	45	147	7	0,11±0,00	1,35±0,12
Cebada	28	301	2	0,09±0,01	0,62±0,19
Cebada	28	301	4	0,06±0,00	0,57±0,14
Cebada	28	301	7	0,09±0,00	0,49±0,01
Cebada	28	147	2	0,05±0,00	0,54±0,00
Cebada	28	147	4	0,03±0,01	0,50±0,02
Cebada	28	147	7	0,04±0,00	0,50±0,00
Cebada	45	301	2	0,07±0,02	0,35±0,03
Cebada	45	301	4	0,08±0,01	0,43±0,06
Cebada	45	301	7	0,13±0,01	0,46±0,05
Cebada	45	147	2	0,07±0,02	0,53±0,01
Cebada	45	147	4	0,07±0,02	0,47±0,02
Cebada	45	147	7	0,09±0,01	0,45±0,02

Dada la dificultad que supone en este tipo de procesos de fermentación la elucidación del efecto individual de cada

variable y de la interacción de todas ellas sobre la respuesta enzimática de las cepas y su capacidad de solubilización de

la lignina de los residuos utilizados (Manan y Webb, 2017), se aplicó a los datos obtenidos el análisis discriminante OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis), con el fin de optimizar la respuesta del microorganismo en condiciones SSF.

4.1.2. Aplicación del método estadístico OPLS-DA a los datos obtenidos para conocer la influencia de cada variable y de su interacción sobre la eficiencia del proceso SSF

Tal y como se ha comentado anteriormente, la eficiencia del proceso de fermentación en estado sólido de los residuos agrícolas utilizados se evaluó en términos de producción de distintas actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de los polímeros mayoritarios constituyentes de la lignocelulosa, así como de la cantidad de lignina extraída de los sustratos transformados bien con agua (APPL) o con álcali (álcali lignina), como medida de evaluación de la capacidad de degradación del residuo por la acción enzimática.

La aplicación del análisis discriminante por mínimos cuadrados con corrección ortogonal a los datos obtenidos (OPLS-DA) utiliza el conocimiento previo que se tiene para construir un modelo estadístico robusto con una etapa de

reducción de la dimensionalidad y fusión de datos. El algoritmo OPLS es una extensión del método de regresión PLS que integra un filtro de corrección de señal ortogonal para distinguir las variaciones en los datos que son útiles para la predicción de una respuesta cuantitativa a partir de las variaciones que son ortogonales a la predicción (Trygg y Wold, 2002; Bylesjö *et al.*, 2006). Su contraparte, análisis discriminante (OPLS-DA) demostró ser un arma poderosa para el análisis de estructuras de datos cualitativos y su principal ventaja es una más fácil interpretación de los modelos (Boccard y Rutledge, 2013).

El modelo proporcionado por el método de análisis de datos OPLS-DA permitió establecer una separación clara entre las cepas y los sustratos después de calcular tres variables predictivas (R^2X [1], R^2x [2] y R^2X [3]), producto de la interacción entre todas las variables tanto dependientes como independientes evaluadas en SSF (sustrato, cepa, temperatura, tiempo, producción enzimática y solubilización del sustrato). Es decir, el proceso llevado a cabo con los sustratos paja de trigo y paja de cebada, combinado con cualquiera de las cepas utilizadas mostró un patrón claramente diferenciado como se observa en la Figura 4.1. En este caso, un total del 81,1 % de la

variación de R2X fue modelada por todos los componentes, lo que supone una explicación bastante aceptable de la separación observada. Por otro lado, la temperatura y los días de incubación mostraron una distribución de grupos menos homogénea (Figura 4.2).

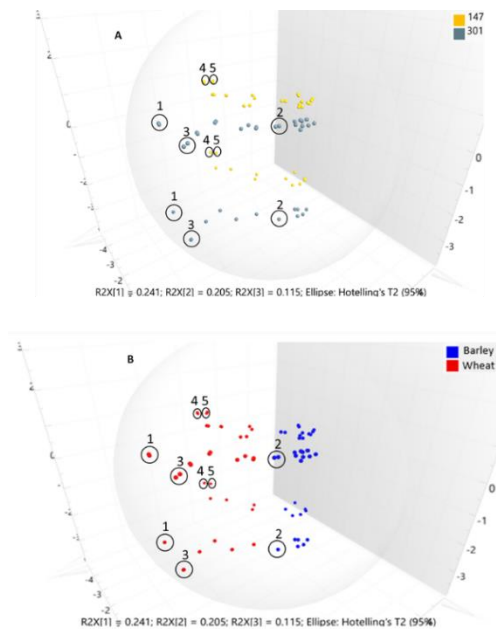


Figure 4.1. Gráficos 3D de dispersión de los modelos OPLS-DA utilizados en función de las siguientes variables: A) Cepa; B) Tipo de sustrato.

Según el modelo OPLS-DA, el nivel de producción de xilanasa durante el tiempo de incubación mostró claras diferencias entre las dos cepas de *Streptomyces* ensayadas. Así, el análisis conjunto de los resultados proporcionados por el modelo mostrado en las Figuras 4.1, 4.2 y 4.3A, permite establecer que las máximas

actividades de xilanasa se obtuvieron en paja de trigo fermentada con la cepa *S.* MDG 301, después de 7 días de incubación a 45 °C (punto 1).

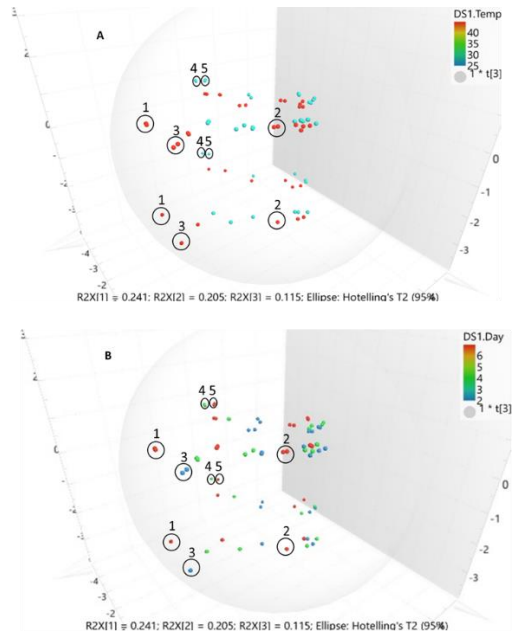


Figura 4.2. Gráficos 3D de dispersión de los modelos OPLS-DA utilizados en función de las siguientes variables: la temperatura (A) y días (B) de incubación.

Es importante señalar que no se observaron diferencias aparentes entre la producción máxima de xilanasa en paja de trigo en las condiciones mencionadas como óptimas (cepa 301, 45 °C, 7 días) y la producción obtenida tras 2 y 4 días de incubación con la misma cepa y misma temperatura (Figura 4.3A, región coloreada).

Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que se puede alcanzar una alta producción de esta enzima en periodos de fermentación más cortos, lo que implica una importante ventaja para aplicaciones industriales, reduciendo el tiempo y el coste de producción. Igualmente, en la paja de cebada fermentada, a pesar de obtener una menor producción de xilanasa en comparación con la obtenida en paja de trigo, los resultados mostraron que la producción más elevada en este sustrato se obtuvo en las mismas condiciones que en la paja de trigo (Figura 4.1, 4.2 y 4.3A, punto 2).

Los altos niveles de xilanasa obtenidos en los sustratos fermentados pueden relacionarse con la composición química del sustrato. De hecho, los residuos agrícolas, entre los que se incluyen la paja de trigo y la paja de cebada, contienen altos contenidos (aproximadamente el 25%) de azúcares hemicelulósicos, principalmente xilosa, lo que induciría la producción de esta enzima (Panagiotou y Olsson, 2007).

En cuanto a la actividad CMCasa, el análisis OPLS-DA mostró una mayor tasa de producción de esta enzima en la paja de trigo después de 2 días de incubación con la cepa *S. MDG 301* a 45 °C (Figura 4.1, 4.2 y 4.3B, punto 3). En la paja de cebada, las diferencias

encontradas a lo largo del tiempo de incubación no fueron significativas y la producción de la enzima fue mucho menor que la obtenida en la paja de trigo.

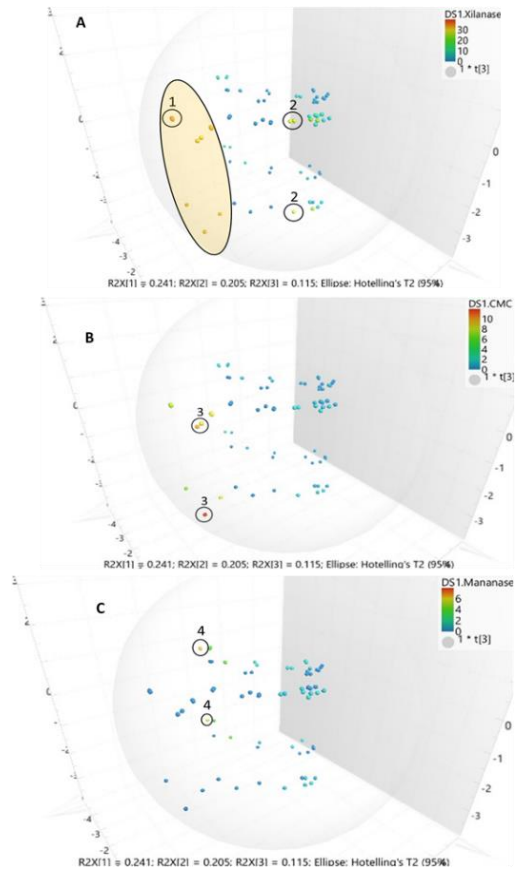


Figura 4.3. Gráficos 3D de dispersión de los modelos OPLS-DA utilizados en función de las siguientes variables: actividad xilanasa (A), CMCasa (B), y mananasa (C)

Por el contrario, se detectaron bajos niveles de actividad mananasa en las condiciones ensayadas, lo cual puede ser

atribuido a la baja concentración de manano y de azúcares inductores de esta actividad (manosa) que contienen los residuos lignocelulósicos utilizados, pudiendo considerarse la actividad detectada como actividad constitutiva o basal en la cepa utilizada.

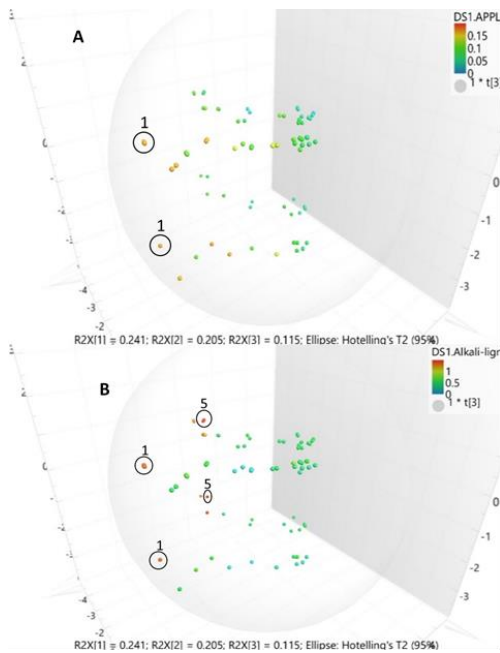


Figura 4.4. Gráficos 3D de dispersión de los modelos OPLS-DA utilizados en función de las siguientes variables: APPL (A) y álcali lignina (B)

Por otra parte, según el modelo ensayado, la cantidad de APPL determinada en los extractos fue significativamente mayor cuando se obtuvo a partir del sustrato paja de trigo fermentado con la cepa *S. MDG 301* durante 7 días a 45 °C (Figuras 4.1, 4.2 y

4.4A, punto 1). Como era de esperar, estas condiciones en que se produjo la máxima solubilización de la lignina del sustrato son las mismas en que se detectaron los niveles más elevados de actividad enzimática, lo que a su vez provocaría la ruptura de algunos enlaces presentes en la estructura del residuo lignocelulósico, facilitando su despolimerización (Hernández *et al.*, 2001; Arias *et al.*, 2016; Blánquez *et al.*, 2017). Es importante tener en cuenta que la relación arabinoxilano/glucomanano descrita en angiospermas herbáceas es de 20:1, y, por lo tanto, la solubilización de APPL podría ser mayormente atribuible a la producción de actividad xilanasa (Puls y Schuseil, 1993; Hernández *et al.*, 2001).

Debido a la escasa cantidad de lignina extraída con agua de los sustratos fermentados en forma de APPL, y con objeto de conseguir una mayor cantidad de lignina para futuros ensayos, se llevó a cabo una extracción alcalina con NaOH 0,1 M. Los valores más altos de lignina extraídos con álcali se obtuvieron a partir de paja de trigo fermentada con la cepa *S. MDG 147* tras 7 días de incubación a 28 °C (Figuras 4.1, 4.2 y 4.4b, punto 5). En este caso, parece deducirse que la acción sinérgica de las xilanasas, mananasas y CMCasa

producidas por la cepa en estas condiciones, podría haber causado la desestructuración de la lignocelulosa del residuo y facilitar de ese modo, la extracción de la lignina por el álcali. Resulta interesante señalar que la cantidad de álcali lignina extraída con la cepa *S. MDG 301* tras 7 días de incubación a 45 °C fue muy similar, aunque en este caso la solubilización de la lignina puede ser principalmente atribuida a la acción enzimática de la xilanasas (Figura 4.4B, punto 1).

Actualmente, la utilización de residuos de bajo coste y fácil adquisición como es el caso de los residuos agrícolas, como sustrato fermentable por microorganismos en condiciones SSF, constituye una estrategia importante para la obtención de materias primas que puedan a su vez ser transformadas por acción microbiana en nuevos materiales de alto valor comercial para diversas industrias. De hecho, la utilización de estos productos generados a partir de residuos está incrementándose de forma significativa en industrias tales como, la industria farmacéutica, alimentaria, papelera, textil y de fabricación de lubricantes, entre otras, reconociendo el potencial de las enzimas que actúan sobre los polímeros constituyentes, para generar modificaciones químicas

favorables en los sustratos (Pandey *et al.*, 2000; Roopesh *et al.*, 2006). Sin embargo, es importante destacar que la economía, la eficiencia y el éxito de estos procesos biotecnológicos dependen, en gran medida, de la selección y control de aspectos cruciales, como la naturaleza del sustrato, el tipo de microorganismo, y las condiciones de desarrollo del proceso. De ello se deduce que las investigaciones centradas en la identificación de las condiciones óptimas para lograr los niveles más adecuados de cada enzima implicada en el proceso, según el fin último del mismo, son fundamentales. En este sentido, y tal como se ha demostrado, los modelos multivariantes resultan útiles para optimizar de forma concurrente las variables experimentales, con el fin de encontrar las mejores condiciones operativas para los procesos biotecnológicos y discriminar los sistemas respecto a una o varias características interesantes.

Este tipo de estudios resultan de interés para poder predecir las condiciones óptimas de producción de una determinada enzima o factor ambiental que afecte al éxito de un proceso biotecnológico, de acuerdo con los objetivos planteados a nivel industrial.

4.2. Obtención y caracterización de oleogeles obtenidos a partir de paja de trigo control y fermentada en condiciones óptimas

Sobre la base de las condiciones óptimas estimadas por el modelo OPLS-DA, para obtener el más alto nivel de producción enzimática y el mayor grado de solubilización del sustrato, se llevó a cabo un nuevo proceso SSF utilizando paja de trigo como sustrato y la cepa *S. MDG 301* incubada a 45 °C durante 7 días, con el objetivo de comprobar la viabilidad del sustrato transformado como espesante para la obtención de oleogeles, en comparación con la paja de trigo control.

4.2.1. Caracterización química y estructural de la paja de trigo control (W) y de la paja de trigo fermentada por *Streptomyces* (FW)

Con objeto de conocer el efecto producido por el crecimiento de la cepa *S. MDG 301* sobre la paja de trigo, se llevó a cabo el análisis químico del control sin inocular (W) y de la paja de trigo fermentada (FW) por dicha cepa a los 7 días de incubación y 45°C. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.3.

Como se puede observar, el crecimiento de la cepa produjo una disminución del

contenido de lignina Klason en la paja transformada a los 7 días de incubación del 17,89%, respecto del control. Esta disminución podría atribuirse a la producción de enzimas oxidativas, que no pudieron ser detectadas en las condiciones ensayadas probablemente por estar adsorbidas al sustrato, tal como se ha comentado anteriormente. No obstante, cabe señalar que en estudios anteriores realizados en condiciones similares con otras cepas de *Streptomyces* se demostró la producción de lacasas por estos microorganismos (Moya *et al.*, 2011; Blázquez *et al.*, 2017).

Tabla 4.3. Composición química de la paja de trigo sin inocular (W) y de la paja de trigo fermentada (FW) por la cepa *S. MDG 301* tras 7 días de incubación a 45°C en condiciones SSF

	W (%)	FW (%)
Extractivos	4,56 ± 0,12	4,22 ± 0,12
Hidrosolubles	7,96 ± 1,75	13,45 ± 1,31
Lignina acido-soluble	2,19 ± 0,13	2,07 ± 0,29
Lignina Klason	24,53 ± 2,55	20,14 ± 2,6
Holocelulosa	59,63 ± 4,15	58,84 ± 2,38
Cenizas	1,13 ± 0,04	1,27 ± 0,06

Así mismo, se detectó en la paja transformada una disminución del 1,32% del contenido de holocelulosa,

atribuible a la producción de enzimas hidrolíticas (xilanas y CMCasa) implicadas en la degradación de celulosa y hemicelulosa. Por su parte, y como era de esperar, merced a la hidrólisis enzimática de los polisacáridos constituyentes de la lignocelulosa, la fracción hidrosoluble, que contiene oligosacáridos cortos, se incrementó en un 59,18%. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores al fermentar la paja de trigo con *Streptomyces viridosporus* T7A (Zeng *et al.*, 2013). Las diferencias encontradas en la composición del sustrato fermentado podrían atribuirse al patrón de producción de enzimas hidrolíticas detectado en esta cepa (apartado 4.1.2).

Por otra parte, con la observación al microscopio electrónico de barrido se corroboraron los cambios producidos en la morfología del sustrato durante el proceso SSF a lo largo del periodo de incubación, en comparación con el control (Figuras 4.5B y 4.5A, respectivamente).

Como se puede observar en la paja de trigo transformada por la cepa al séptimo día de incubación se pone de manifiesto una notable colonización del sustrato por el microorganismo y una aparente degradación de los tejidos (Figura 4.5B y 4.5D). Así mismo, se

pueden observar las consecuencias de la acción del microorganismo sobre los tabiques de separación de las células y la utilización de punteaduras celulares como vía de colonización (Figura 4.5D).

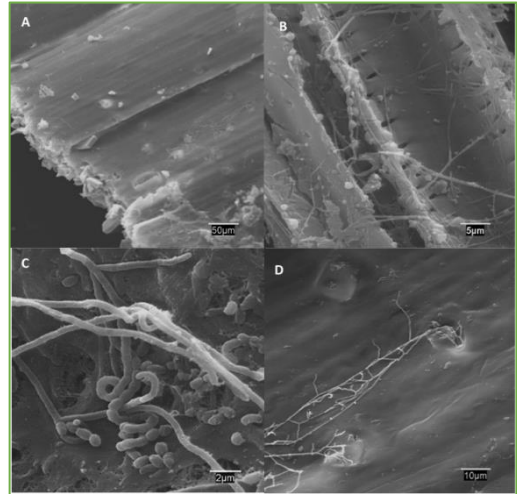


Figura 4.5. Fotografías obtenidas al microscopio electrónico de barrido de paja de trigo control (A) y paja de trigo transformada por *S. MDG 301* (B, C y D).

Adicionalmente, se utilizó la espectroscopia FTIR para analizar las modificaciones estructurales producidas en la paja de trigo por la cepa de *Streptomyces* en comparación con la paja de trigo control (Figura 4.6). La mayoría de las bandas de absorción características de los principales componentes del residuo utilizado aparecen bien definidas en los espectros y para su asignación se han utilizado descripciones publicadas en estudios anteriores (Tabla 4.4) (Buta *et al.* 1989;

Tabla 4.4. Asignación de las principales bandas de FTIR

Bandas	Asignación
3300 cm^{-1}	Tensión O-H aromáticos y alifáticos
2928-2852 cm^{-1}	Vibraciones en CH_3 y CH_2
1700-1725 cm^{-1}	Tensión C=O no conjugado con anillos aromáticos (carbonilos, carboxilos)
1720-40 cm^{-1}	Tensión C=O en grupos acetilo unidos a hemicelulosas
1640 cm^{-1}	Tensión C=O conjugado a anillos aromáticos (carbonilos)
1594-1609 cm^{-1}	Vibraciones en anillo aromático y tensión C=O ($S > G$)
1504-1515 cm^{-1}	Vibraciones en anillo aromático ($G > S$)
1455-1464 cm^{-1}	Deformación C-H asimétrica (en $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2-$)
1421-1424 cm^{-1}	Vibraciones en anillo aromático
1320-1330 cm^{-1}	Vibraciones en anillo aromático (unidades S y $G_{\text{condensadas}}$)
1270 cm^{-1}	Vibraciones en anillo aromático (unidades G)
1216-1225 cm^{-1}	Tensión C-C, C-O y C=O ($G_{\text{condensado}} > G_{\text{eterificado}}$)
1114-1125 cm^{-1}	Deformación C-H aromático en el plano (unidades S)
1030-1033 cm^{-1}	Deformación C-H aromático en el plano ($G > S$)
913-929 cm^{-1}	Deformación C-H aromático fuera del plano en unidades G
896 cm^{-1}	Enlace β 1-4 glicosídicos entre unidades xilosa de la hemicelulosa
833-834 cm^{-1}	Deformación C-H aromático fuera del plano en unidades S y H

Faix y Bottcher 1992; Pandey y Pitman 2003; Lin y Dence, 2012).

En la Figura 4.6, las bandas del espectro representan la distribución de los grupos funcionales que se asignaron a los tres componentes principales del residuo: hemicelulosas, celulosa y lignina. Una de las bandas más prominentes detectada en los espectros se sitúa alrededor de 3330 cm^{-1} y está asociada a grupos hidroxilo.

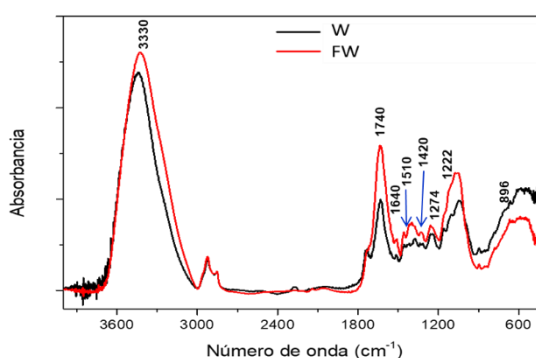


Figura 4.6. Espectros FTIR correspondientes a: paja de trigo sin inocular (W) (negro) y paja de trigo fermentada por *Streptomyces* (FW) (rojo).

Al comparar el espectro correspondiente a la paja de trigo fermentada con el de la paja control, se observa un aumento en la intensidad de esta banda, lo que pone de manifiesto la generación de nuevos grupos hidroxilos por escisión de los diferentes enlaces presentes en el sustrato por acción de las enzimas producidas por la cepa. Aproximadamente alrededor de 1740 cm^{-1} , se observa en la paja de trigo control un pico incipiente que puede asignarse a grupos carbonilo no conjugados o a grupos acetilo unidos a hemicelulosas (Sun *et al.*, 2005). Esta banda aparece menos intensa en la paja de trigo fermentada, lo que confirma la eliminación parcial de estas estructuras por acción de la cepa de *Streptomyces* (Zeng *et al.*, 2013).

Así mismo, tanto en el espectro de la paja de trigo control como en el de la paja transformada se observa una banda amplia alrededor de 1640 cm^{-1} , que aparece más pronunciada en el espectro de esta última, y puede corresponder a grupos carbonilo conjugados (Johar *et al.*, 2012). Además, la banda en torno a 1510 cm^{-1} junto a la banda en torno a 1420 cm^{-1} son también características de la vibración del esqueleto aromático de la lignina, y aparecen más débiles en la paja no tratada (Sun *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2014).

Así mismo, se observó una banda amplia correspondiente a las vibraciones de estiramiento superpuestas de los enlaces C-O de los éteres de arilo (1274 cm^{-1}) y de C-O y O-H de la estructura fenoxi (1222 cm^{-1}) (Meng *et al.*, 2014). Esta banda, atribuida por Zeng *et al.* (2013) a las unidades del anillo guayacil (G) y del anillo siringil (S), debería reducirse en intensidad tras la SSF con *Streptomyces*. No obstante, en nuestro caso se observó un aumento de la intensidad, de nuevo probablemente como consecuencia de la mejora de la accesibilidad a la estructura de la lignina tras la fermentación. Otro pico importante se observa alrededor de 896 cm^{-1} , atribuido a los enlaces β -1,4-glicosídicos entre las unidades de xilosa de la hemicelulosa (Sun *et al.*, 2005). Como se puede observar en el espectro, esta banda disminuye en el residuo fermentado con *Streptomyces*, respecto del control, de forma similar a lo observado anteriormente para los enlaces β -O-4 de la lignina.

4.2.2. Características reológicas de los oleogeles obtenidos a partir de ambos sustratos

Como ya se ha comentado anteriormente, una vez seleccionadas las condiciones óptimas de producción de las enzimas relacionadas con la degradación del residuo lignocelulósico y la solubilización de la lignina del

mismo mediante SSF, se utilizaron la paja de trigo control y fermentada por la cepa *S. MDG 301* a 45 °C y 7 días de incubación para preparar oleogeles, cuyas características reológicas se compararon con las de una grasa comercial que contiene jabones de litio como espesantes.

Aunque se ha descrito que los oleogeles ofrecen un gran potencial para ser utilizados en el área de la química ambiental y en las industrias farmacéutica y cosmética, no han sido hasta ahora ampliamente explorados para aplicaciones como lubricantes (Sánchez *et al.*, 2011b). Sin embargo, la industria de lubricantes y sus consumidores están muy interesados en la obtención de nuevos productos que no utilicen recursos finitos derivados del petróleo y que disminuyan el impacto ambiental de las grasas existentes. En este sentido, la utilización de materias primas 100 % biodegradables para la formulación de nuevas grasas lubricantes es un reto en la investigación actual. Uno de los componentes de las grasas lubricantes es el espesante que suele ser un jabón metálico dispersado en un aceite mineral o sintético (National Lubricating Grease Institute, 1994). Estos aceites minerales se están reemplazando por aceites vegetales, pero la sustitución de los jabones metálicos por espesantes respetuosos

con el medio ambiente exige una mayor investigación. Uno de los materiales que ofrecen mayor potencial para ser utilizado como espesante en la formulación de oleogeles es la biomasa lignocelulósica, habiéndose ensayado en este trabajo la idoneidad de un residuo agrícola muy abundante en España como la paja de trigo tras ser sometido a un proceso de fermentación en condiciones SSF por la cepa de *Streptomyces MDG 301*, en comparación con el residuo sin inocular que se utilizó como control. Los oleogeles obtenidos se caracterizaron reológicamente y se compararon los resultados con los correspondientes a una grasa lubricante comercial de litio (Figura 4.7).

El comportamiento viscoelástico típico de las grasas lubricantes de litio comerciales presenta valores del módulo de almacenamiento (G') cercanos a 10^4 Pa y valores del módulo de pérdida (G'') en torno a un orden de magnitud inferior (Figura 4.7 A), junto con una región de meseta bien desarrollada dentro de una amplia gama de frecuencias, característica de los sistemas coloidales tipo gel (Martín-Alfonso *et al.*, 2011). Como se muestra en la Figura 4.7A, donde las funciones SAOS (Small Amplitude Oscillatory Shear) se representan frente a la frecuencia dentro del rango

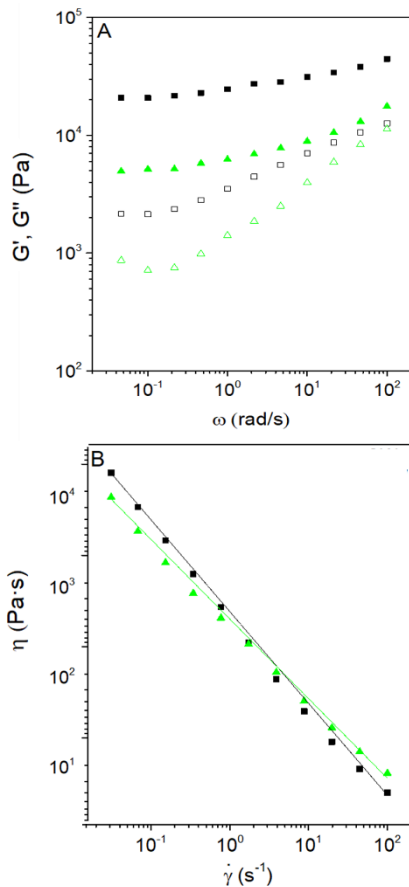


Figura 4.7. Funciones viscoelásticas lineales (A) y curvas de flujo viscoso (B) de oleogeles obtenidos con paja de trigo control (OW) y paja de trigo fermentada (OFW), funcionalizadas con NCO.

viscoelástico lineal a 25 °C, el comportamiento mencionado es reproducido por los oleogeles estudiados, presentando valores del módulo de almacenamiento (G') cercanos a 10^4 y valores del módulo de pérdida (G'') un orden de magnitud menor. El oleogel OW presenta valores

más altos de las funciones viscoelásticas, en comparación con el oleogel OFW. En principio, una reducción del contenido de lignina del residuo como consecuencia de la actividad enzimática debería aumentar los valores de los módulos viscoelásticos del oleogel OFW (Núñez *et al.*, 2011), sin embargo, los resultados mostraron un comportamiento disímil, mostrando valores más altos de los módulos viscoelásticos el oleogel OW, que contiene mayor contenido en lignina. Este comportamiento debe estar en parte relacionado no solo con la composición química del sustrato sino también con las modificaciones sufridas como consecuencia del proceso de fermentación (Tabla 4.3) (Borrero *et al.*, 2017).

La razón principal que podría explicar tal comportamiento se centra en el patrón de producción enzimática, observándose una influencia de la acción predominante de la xilanasas, que afecta principalmente a los biopolímeros ramificados (Samanta *et al.*, 2015) y, por tanto, a las características reológicas del oleogel obtenido.

Por su parte, en cuanto a las mediciones del flujo viscoso, la Figura 4.7B muestra los gráficos de viscosidad aparente frente a la velocidad de cizallamiento para los oleogeles estudiados. Como

puede observarse, en ambos casos se obtuvieron valores de viscosidad muy similares y un marcado comportamiento de cizallamiento. Las curvas de flujo viscoso fueron ajustadas al modelo de ley de potencia de Ostwald de Waele:

$$\eta = k \cdot \dot{\gamma}n^{-1},$$

donde k y n son índices de consistencia y flujo, respectivamente.

Estos dos parámetros proporcionan información fiable sobre el comportamiento del oleogel. La Tabla 4.5 muestra los valores de k y n de los oleogeles estudiados.

Tabla 4.5. Valores del índice de flujo (n) y el índice de consistencia (K) para oleogeles obtenidos a partir de paja de trigo control (OW) y paja de trigo fermentada (OFW)

Muestra	K	n
OW	1319	0,02
OFW	1098	0,15

Así mismo, para profundizar en el comportamiento de los oleogeles, se evaluó el módulo Plateau (Gn^0), un parámetro característico de la región de meseta del espectro mecánico, definido como la extrapolación de la contribución de los entrecruzamientos de G' a altas frecuencias (Baumgaertel y Winter, 1992). En el caso de sistemas coloidales y, en concreto, para grasas lubricantes, este módulo (Gn^0) se considera como una medida del número

de interacciones entre el agente espesante y el aceite lubricante, relacionado con la fortaleza y consistencia del esqueleto estructural de la grasa lubricante (Borrero *et al.*, 2017). El valor de Gn^0 obtenido para los oleogeles evaluados fue 20753 Pa y 5153 Pa para OW y OFW, respectivamente, lo que confirma que el oleogel obtenido con OW genera un gel con alta resistencia microestructural, similar a la resistencia presentada por lubricantes con grasas de litio comercial, los cuales presentan un Gn^0 en torno a 20000 Pa (Borrero-López *et al.*, 2018a). La razón que podría explicar tal comportamiento se centra en que los polímeros de cadena larga representan un componente clave en el fortalecimiento de los oleogeles, pudiendo ocurrir, por tanto, que las actividades enzimáticas producidas por la cepa en la paja de trigo fueran la causa de que los oleogeles obtenidos con el residuo fermentado presenten menores valores de las funciones viscoelásticas lineales (Kamali *et al.*, 2019).

4.2.3. Biodegradabilidad de los oleogeles: evolución del CO₂

La biodegradabilidad es un parámetro crucial para determinar el riesgo ambiental asociado a sustancias químicas cuando se despliegan en el medio ambiente. Si un oleogel, debido a

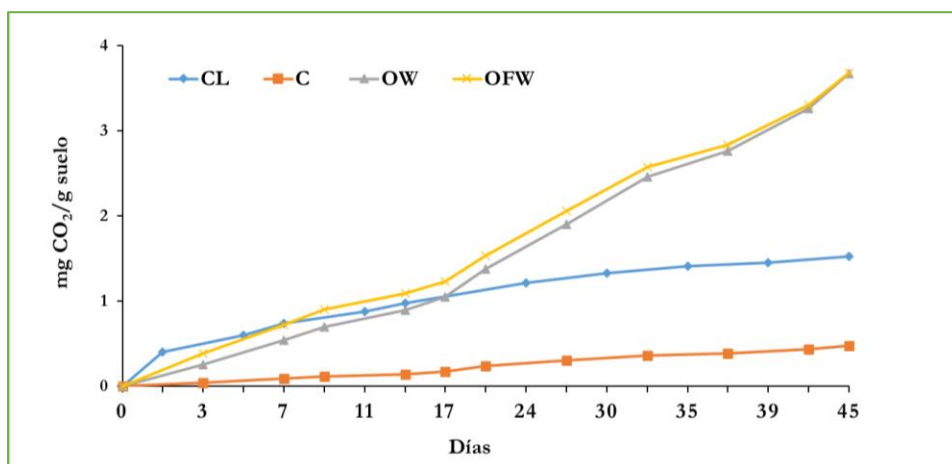


Figura 4.8. Evolución de la producción del CO₂ acumulado en los suelos control (C) y suplementados con los oleogeles OW, OFW y con la grasa comercial (CL) a lo largo del periodo de incubación (n=3, datos medios \pm s.e.m.)

su naturaleza hidrofóbica, permanece adsorbido por las partículas del suelo y es biodegradable, podría ser transformado por los microorganismos del suelo disminuyendo el daño ambiental (Cecutti y Agius, 2008). Por tanto, una alta biodegradabilidad implica una menor tendencia a la bioacumulación o a la persistencia en el medio ambiente (Stolte *et al.*, 2012).

La biodegradabilidad de los oleogeles obtenidos a partir de paja de trigo (OW), paja de trigo transformada por la cepa de *Streptomyces* (OFW) y de la grasa comercial (CL), se evaluó siguiendo la evolución del CO₂ producido, una vez añadidos a un suelo estándar dotado de microbiota. Los resultados obtenidos se compararon con el perfil respirométrico de una muestra de suelo sin modificar

(C) y con el de los oleogeles obtenidos con la paja de trigo sin inocular OW) (Figura 4.8).

Inicialmente, las muestras de suelos con los lubricantes mostraron perfiles similares (OW, OFW y CL) y una respiración más alta que la muestra control (C). Después de 17 días, evolucionaron de forma diferente, y la tasa de degradación de las muestras OW y OFW aumentó claramente. Los oleogeles de base lignocelulósica evaluados mostraron una cinética de degradación similar y muy disímil a la del lubricante mineral. Así, las muestras de suelo OW y OFW mostraron una mayor producción de CO₂, y por tanto una mayor biodegradabilidad, que el suelo con el lubricante comercial (CL), presentando 2,76 y 2,84 mg de CO₂ g⁻¹

de suelo acumulado, tras 40 días de incubación, respectivamente. En consecuencia, en comparación con el suelo control, las tasas de respiración de los suelos OW y OFW fueron 5 veces superiores; por su parte, en relación con la muestra de suelo CL, se observó un aumento de 2 veces.

Los principales componentes de los oleogelatos a base de lignocelulosa son compuestos naturales y, por lo tanto, los resultados obtenidos fueron los esperados, generando productos biodegradables, incluso cuando las muestras también contenían HMDI. Las diferencias en la biodegradabilidad de las muestras evaluadas a lo largo del tiempo podrían atribuirse, principalmente, a la mezcla química compleja (incluido el litio) contenida en la grasa comercial. El consumo de C orgánico puede conducir a una liberación de litio al entorno del suelo tratado con el lubricante comercial, lo que podría retrasar el proceso de biodegradación. A partir de este punto, se observaron diferencias significativas entre los bio-lubricantes y la grasa comercial. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores, en los que los bio-lubricantes (aceites de origen vegetal) mostraron una biodegradabilidad final superior a las muestras que contenían compuestos de origen mineral (Cecutti y Agius, 2008). Los resultados obtenidos ponen de

manifiesto que los oleogelatos a base de lignocelulosa se biodegradan a tasas más elevadas que el lubricante industrial, lo que les proporciona características que avalan su consideración como productos de seguridad ecológica.

4.2.4. Ensayo ecotoxicológico frente a *Lactuca sativa*

Es importante destacar que, durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula, ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir en la supervivencia y el desarrollo normal de la planta. Por esta razón, la germinación es una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos (Sobrero y Ronco 2008). Así, la inhibición en la elongación de la radícula constituye un indicador subletal muy sensible para la evaluación de efectos biológicos en la germinación de semillas de *L. sativa*.

En la Figura 4.9 se muestra el efecto de la exposición de los oleogelatos estudiados en la germinación de las semillas y la longitud radicular. Las pruebas de ecotoxicidad se realizaron en un suelo adicionado de oleogelatos (t_0) y un suelo con oleogelatos biodegradados durante 40 días (t_{40}) a 28 °C. En t_0 no se observó ningún efecto significativo sobre los parámetros evaluados, y por tanto

ninguna toxicidad para las sustancias ensayadas ($p < 0,05$); sin embargo, el oleogel con grasa comercial presentó el valor más bajo de germinación (60%) (Figura 4.9A). Del mismo modo, la exposición de las semillas a los oleogel biodegradados tras 40 días (t_{40}), no afectaron al parámetro de germinación de las semillas, aunque se detectó un aumento de la elongación de las raíces en las muestras OW y OFW en comparación con CL (Figura 4.9B).

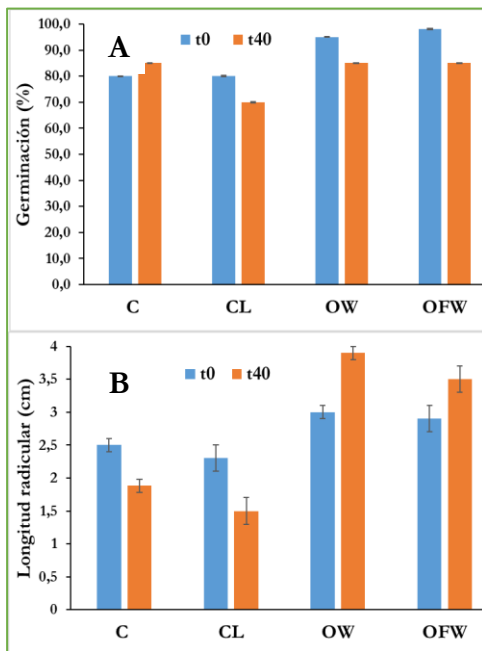


Figura 4.9. Porcentaje de germinación de las semillas (A) y longitud radicular (B) de *L. sativa* en el suelo control y en las muestras de suelo con lubricantes a t_0 y t_{40} . ($n=3$, datos medios \pm s.e.m.).

Por lo tanto, los resultados globales mostraron que el impacto tóxico de los

bio-lubricantes producidos fue insignificante para *L. sativa* en comparación con el suelo control. Es bien sabido que la transformación microbiana de la biomasa lignocelulósica conduce a la liberación de subproductos (es decir, ácidos aromáticos) que podrían a su vez incorporarse a las fracciones húmicas del suelo (Tuomela *et al.*, 2000). Esto podría explicar, aunque no haya diferencias significativas entre los tratamientos, que el mayor porcentaje de germinación en los dos tiempos evaluados corresponda al suelo tratado con OFW.

4.3. Obtención de oleogel a partir de ligninas residuales (lignina Kraft y álcali lignina) funcionalizadas por la lacasa SilA de *Streptomyces ipomoeae*

Nuestro interés por el aprovechamiento de residuos con fines industriales nos condujo a la obtención de oleogel a partir de ligninas residuales (lignina Kraft y álcali lignina). La álcali lignina fue extraída de paja de trigo (apartado 2.1.5) y se utilizó una lignina industrial Kraft de referencia. Ambas ligninas fueron tratadas enzimáticamente con la lacasa SilA previamente obtenida y caracterizada en nuestro laboratorio.

4.3.1. Funcionalización de lignina Kraft y álcali lignina por la lacasa SilA

La producción de la enzima recombinante se llevó a cabo según las condiciones óptimas establecidas en el apartado 2.3.2.2. Una vez obtenida la forma activa de la enzima, se determinó su actividad lacasa, obteniéndose rendimientos elevados, con valores en torno a 13-18 U mL⁻¹. La enzima se utilizó posteriormente para tratar de incrementar los grupos reactivos de las dos ligninas residuales (lignina Kraft y álcali lignina), determinándose la capacidad de funcionalización de dichas ligninas por la lacasa mediante estimación del grado de polimerización alcanzado en ambas.

4.3.1.1. Establecimiento de las condiciones de reacción de polimerización de las ligninas residuales por la lacasa SilA

Se realizó un diseño factorial 3² con 3 puntos centrales para estudiar el efecto de la concentración de lignina (g L⁻¹) y el tiempo de reacción (min) sobre el grado de polimerización de las ligninas tratadas con la lacasa. La variable respuesta se determinó mediante cromatografía de HPLC-DAD, analizando los perfiles cromatográficos obtenidos tras la reacción en las diferentes condiciones evaluadas. La cromatografía de

exclusión molecular es una técnica de gran importancia, especialmente cuando se aplica a especies de alto peso molecular, separando los componentes según el tamaño de la molécula.

Las variaciones de las fracciones de moléculas de alto (APM), medio (MPM) y bajo (BPM) peso molecular se establecieron como variable de estudio, debido a que indica el grado de polimerización de las moléculas, lo que se traduce en el incremento de la fracción de (APM) y disminución de las demás fracciones moleculares. La separación de los polímeros de lignina obtenidos se realizó utilizando una columna de exclusión molecular, estableciéndose el rango de masas moleculares de los polímeros según el tiempo de retención de los mismos.

Resulta importante tener en cuenta que se descartó la cuantificación de los picos de absorbancia observados antes del minuto 9,2 como APM, debido a que como se muestra en la Figura 4.10, esa fracción de masa molecular de la lignina coincide con la señal que se obtiene con el crudo enzimático, solapándose entre ellas y alterando los resultados.

Los perfiles cromatográficos de elución obtenidos a 254 nm para la lignina Kraft y álcali lignina, se muestran en las Figuras 4.11 y 4.12, respectivamente. En

todos los casos, se observó en las muestras tratadas con SiLA un incremento de los picos de absorbancia en los rangos de alto peso molecular (APM).

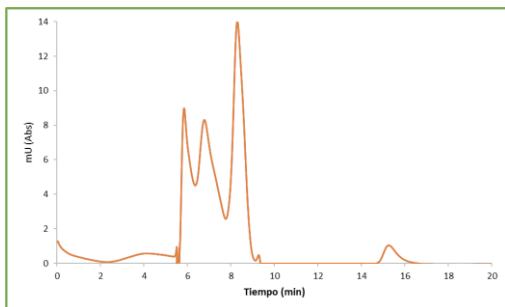


Figura 4.10. Perfil cromatográfico correspondiente a 1 U mL⁻¹ de lacasa SiLA en el crudo enzimático.

En las muestras que contenían una concentración de lignina Kraft de 1,25g L⁻¹ tratadas con SiLA, se observó el mayor incremento de polímeros APM a los 20 y 30 min de reacción, que pasaron a representar el 66,72% y 66,55% del total del área respectivamente, en relación con los tratamientos sin enzima, cuya área representó el 60,34%. De igual forma, en estas condiciones se produjo la mayor disminución de los porcentajes relativos a la fracción de MPM y el menor incremento de los porcentajes relativos a la fracción BPM (Figura 4.13).

Por su parte, en los tratamientos enzimáticos de álcali lignina se observó una variación más marcada en comparación con las muestras con

lignina Kraft, evidenciando la acción polimerizante de la enzima en este tipo

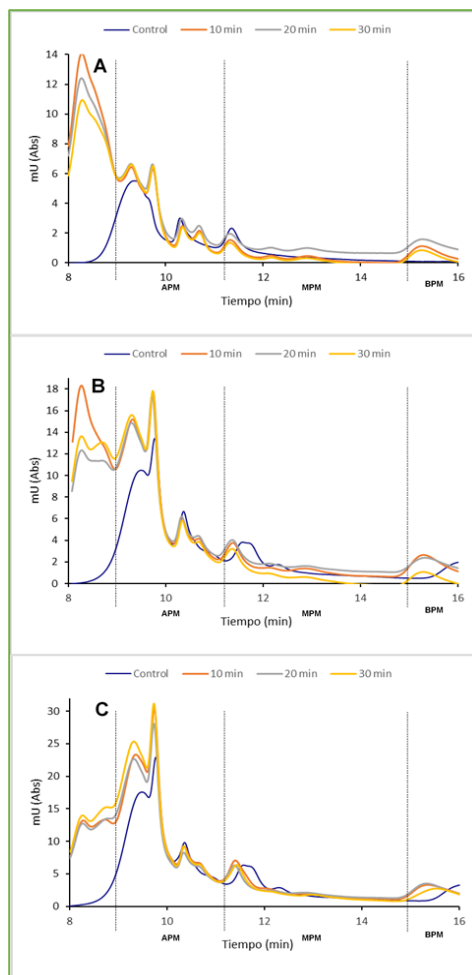


Figura 4.11. Perfiles cromatográficos correspondientes a distintas concentraciones (0,25, 0,75 y 1,25 g/L) de lignina Kraft control y de lignina Kraft tratada con SiLA durante 10, 20 y 30 min (Figuras 3.9A, 3.9B y 3.9C, respectivamente). APM= alto peso molecular, MPM= medio peso molecular, BPM= bajo peso molecular. n=3

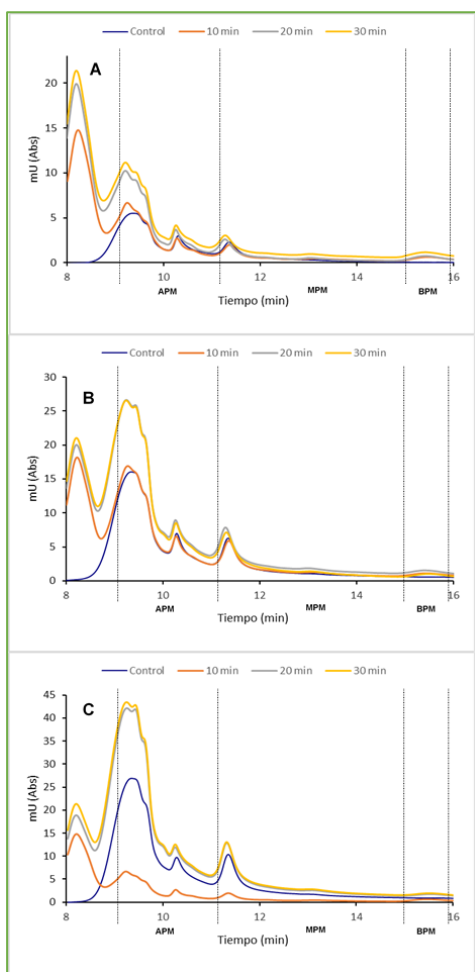


Figura 4.12. Perfiles cromatográficos correspondientes a distintas concentraciones (0,25, 0,75 y 1,25 g/L) de álcali lignina control y álcali lignina tratada con SilA durante 10, 20 y 30 min. APM= alto peso molecular, MPM= medio peso molecular, BPM= bajo peso molecular. n=3.

de lignina. En todas las muestras se observa un incremento de los porcentajes relativos de las fracciones APM, correspondiendo el mayor

incremento de esta fracción a una concentración de álcali lignina de 0,75 g L⁻¹ a los 30 minutos de reacción (72,70 %), con un incremento de un 24,54% en relación a la muestra control (48,16%). A su vez, se produjo una reducción significativa en la fracción de BPM con respecto al control (Figura 4.14). Los resultados obtenidos sugieren que las ligninas residuales fueron oxidadas por la lacasa SilA y como consecuencia, hubo un aumento en el peso molecular promedio de las mismas. En estudios anteriores se ha descrito la capacidad de las lacasas fúngicas para oxidar la lignina de los residuos lignocelulósicos y otros derivados de la lignina como los lignosulfonatos atribuyéndose la extensa polimerización obtenida a las reacciones entre los radicales fenoxilo u otras especies reactivas generadas por la lacasa que dan lugar a nuevos enlaces éter, C-C, aril-aril o aril-alquilo, lo que conduce a pesos moleculares más altos (Thakur *et al.*, 2016; Ortner *et al.*, 2018).

Así mismo, en estudios previos realizados con la lacasa SilA de *S. ipomoeae* se demostró su capacidad para polimerizar en condiciones alcalinas el lignano secoisolaricresinol (SECO) y otras ligninas técnicas (Moya *et al.*, 2011).

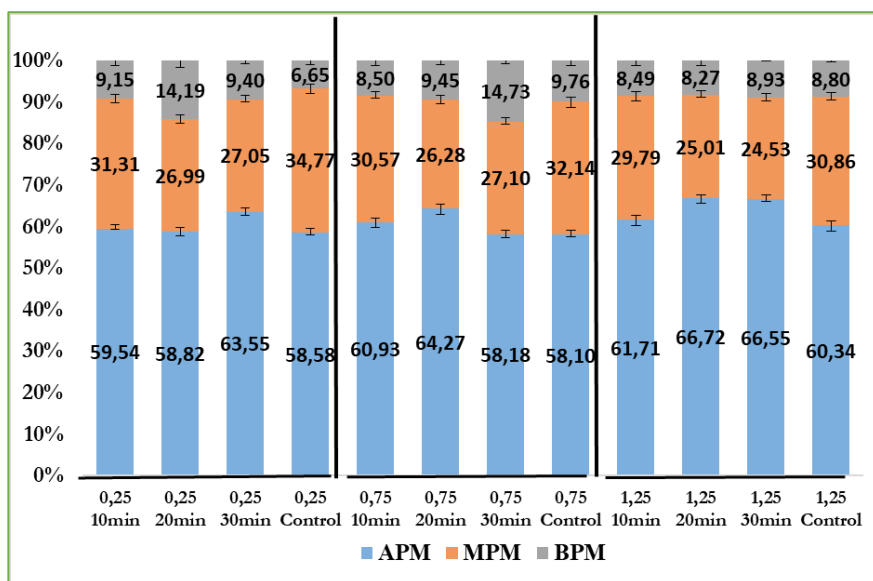


Figura 4.13. Porcentajes de las fracciones de alto, medio y bajo peso molecular (APM, MPM y BPM) correspondientes a las muestras que contienen diferentes concentraciones de lignina Kraft tratadas con SiLA a diferentes tiempos de incubación, en comparación con los controles.

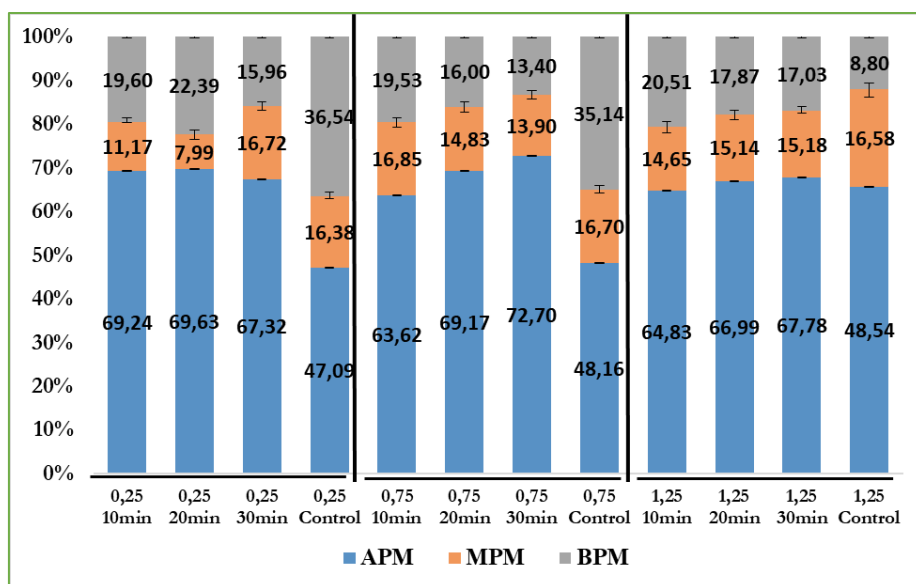


Figura 4.14. Porcentajes de las fracciones de alto, medio y bajo peso molecular (APM, MPM y BPM) correspondientes a las muestras que contienen diferentes concentraciones de álcali lignina tratadas con SiLA a diferentes tiempos de incubación, en comparación con los controles

El estudio realizado corrobora el interés de esta lacasa bacteriana para polimerizar ligninas residuales y abre una nueva vía hacia la utilización de estas ligninas funcionalizadas con SilA como materia prima para la obtención de otros materiales de interés industrial y que cumplen a su vez, las demandas actuales de sostenibilidad y reducción del impacto ambiental.

4.3.1.2. Optimización de las condiciones de polimerización mediante aplicación de la metodología de superficie de respuesta (MSR)

Con los datos obtenidos mediante el diseño factorial 3^2 se trataron de optimizar las condiciones de reacción mediante aplicación de la metodología MSR. Fue determinada la fracción de AMP como variable respuesta debido a que puede inferir el grado de polimerización de las ligninas por la acción de la lacasa.

Se determinaron los modelos cuadráticos con los que se relaciona la variable dependiente considerada en nuestro diseño (polimerización de lignina en la fracción de APM) en función de las variables independientes (tiempo y concentración de lignina). Las ecuaciones de los modelos resultantes

para lignina Kraft y álcali lignina se muestran a continuación:

$$\begin{aligned} \text{APM (Kraft)} = & 55,1582 + 0,681208 * t \\ & - 6,60333 * c \\ & - 0,015266 * t^2 + 0,0415 \\ & * t * c + 6,75333 * c^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{APM (AL)} = & 41,0438 + 14,3367 * c \\ & + 1,93112 * t^2 - 8,42 * c^2 \\ & - 0,085 * t * c - 0,036 \\ & * t^2 \end{aligned}$$

Donde t es el tiempo de reacción y c es la concentración de lignina

A partir de estas ecuaciones, se realizaron las gráficas de superficie de respuesta de la fracción APM utilizando lignina Kraft (Figura 4.15) y álcali lignina (Figura 4.16) con la finalidad de poder establecer las condiciones óptimas (tiempo y concentración de lignina) para la polimerización de estas ligninas con SilA. Como se puede observar en las gráficas, se logró obtener una zona crítica, donde se puede localizar la combinación de las variables independientes (t y c), que maximizan la fracción APM en el rango estudiado.

Para la lignina Kraft, se obtuvo un modelo de superficie de puntos mínimos y de acuerdo a los datos se estableció que la concentración de lignina óptima dentro del rango estudiado era de $1,25\text{g L}^{-1}$ con un tiempo

de reacción de 24,00 min. En el caso del álcali lignina, la concentración óptima correspondió a $0,7196 \text{ g L}^{-1}$ con un tiempo óptimo de reacción de 25,97 min.

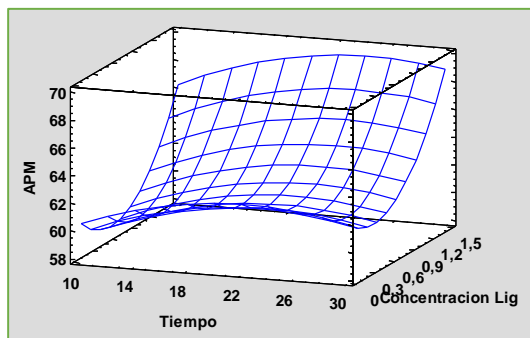


Figura 4.15. Superficie de Respuesta del efecto combinado de la concentración de lignina Kraft y el tiempo de reacción de la lacasa sobre la fracción de APM obtenida.

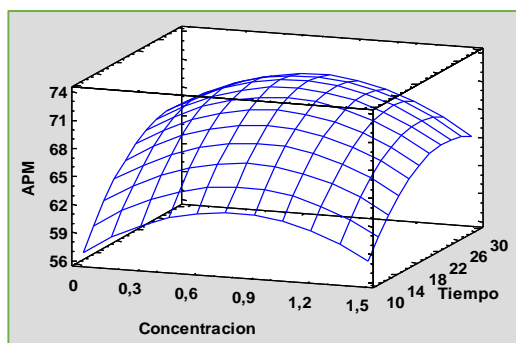


Figura 4.16. Superficie de Respuesta del efecto combinado de la concentración de álcali lignina y el tiempo de reacción de la lacasa sobre la fracción de APM obtenida.

Al evaluar el grado de polimerización alcanzado por el álcali lignina tras el

tratamiento enzimático en las distintas condiciones ensayadas, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los análisis estadísticos revelaron que el mayor grado de polimerización de la lignina, dentro del rango estudiado, correspondía al nivel 0 ($0,75 \text{ g L}^{-1}$) para la concentración de lignina, y al nivel 1 (30 min) para el tiempo de reacción. Por el contrario, en el tratamiento enzimático de la lignina Kraft, el análisis de los resultados puso de manifiesto que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en cuanto al contenido de la fracción de APM en el rango de valores estudiado para las variables independientes consideradas (tiempo de reacción y concentración de lignina).

4.3.2. Obtención de oleogeles a partir de lignina Kraft y álcali lignina funcionalizadas con SilA

4.3.2.1. Ensayo preliminar de funcionalización de lignina Kraft y su efecto en las características reológicas de los oleogeles

Debido a la ausencia de datos sobre la obtención de oleogeles a partir de lignina funcionalizada con lacasa y con el fin de comprobar la eficacia de la lacasa en la funcionalización de ligninas residuales, se desarrollaron ensayos

preliminares para conocer en qué medida las diferentes variables prefijadas en el ensayo de funcionalización (concentración de lignina y tiempo de reacción enzimática) podrían afectar a la calidad de los oleogeles. Como control se utilizó lignina Kraft tratada con lacasa inactivada. La Figura 4.17. muestra los espectros mecánicos (funciones SAOS) de los oleogeles en función del tratamiento de la lignina con la lacasa.

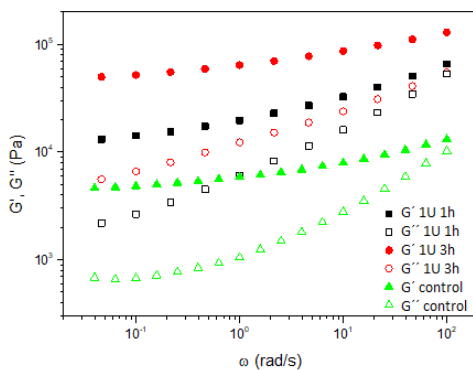


Figura 4.17. Funciones viscoelásticas lineales para oleogeles preparados a partir de lignina Kraft (80 g L⁻¹) funcionalizada con 1 U g⁻¹ de lacasa a diferentes tiempos de incubación.

Al analizar los resultados, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las muestras funcionalizadas y las muestras controles. El estudio reológico de los oleogeles elaborados utilizando lignina Kraft funcionalizada con SiLA, mostró un aumento tanto en el módulo de almacenamiento como en el módulo

de pérdida con respecto al oleogel elaborado con lignina Kraft control (Figura 4.15).

Estos resultados ponen de manifiesto que los oleogeles preparados a partir de lignina Kraft (80 g L⁻¹) funcionalizada con 1 U g⁻¹ de lacasa SiLA y 3 horas de incubación presentaron los mayores módulos viscoelásticos con valores de cuatro órdenes de magnitud decimal superiores al control, lo que implica un endurecimiento de los oleogeles dando características similares a las grasas comerciales que contienen litio como espesante.

La viscoelasticidad lineal observada permite confirmar que se obtuvieron oleogeles altamente estructurados en los que los valores del módulo de almacenamiento G' fueron siempre considerablemente superiores a los del módulo de pérdida G'' en todo el rango de frecuencias estudiado. Sin embargo, los valores de las funciones viscoelásticas lineales aumentaron claramente cuando la lignina se polimerizó con lacasa dando valores más altos de G' y G'' , resultando una respuesta viscoelástica lineal cualitativa y cuantitativamente similar a la encontrada en las grasas lubricantes tradicionales a base de jabón de litio (Cortés-Triviño *et al.*, 2018; Gallego *et al.*, 2020).

Los oleogeles obtenidos en este ensayo preliminar a partir de lignina residual funcionalizada (Kraft) presentaron como ya se ha comentado, respuestas viscoelásticas típicas de los espesantes habitualmente presentes en las grasas lubricantes tradicionales. Este comportamiento suele atribuirse, al menos en parte, al entrecruzamiento de los radicales de la lignina generados como consecuencia de su oxidación por SilA (Moya *et al.*, 2011; Van de Pas *et al.*, 2011). Este fenómeno da lugar a un material altamente estructurado que permite un mayor confinamiento del aceite, una mayor disponibilidad del complejo NCO-lignina para la posterior reacción con el aceite de ricino y una disposición más fuerte debido al aumento de los enlaces de hidrógeno unidos a los enlaces covalentes de la estructura (Gupta *et al.*, 2000; Widsten y Kandelbauer, 2008).

4.3.2.2. Caracterización reológica de los oleogeles obtenidos a partir de lignina Kraft y álcali lignina funcionalizadas con SilA

Una vez que se demostró que la acción polimerizante de la enzima lacasa SilA permite la obtención de oleogeles con características reológicas adecuadas, se procedió a evaluar la influencia de los

factores concentración de lignina y tiempo de reacción sobre las características reológicas de los oleogeles.

Para profundizar en el conocimiento de la influencia del grado de funcionalización de la lignina conseguido con la lacasa SilA en la calidad de los oleogeles, se estimó el módulo de Plateau (G_n^0) para los oleogeles obtenidos usando como espesantes a las ligninas Kraft y álcali lignina funcionalizadas con la lacasa SilA.

Los valores de G_n^0 obtenidos para los oleogeles que contenían 50, 75 y 100 g L⁻¹ de ligninas residuales después de 1, 2 y 3 horas de reacción resultaron bastante diferentes y no lineales, probablemente debido a las diferentes reacciones enzimáticas y a la generación de grupos activos (Tabla 4.6).

No existen diferencias estadísticamente significativas dentro de los grupos de cada una de las muestras, pero, sin embargo, al comparar los resultados obtenidos con lignina Kraft y álcali lignina se observó una alta significación estadística ($p < 0,001$) entre el comportamiento exhibido por los

Tabla 4.6. Valores del módulo Plateau (G_n^0), índice de consistencia (K) e índice de fluidez (n) de los oleogeles obtenidos utilizando lignina Kraft y álcali lignina tratadas con SilA (1 U g^{-1}) en diferentes condiciones.

Muestra	Tipo lignina	Concentración Lignina (g/L)	Tiempo (h)	G_n^0 (Pa)	K (Pa.s ⁿ)	n
1	Kraft	50	1	23196	4229	0
2	Kraft	50	3	25880	4672	0
3	Kraft	100	3	8275	2268	0,02
4	Kraft	100	1	10503	2853	0,08
5	Kraft	75	2	34875	5369	0
6	Kraft	75	1	35515	4062	0
7	Kraft	75	3	18683	3558	0
8	Kraft	50	2	23070	3404	0
9	Kraft	100	2	29745	4405	0
10	Álcali	50	1	10579	2256	0
11	Álcali	50	3	24490	4294	0
12	Álcali	100	3	12410	4196	0
13	Álcali	100	1	1316	2027	0,24
14	Álcali	75	2	2219	2323	0,25
15	Álcali	75	1	1709	2626	0,24
16	Álcali	75	3	2951	2780	0,21
17	Álcali	50	2	1941	2479	0,22
18	Álcali	100	2	1515	2550	0,28

oleogeles obtenidos, presentando valores evidentemente más elevados los oleogeles elaborados usando lignina Kraft polimerizada.

Dentro de los oleogeles elaborados con lignina Kraft, el valor máximo de G_n^0 (35515 Pa) corresponde a los oleogeles obtenidos con 75 g L^{-1} de lignina Kraft

funcionalizada con SilA tras 1 hora de reacción enzimática. Por su parte, el valor máximo de G_n^0 (24490) para álcali lignina se obtuvo con 50 g L^{-1} de álcali lignina a las 3 h. Estos resultados mostraron oleogeles estructuralmente fuertes con alta resistencia microestructural, similar o muy superior a la presentada por lubricantes

comerciales que contienen litio, los cuales presentan un Gn^0 en torno a 20000 Pa (Cortés-Triviño *et al.*, 2018; Gallego *et al.*, 2020).

Los valores del índice de flujo (n) y el índice de consistencia (k) (Tabla 4.6), se obtuvieron a partir del modelado de la respuesta viscosa mediante la aplicación del modelo potencial de Ostwald de Waele: $\eta = k \cdot \dot{\gamma}n^{-1}$.

Al evaluar los datos mostrados de k y n por los oleogeles obtenidos con ambas ligninas, se observa que son muy variables en las diferentes muestras analizadas (Tabla 4.6). Se encontraron bajos valores del índice de fluidez en ambos sistemas, comportamientos típicos del rendimiento de materiales como las grasas lubricantes (Borrero-López *et al.*, 2018b).

Para sistemas con índices de flujo similares, el valor de k puede dar una idea de la fuerza o consistencia del material. Los resultados muestran una relación directamente proporcional entre el valor de k y Gn^0 , lo que corrobora que las muestras con altos valores de Gn^0 son geles altamente estructurados. Al comparar estos oleogeles con los obtenidos con paja de trigo y paja de trigo fermentada, presentan un incremento de hasta 5 veces el índice de consistencia, esto

puede ser debido al efecto oxidativo que ejerce la enzima SilA en la lignina, generando un entrecruzamiento de los radicales de la misma, lo que da lugar a un material altamente estructurado (Moya *et al.*, 2011).

4.3.2.3. Optimización de las condiciones de preparación de los oleogeles mediante aplicación de MSR

Con objeto de optimizar las condiciones de elaboración de los oleogeles con características reológicas competitivas a partir de las ligninas funcionalizadas, se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos en las distintas condiciones ensayadas mediante aplicación de la técnica MSR, evaluando la influencia de la concentración de las ligninas ($g L^{-1}$) y el tiempo de reacción enzimática (h) sobre el comportamiento del módulo Plateau (Gn^0) de los oleogeles obtenidos.

Se determinaron las ecuaciones de regresión ajustada a los datos con los que se relaciona la variable dependiente (Gn^0) en función de las variables independientes (tiempo y concentración de lignina). Las ecuaciones del modelo ajustado a los datos para lignina Kraft y álcali lignina se muestran a continuación:

$$\begin{aligned} \text{Gn}^0 \text{ (Kraft)} = & -76249 + 2239,83 * c \\ & + 36506,7 * t \\ & - 15,3272 * c^2 - 49,12 \\ & * c * t - 8888 * t^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Gn}^0 \text{ (AL)} = & 81334,2 - 1628,51 * c \\ & - 21582,8 * t \\ & + 10,2648 * c^2 - 28,17 \\ & * c * t + 7017,5 * t^2 \end{aligned}$$

Donde t es el tiempo de reacción y c es la concentración de lignina

De los polinomios ajustados para la variable dependiente (Gn^0), se obtuvieron las superficies de respuesta, con la finalidad de poder establecer las condiciones óptimas para la viscoelasticidad de los oleogeles utilizando ligninas funcionalizadas con SilA. Las superficies de respuesta donde se representa la viscoelasticidad de los oleogeles (variable dependiente) en función de las dos variables independientes del diseño experimental considerado: concentración de lignina y tiempo de reacción, se muestran en la Figura 4.18 y 4.19 para lignina Kraft y álcali lignina, respectivamente.

Como se puede observar en la Figura 4.18, en el proceso de funcionalización de lignina Kraft con la lacasa SilA para su posterior utilización en la preparación de los oleogeles y evaluar su potencial utilidad como agente espesante en la

industria, se obtuvo un modelo de superficie de punto máximo. Se logró establecer que la concentración de lignina óptima correspondía a $66,66 \text{ g L}^{-1}$ de lignina Kraft y un tiempo de reacción de 1,98 h.

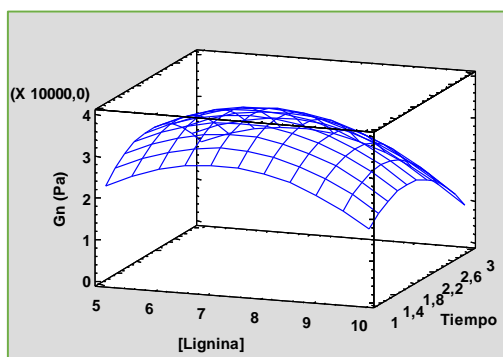


Figura 4.18. Superficie de respuesta tridimensional (3D) y gráfico de contorno que muestra la interacción mutua de la concentración de lignina Kraft ($50\text{-}100 \text{ g L}^{-1}$) y el tiempo de incubación (1-3 horas) en la viscoelasticidad de los oleogeles

En el caso del álcali lignina el modelo de superficie presentó un comportamiento dispar, obteniéndose un modelo de superficie de puntos mínimos (Figura 4.19), y, por lo tanto, no se obtuvo el valor máximo de deseabilidad. Sin embargo, de acuerdo con los resultados previamente obtenidos basados en los índices de consistencia (k) y fluidez (n) (k de $4294 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ y n de 0), se puede concluir que las condiciones óptimas dentro del rango estudiado de

funcionalización de la álcali lignina fue utilizando 50 g L^{-1} de lignina durante un tiempo de reacción de 3 h. En estas condiciones se obtuvo un oleogel con un valor máximo de G_n^0 de 24490.

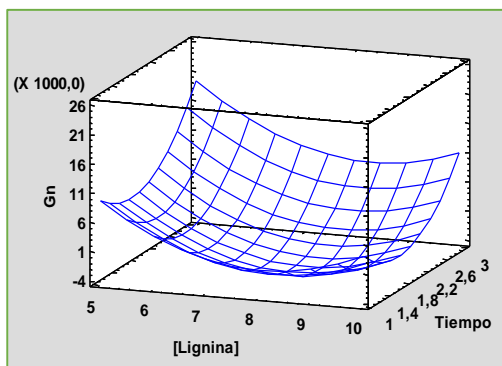


Figura 4.19. Superficie de respuesta tridimensional (3D) y gráfico de contorno que muestra la interacción mutua de la concentración de álcali lignina ($50\text{-}100 \text{ g L}^{-1}$) y el tiempo de incubación (1-3 horas) en la viscoelasticidad de los oleogeles.

Al comparar el comportamiento de los dos tipos de lignina, se demostró diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) en las características de los oleogeles obtenidos, lo que sugiere su diferente uso en la industria del sector.

4.3.2.4. Caracterización reológica de los oleogeles obtenidos con ligninas residuales funcionalizadas con lacasa en condiciones óptimas de reacción

Finalmente, con el objetivo de ver el comportamiento viscoelástico de los oleogeles, se utilizaron para obtener dichos oleogeles ligninas funcionalizadas en las condiciones óptimas para álcali lignina (50 g L^{-1} y tiempo de 3 h) y las más cercana posible a las óptimas para lignina Kraft (75 g L^{-1} y tiempo de 2 h) según los resultados anteriores.

Previamente al estudio del comportamiento viscoelástico de los oleogeles obtenidos con las ligninas funcionalizadas en condiciones óptimas, se caracterizaron dichas ligninas en cuanto a su composición química y espectroscopía FTIR, para conocer los cambios principales sufridos en dichas ligninas con respecto a la lignina control, sin funcionalizar, y el efecto de estos cambios en la producción de oleogeles.

De los datos obtenidos del análisis químico de las ligninas estudiadas, se pudo concluir que la lignina Kraft estaba más enriquecida en lignina, es decir, era una lignina más pura en comparación con la álcali lignina, presentando porcentajes de lignina total (lignina Klason más lignina soluble) de 89% y 67%, respectivamente. En concordancia con los contenidos de lignina, la muestra de lignina Kraft presentó un menor contenido en hemicelulosas (xilanos)

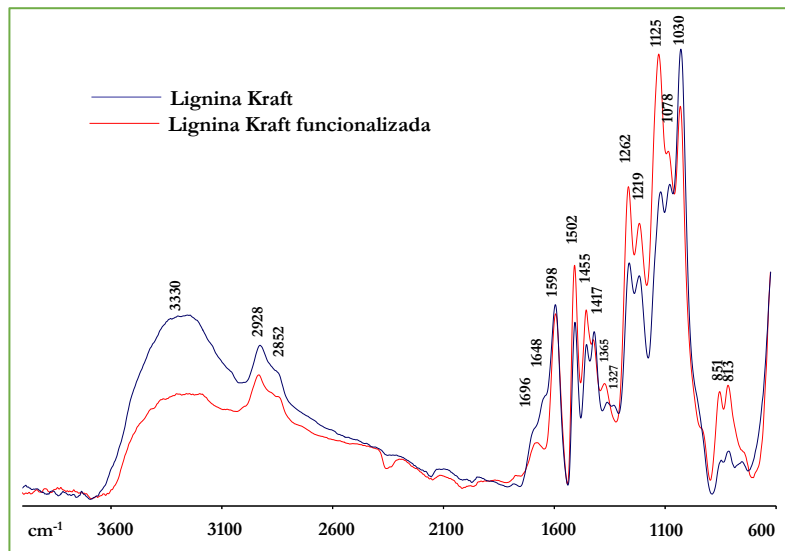


Figura 4.20. Espectros FTIR de lignina Kraft y lignina Kraft funcionalizada en condiciones óptimas

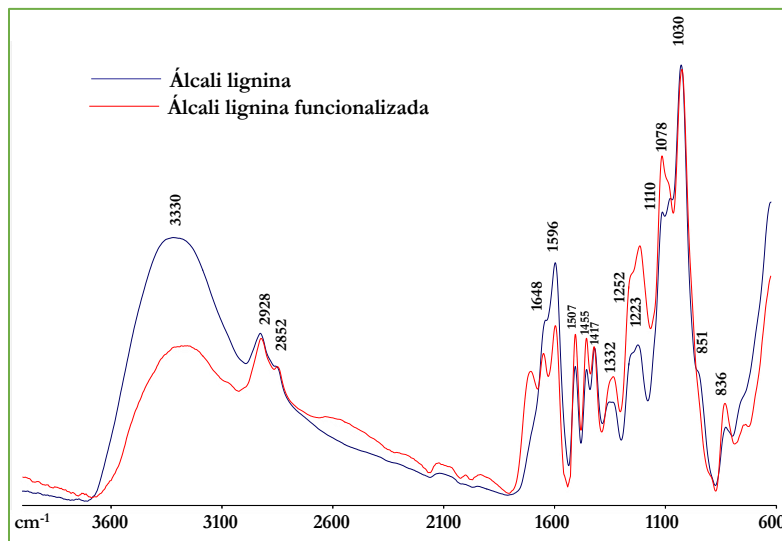


Figura 4.21. Espectros FTIR de álcali lignina y álcali lignina funcionalizada en condiciones óptimas

que la muestra álcali lignina (0,78% y 5,2%, respectivamente).

Por otra parte, se utilizó la espectroscopia FTIR para analizar las

modificaciones estructurales producidas en las ligninas residuales (Kraft y álcali lignina) por la acción polimerizante de la lacasa en comparación con las ligninas sin funcionalizar (Figura 4.20 y Figura

4.21). La mayoría de las bandas de absorción características de los principales componentes del residuo utilizado aparecen bien definidas en los espectros y para su asignación se han utilizado descripciones publicadas en estudios anteriores (Tabla 4.4) (Buta *et al.* 1989; Faix y Bottcher 1992; Lin y Dence, 2012; Pandey y Pitman 2003).

Los espectros de lignina Kraft y álcali lignina mostraron las bandas típicas asignadas a lignina. La banda a 3330 cm^{-1} está asociada a grupos OH tanto fenólicos como alifáticos. Las bandas a 2928 cm^{-1} y 2852 cm^{-1} se atribuyen a vibraciones de grupos C–H de las cadenas laterales de lignina (1455 cm^{-1} deformaciones C–H).

La lignina Kraft muestra pequeños hombros a 1700 cm^{-1} , atribuido a grupos carbonilos no conjugados (o debido a grupos carbonilos no conjugados en hemicelulosas), y 1645 cm^{-1} , grupos carbonilos conjugados, que sugieren una cierta oxidación de la lignina. La álcali lignina muestra un pequeño hombro a 1645 cm^{-1} . Ambas ligninas mostraron bandas en torno a 1600 , 1510 y 1420 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones en el anillo aromático. Finalmente, bandas asignadas a unidades siringilo a 1320 - 1330 cm^{-1} , 1114 - 1125 cm^{-1} y 833 cm^{-1} (esta última banda también puede atribuirse a unidades H) y unidades

guayacilo a 1270 - 1260 cm^{-1} , 1216 - 1225 cm^{-1} y 1030 cm^{-1} fueron visibles en ambas ligninas, siendo la lignina Kraft más enriquecida en unidades G, lo cual es característico de ligninas de maderas blandas (Fodil *et al.*, 2020), mientras que la álcali lignina presentó una mayor proporción de unidades S, junto con unidades G y H, típico de ligninas de plantas herbáceas lo cual indica oxidación de las ligninas (del Río *et al.*, 2007). Con respecto a las ligninas tratadas con lacasa, uno de los cambios más visibles en ambas ligninas es la disminución en la intensidad de la banda a 3330 cm^{-1} asociada a grupos OH tanto fenólicos como alifáticos, por acción de la lacasa.

Este efecto pudo ser corroborado en el caso de la lignina Kraft por un desplazamiento de la banda de 1645 cm^{-1} a 1676 cm^{-1} , carbonilos no conjugados, así como un incremento en su intensidad. Esta oxidación se puede observar mejor en el caso de la álcali lignina, mostrando un incremento en la intensidad de las bandas a 1700 cm^{-1} , atribuido a grupos carbonilos no conjugados, y 1645 cm^{-1} , grupos carbonilos conjugados. Diferentes trabajos han mostrado la disminución del contenido fenólico junto con un incremento del contenido en grupos carbonilos causado por la oxidación de

la lignina en presencia de lacasa. Así, las unidades monoméricas/oligoméricas oxidadas generadas a través de reacciones de acoplamiento pueden llevar a un incremento del peso molecular de la lignina (Pardo *et al.*, 2018).

En cuanto al comportamiento viscoelástico, la Figura 4.22 muestra la evolución de las funciones de viscoelasticidad lineal en función de la frecuencia de los oleogeles de ligninas funcionalizadas en las condiciones óptimas de reacción.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los valores de G' en las grasas lubricantes de litio convencionales suelen oscilar entre 10^4 y 10^5 Pa, a 25-75 °C, alrededor de un orden de magnitud superior a los valores de G'' (Franco *et al.*, 2005; Martín-Alfonso *et al.*, 2009a; Martín-Alfonso *et al.*, 2009b).

En ambos casos, los oleogeles estudiados muestran una evolución de las funciones SAOS muy similar a la encontrada para las grasas lubricantes estándar, obteniendo oleogeles muy bien estructurados y con características competitivas para su incorporación en la industria.

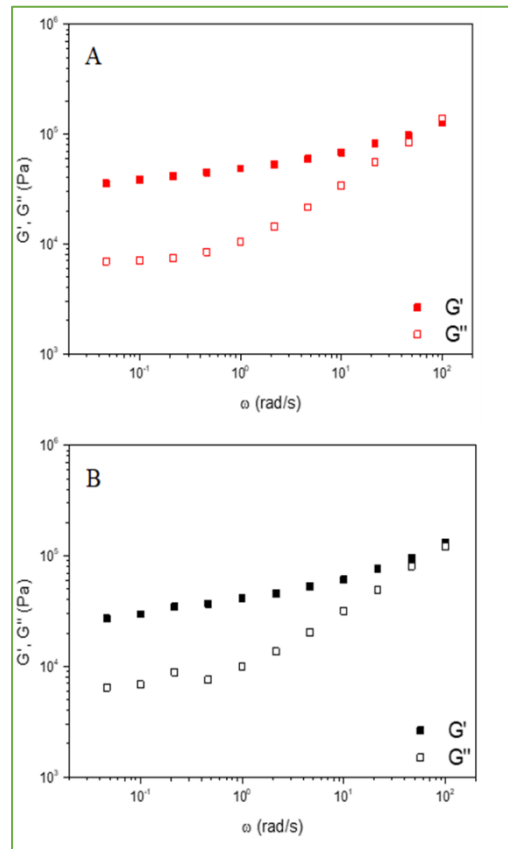


Figura 4.22. Funciones viscoelásticas lineales de los oleogeles elaborados a partir de lignina Kraft (A) y álcali lignina (B) funcionalizada con lacasa en condiciones óptimas de reacción.

Es importante señalar que el oleogel elaborado con lignina Kraft presenta valores de la función SAOS superiores a velocidades bajas en comparación con el oleogel elaborado con álcali lignina, lo que corrobora el hecho de las diferencias significativas encontradas en los valores del módulo de Plateau (G_n^0), índice relacionado con la fortaleza y consistencia del esqueleto estructural de

la grasa lubricante (Baumgaertel *et al.*, 1992).

Por último, los oleogeles obtenidos con ligninas residuales presentaron características reológicas con diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) en comparación con los oleogeles elaborados con paja de trigo y paja de trigo transformada por *Streptomyces*, este hecho corrobora, la gran capacidad de la enzima lacasa SilA para polimerizar ligninas residuales, resultando en polímeros más oxidables y con mayor capacidad de interacción con otras moléculas.

4.4. Obtención y caracterización de los hidrogeles elaborados a partir de quitosano y ligninas residuales (Kraft y álcali lignina) funcionalizadas con la lacasa SilA

Los hidrogeles son redes tridimensionales, flexibles y porosas que se hinchan en agua y fluidos biológicos debido a la presencia de grupos hidrófilos como el hidroxilo, el carboxilo y la amida (Hoffman, 2012). El quitosano es ampliamente usado en la fabricación de películas, ya que su estructura lineal permite tener buena flexibilidad y transparencia, pero, sin embargo, estos materiales presentan una baja resistencia mecánica y una alta sensibilidad a condiciones ambientales

(Kerch, 2015). Durante los últimos años se ha intentado modificar o reforzar este polímero con otros materiales para brindarle un mayor soporte y mayor durabilidad y de este modo, poder ampliar su rango de aplicación y su eficiencia. Con este objetivo se elaboraron en este trabajo hidrogeles en forma de películas poliméricas constituidas por diferentes proporciones de quitosano (50-70-90 %) y de ligninas residuales (lignina Kraft y álcali lignina de paja de trigo) (50-30-10 %) funcionalizadas con SilA, tal como se ha descrito en el apartado 3.4.2. Además, se evaluó el efecto de la adición de glicerol como agente plastificante. Para comprobar el efecto en la polimerización de las ligninas, como resultado de la funcionalización con SilA, sobre las propiedades de los hidrogeles, se prepararon hidrogeles sin funcionalizar con las mismas concentraciones de lignina y quitosano. Así mismo, se formularon hidrogeles de quitosano puro.

4.4.1. Caracterización de los hidrogeles

4.4.1.1. Propiedades físico-químicas

En este apartado se analizaron las propiedades físico-químicas de los hidrogeles preparados con distintas concentraciones de ligninas residuales y quitosano. Se obtuvieron películas

homogéneas, que fueron oscureciéndose a medida que aumentaba la concentración de lignina como era de esperar. Los hidrogeles de lignina Kraft eran ligeramente más oscuros que los elaborados con álcali lignina, debido, probablemente, a las diferencias en su composición (lignina Kraft más pura) y al método de obtención (apartado 4.3.2.4.). En contraste, el hidrogel elaborado con quitosano puro resultó transparente (Figura 4.23).

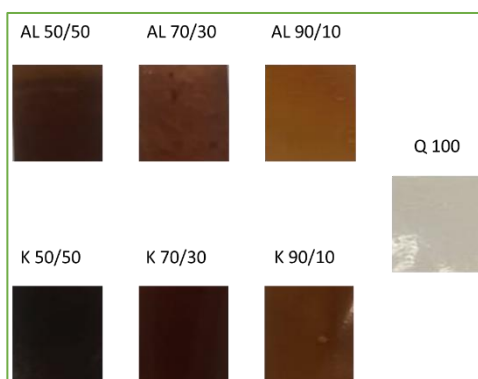


Figura 4.23. Aspecto visual de los hidrogeles elaborados con distintas concentraciones de lignina Kraft (K), álcali lignina (AL) y quitosano (Q).

En todos los casos se obtuvieron películas finas que se desprendieron fácilmente de la placa de Petri. Los espesores fueron similares en todos los tratamientos ensayados y no se observaron diferencias significativas en este parámetro en las diferentes formulaciones (0,05-0,08 mm).

Cuando se añadió glicerol a las mezclas de lignina y quitosano, se observó un incremento del espesor, lo que puede ser atribuido a que las moléculas de glicerol tienden a incrementar el espaciado entre las cadenas poliméricas ubicadas en cada capa, en vez de separar las capas entre sí, porque su radio hidrodinámico no podría ubicarse en el espacio existente entre las mismas (Farahnaky *et al.*, 2013). Por otro lado, se apreció que la adición del glicerol aumentó la flexibilidad de las películas, atribuyéndose este efecto a una disminución de las atracciones intermoleculares, lo que conduce a un aumento de la movilidad de las cadenas poliméricas (Debandi *et al.*, 2016).

El espesor promedio obtenido en las formulaciones diseñadas fue similar al descrito por Zhong y Xia (2008), para películas compuestas de quitosano y almidón de yuca, utilizando glicerol como plastificante, siendo el valor promedio del espesor en este caso de $0,100 \pm 0,017$ mm. Por otra parte, Ramos *et al.*, (2012) describieron valores de espesor en películas formuladas a base de quitosano y aceite esencial de *Cymbopogon citratus* de $0,03$ a $0,1 \pm 0,04$ mm. La homogeneidad en los resultados de este parámetro nos permite realizar comparaciones entre las distintas muestras en los sucesivos análisis, ya que el espesor afecta significativamente a las propiedades físico-mecánicas de las

películas, a la permeabilidad de vapor de agua y a las propiedades ópticas (Blanquicet *et al.*, 2015).

El espesor mostrado por las películas obtenidas a partir de ligninas funcionalizadas y quitosano, fue muy similar al correspondiente a las películas de lignina sin funcionalizar.

- **Contenido de humedad**

Una de las principales limitaciones en las aplicaciones de las películas de polisacáridos es su baja resistencia al agua, que se evalúa mediante diferentes métodos como la capacidad de absorción de agua, el contenido de humedad, la solubilidad, el ángulo de contacto y mediante la medición de la permeabilidad al vapor de agua (Martins *et al.*, 2012). El contenido de humedad es el parámetro relacionado con el volumen total de espacios ocupados por las moléculas de agua en la red microestructural del hidrogel. Este es un factor importante que determina la biodegradabilidad de las películas cuando son utilizadas con diferentes funciones en la industria, tal como materiales de envasado, tratamiento de aguas residuales o ingeniería de tejidos, entre otros (Gnanasambadam *et al.*, 1997; Rubilar *et al.*, 2013).

La Figura 4.24, muestra el contenido de humedad de los hidrogeles con lignina Kraft (A) y álcali lignina (B). En las muestras obtenidas con ligninas residuales sin funcionalizar y sin la adición de glicerol, las muestras no muestran un patrón de comportamiento claro en relación con el contenido de humedad en comparación a la muestra obtenida con quitosano puro. En las muestras con ligninas funcionalizadas sin glicerol, los contenidos de humedad de los hidrogeles fueron significativamente menores ($p < 0,05$) que el control correspondiente a la muestra de quitosano.

Esto puede atribuirse a que la funcionalización con SilA, aumenta el carácter no polar de estas ligninas residuales, generando una capa hidrofóbica que repele los enlaces de puentes de hidrógeno reduciendo la absorción de agua. Otros autores obtuvieron resultados similares cuando se incorporó un agente hidrofóbico a las películas de quitosano, como el tocoferol, carvacrol o el aceite esencial de canela (Ojagh *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2012; Rubilar *et al.*, 2013; Diossa *et al.*, 2017). Es importante resaltar que, las películas elaboradas con álcali lignina funcionalizada, muestran una disminución del contenido de humedad más acusado en comparación con las



Figura 4.24. Contenido de humedad (%) de los hidrogeles elaborados con diferentes proporciones de quitosano y lignina Kraft (A) o álcali lignina (B) funcionalizadas o no con SilA. (CG: con glicerol; SG: sin glicerol; K: lignina Kraft; KF: lignina Kraft funcionalizada; AL: álcali lignina; ALF: álcali lignina funcionalizada; Q: quitosano).

muestras elaboradas con la lignina Kraft funcionalizada, poniendo de manifiesto que la enzima tiene mayor capacidad de polimerizar este tipo de lignina. Esto coincide con el descenso en las señales correspondiente al -OH observados en el FTIR (ver Figura 4.20 y 4.21).

El efecto de la lacasa SilA se hace patente en el hecho de que todos los hidrogeles elaborados con lignina funcionalizada y sin glicerol presentaron

una humedad menor respecto a su control sin funcionalizar

Por último, en los hidrogeles con glicerol utilizando ambas ligninas residuales se observó, en general, un mayor contenido de humedad, a excepción de las muestras que contienen lignina Kraft funcionalizada. Este aumento, se puede atribuir a la capacidad de unión de este plastificante higroscópico al agua (López *et al.*, 2014; Ojagh *et al.*, 2010).

- **Solubilidad**

La solubilidad de las películas en el agua proporciona información del comportamiento de una película en ambientes acuosos (Pereda *et al.*, 2011). Con este fin se evaluó la resistencia de los hidrogeles al agua tras 24 horas.

La Figura 4.25, muestra el porcentaje de solubilidad de los hidrogeles ensayados. En las películas elaboradas con lignina Kraft (Figura 4.25A), los resultados mostraron que para obtener un gel estable se hace necesaria la adición de al menos un 30% de lignina en la formulación cuando la película no contiene glicerol. La adición de solo un 10% de lignina resultó en la total disolución del gel en agua tras 24 h.

Por su parte, en las muestras funcionalizadas y sin glicerol, se evidencia que con la adición de un 30% de lignina Kraft, la solubilidad es menor con respecto a su control sin funcionalizar. Sin embargo, este hecho no ocurrió en la muestra con 50% de lignina probablemente debido a que el efecto polimerizante de SilA da como resultado un hidrogel menos estructurado (más quebradizo), lo cual puede ser atribuido tal como se ha descrito, a que la polimerización de la lignina en altas concentraciones provoca que las redes físicas se aglomeren

produciendo una disminución de la resistencia de la película (Tanjung *et al.*, 2015). En la Figura 4.25B, se puede observar que, si se utiliza álcali lignina, se logra obtener un hidrogel estable añadiendo solo un 10%. Este hecho se puede atribuir al menor contenido de lignina y mayor contenido de carbohidratos de esta lignina residual, como ya se ha comentado anteriormente (apartado 4.3.2.4.) En las muestras funcionalizadas en ausencia de glicerol, de manera similar a los observado con la lignina Kraft, la acción de SilA provocó una disminución del grado de solubilidad. Cabe destacar que las muestras que presentaron mayor resistencia al agua fueron las que contenían ligninas funcionalizadas en la proporción 70/30, comportamiento similar a las muestras que contenían lignina sin funcionalizar y glicerol. Esto resultado corrobora el efecto positivo de SilA sobre la resistencia al agua de los hidrogeles.

Como era de esperar, la muestra control (100% Q), fue totalmente soluble a las 24 h observándose que a medida que disminuye la concentración de quitosano, la solubilidad de muestras disminuye notablemente (Blanquicet *et al.*, 2015). De esto se deduce la necesidad de utilizar conjuntamente con el quitosano polímeros como la lignina que permitan obtener películas con una

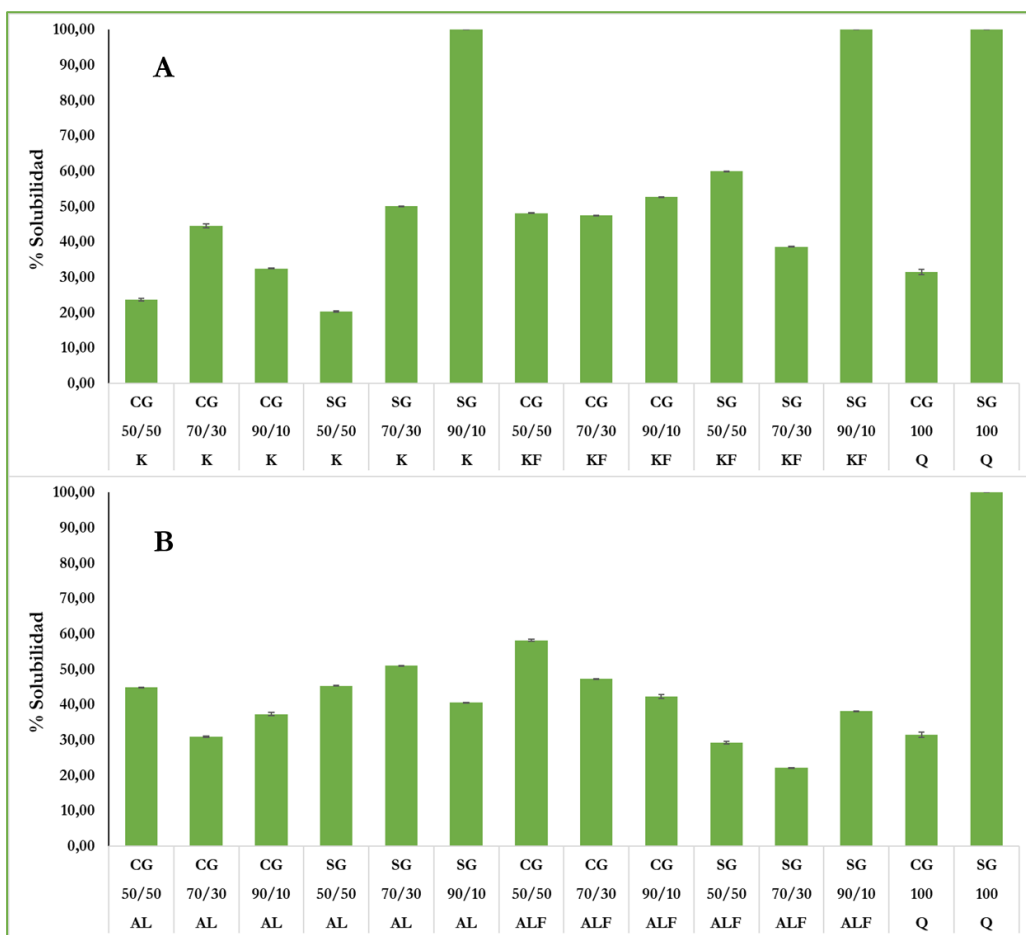


Figura 4.25. Solubilidad (%) de los hidrogeles elaborados con diferentes proporciones de quitosano y lignina Kraft (A) o álcali lignina (B) funcionalizadas o no con SiA. (CG: con glicerol; SG: sin glicerol; K: lignina Kraft; KF: lignina Kraft funcionalizada; AL: álcali lignina; ALF: álcali lignina funcionalizada; Q: quitosano)

estructura e hidrofobicidad adecuada para su aplicación. Dado el gran número de trabajos que existen sobre este versátil material es conveniente resaltar que en algunas aplicaciones tales como tratamientos de aguas residuales, remoción de metales pesados y contaminantes, sustituyentes artificiales de la piel, agente cicatrizante en

quemaduras, agente floculante, agente coagulante envasado y recubrimiento de alimentos, entre otros, se requieren películas con baja solubilidad con el objetivo de mantener la integridad de la estructura.

Sin embargo, en otras aplicaciones como películas comestibles para alimentos,

espesante en alimentos, agente de oxidación controlada, agente preservante sistemas liberadores de fertilizantes, aditivo para alimento de animales, sistemas liberadores de fármacos, entre otros, se puede preferir una alta solubilidad de la película (Ren *et al.*, 2017). Por tanto, se debe tener en cuenta que, dependiendo del tipo de aplicación, se requerirán distintas proporciones de ambos polímeros.

- **Capacidad de absorción de agua (CAA)**

El estudio de la capacidad de absorción de un medio acuoso por parte de las películas y el consiguiente aumento de volumen de éstas presenta gran interés en los procesos de liberación de factores bioactivos, de absorción y tratamiento de aguas residuales (Jain *et al.*, 2018).

Los resultados mostrados en la Figura 4.26, corroboran que los hidrogeles elaborados con menos de 30% de lignina resultaron estructuralmente inestables y se solubilizaron totalmente en agua tras 24 h. Para ambas ligninas residuales y en ausencia de glicerol la mayor capacidad de absorción la presentaron los hidrogeles formulados con 70% de quitosano y 30% de lignina. Como era de esperar, las películas con adición de glicerol a la formulación

presentaron de forma significativa menos capacidad de absorción de agua, debido a la función plastificante del glicerol (Abdullah y Dong, 2019).

Es destacable, que la capacidad de absorción de los hidrogeles aumentó en un 250% y en un 600% con la funcionalización mediante SilA de lignina Kraft y álcali lignina, respectivamente. El hidrogel formulado con lignina Kraft funcionalizada fue el que mostró mayor capacidad de retención.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización físico-química de los oleogeles quitosano-lignina y dada la destacable capacidad de retención de agua mostrada por los mismos sin una solubilidad excesivamente alta, así como la mejora estructural de la matriz por la adición de lignina funcionalizada en la mezcla, (superando la incompatibilidad de ambos polímeros por la acción de la lacasa), se seleccionaron para su posterior caracterización los hidrogeles elaborados con 70% de quitosano y 30% de lignina, sin glicerol. Las propiedades físico-mecánicas de estos hidrogeles fueron determinadas en el ICMM-CSIC y en el INIA. Además, se evaluó su potencial como material antibacteriano y

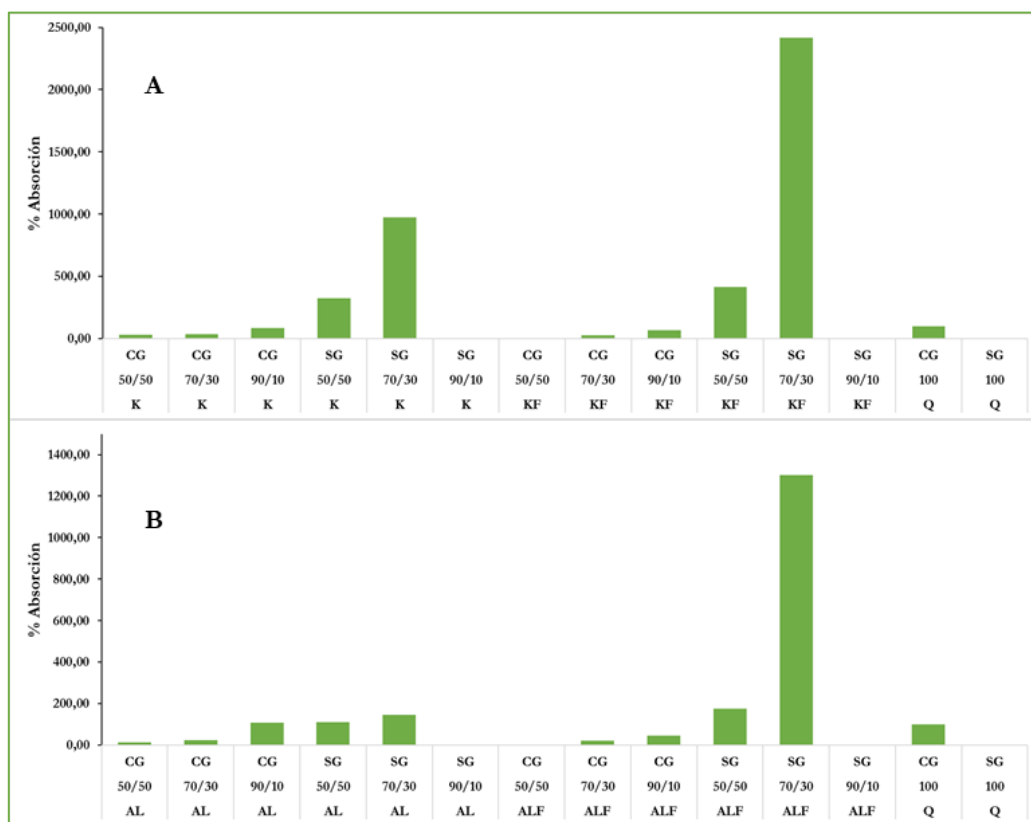


Figura 4.26. Capacidad de absorción de agua (%CAA) de los hidrogel elaborados con diferentes proporciones de quitosano y lignina Kraft (A) o álcali lignina (B) funcionalizadas o no con SilA. (CG: con glicerol; SG: sin glicerol; K: lignina Kraft; KF: lignina Kraft funcionalizada; AL: álcali lignina; ALF: álcali lignina funcionalizada; Q: quitosano).

como agente de adsorción de contaminantes ambientales como los colorantes textiles. Por último, se estableció el grado del biodegradabilidad y ecotoxicidad de dichos hidrogel. Debido a la inestabilidad en agua de los hidrogel con quitosano puro, no fueron utilizados como control para este ensayo (ver apartado solubilidad).

4.4.1.2. Propiedades físico-mecánicas

- Resistencia a la tracción (TS), alargamiento a la rotura (EB) y módulo elástico (E)

Como cualquier material plástico, las películas biodegradables deben poseer cierta resistencia mecánica y extensibilidad para mantener su integridad y capacidad de barrera durante el envío o su manipulación (Ren

et al., 2017). Con este objetivo se determinaron las propiedades mecánicas de las películas obtenidas con quitosano y ligninas residuales (70/30) funcionalizadas con SilA y no funcionalizadas. Los resultados obtenidos respecto a la resistencia a la tracción (TS), el alargamiento a la rotura (EB) y el módulo de Young o módulo elástico (E) se muestran en la Figura 4.27.

Las muestras elaboradas con lignina Kraft sin funcionalizar presenta un valor menor de TS y EB (Figura 4.27A y 4.27B), en comparación con la muestra elaborada con álcali lignina sin funcionalizar, probablemente debido a su composición, en el cual, la proporción de lignina es mayor en la muestra de Kraft.

Estos resultados coinciden con los descritos por Aradmehr y Javanbakht (2020), los cuales evaluaron películas de diferentes concentraciones de lignina y quitosano, donde los resultados mostraron que la resistencia a la tracción de las películas disminuyó al aumentar la lignina, como consecuencia a que un alto porcentaje de lignina aumenta la fractura de las cadenas poliméricas y su flexibilidad e hinchazón, lo que conduce a una menor resistencia mecánica. Además, el alargamiento a la rotura, como medida de la plasticidad de la

película, disminuyó con el aumento de la lignina, lo fue atribuido a las características frágiles de la lignina incluida en la matriz polimérica, que dio lugar a la reducción de las propiedades dúctiles.

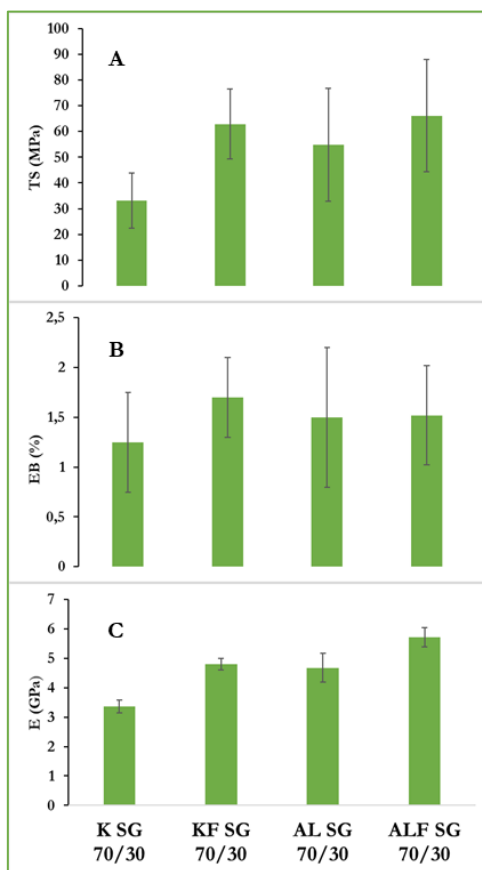


Figura 4.27. Resistencia a la tracción (A), alargamiento a la rotura (B) y modulo elástico (C), de las películas de quitosano y ligninas residuales (Kraft y álcali lignina) funcionalizadas o no con SilA, en ausencia de glicerol (SG). K: lignina Kraft; KF: lignina Kraft funcionalizada; AL: álcali lignina; ALF: álcali lignina funcionalizada; Q: quitosano.

Por su parte, en las muestras funcionalizadas se puede observar una ligera mejoría de los parámetros TS y EB (Figura 4.27A y 4.27B), en comparación con las muestras sin funcionalizar. Este resultado se puede atribuir al efecto polimerizante de las ligninas por la enzima SilA, ya que como se ha comentado anteriormente aumenta la oxidación de la molécula de lignina, permitiendo su unión con las moléculas de quitosano, generando así estructuras con mayor resistencia mecánica (Crouvisier-Urión *et al.*, 2017). Otro hecho que confirma que la adición de ligninas residuales funcionalizadas da lugar a películas menos flexibles o más rígidas es el aumento del módulo elástico (módulo de Young) (Figura 4.27 C). Los resultados muestran que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras funcionalizadas y las muestras no sometidas a la acción de la enzima, poniendo de manifiesto nuevamente la acción polimerizante de SilA. Así mismo, los hidrogeles elaborados con álcali lignina presentaron los mayores valores de este parámetro, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con las muestras de lignina Kraft funcionalizadas. Las diferencias observadas en el valor de este parámetro entre los hidrogeles elaborados con los

dos tipos de lignina y entre las muestras funcionalizadas y no funcionalizadas demuestran de nuevo la capacidad polimerizante de la lacasa SilA.

4.5. Ensayos conducentes a evaluar el potencial tecnológico de los hidrogeles.

4.5.1. Evaluación de la capacidad antibacteriana de los hidrogeles

Debido a que se había demostrado previamente que los extractos de lignina y quitosano muestran actividad antibacteriana, se decidió evaluar el efecto de los hidrogeles obtenidos de la unión de ambos polímeros sobre el crecimiento bacteriano (Kim *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016; Alzagameem *et al.*, 2019). Para ello, se utilizaron *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922 en hidrogeles formulados con 70% de quitosano y 30% de cada una de las ligninas funcionalizadas con SilA y sin funcionalizar. Para el ensayo, los hidrogeles se mantuvieron en contacto con soluciones estándar (10^8 - 10^9 ufc mL⁻¹) de los microorganismos durante 24 h a 37 °C.

Como se muestra en la Figura 4.28, en todos los casos se observó una drástica reducción de al menos 4-5 órdenes de

magnitud decimal en el recuento de los microorganismos viables tras 24 h de tratamiento, estos resultados están relacionados con la capacidad poliaciónica del quitosano, el cual facilita las interacciones con las superficies (denominadas interacciones poliméricas) y puede provocar una fuerte adhesión mediante interacciones de corto alcance de distinta naturaleza, como los enlaces de hidrógeno (Rinaudo, 2006)

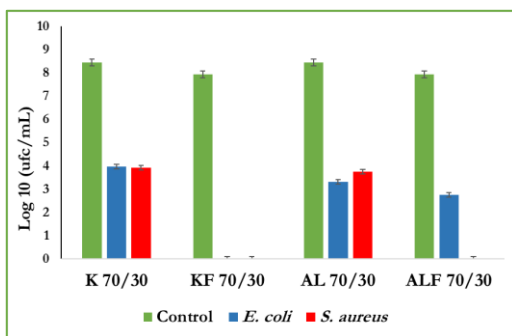


Figura 4.28. Efecto antibacteriano de los hidrogeles de quitosano y ligninas residuales funcionalizadas o no con SilA sobre el recuento de viables de *E. coli* y *S. aureus*

En el caso de *E. coli* (Figura 4.28), es de destacar que los hidrogeles formulados con las ligninas funcionalizadas produjeron una reducción en el número de microorganismos mucho mayor (2 órdenes de magnitud decimal) que en el caso de los hidrogeles constituidos por ligninas sin funcionalizar, siendo la

formulación 70/30 con lignina Kraft funcionalizada la más efectiva en la reducción del número de microorganismos (9 órdenes de magnitud decimal). Estos resultados ponen de manifiesto el efecto de SilA sobre el aumento de reactividad de la lignina, generando una mayor interacción y aumentando la adhesión entre las partículas.

Resulta importante destacar, que la eficacia antibacteriana de los hidrogeles constituidos por ligninas funcionalizadas fue mucho más notable sobre *S. aureus*. Como se observa en el Figura 4.28, se consiguió, en este caso, una reducción total de los microorganismos viables presentes en la solución. Resultados similares han sido descritos por Rai *et al.*, 2017, los cuales evaluaron las propiedades antibacterianas de las películas de lignina y quitosano contra dos cepas microbianas *B. subtilis* y *P. aeruginosa*, mostrando un gran potencial antibacteriano frente a las cepas evaluadas. Por otra parte, Aradmehr y Javanbakht (2020), evaluaron la capacidad antibacteriana de películas basadas en compuestos lignocelulósicos y quitosano contra *E. coli* y *S. aureus* los resultados mostraron que la película de lignina/quitosano tiene una elevada

actividad antibacteriana contra las bacterias grampositivas y gramnegativas, logrando la reducción total de las cepas evaluadas.

4.5.2. Capacidad de retención de colorantes textiles

A continuación, se analizó la capacidad de los hidrogeles seleccionados para retener distintos colorantes textiles, presentándose en la Tabla 4.7, los porcentajes de retención de color obtenidos tras el tratamiento de distintas concentraciones de los 3 colorantes ensayados por los hidrogeles evaluados.

Todos los hidrogeles ensayados mostraron una gran capacidad de adsorción de los colorantes textiles, que fue superior del al 70% tras 24 h de tratamiento. El hidrogel con mayor capacidad de retención de colorantes fue el elaborado con quitosano y álcali lignina (70/30), lográndose una adsorción de más del 99% tras 24 h de los colorantes a la mayor concentración ensayada (Figura 4.29).

Resulta importante destacar la capacidad de retención de estos hidrogeles, teniendo en cuenta la cantidad en mg de colorante que se adsorbe por cm^2 de hidrogel. En el caso del colorante Ponceau, se puso de manifiesto que 2,5

mg de hidrogel tienen la capacidad de adsorber 15,2 veces su peso (38 mg).

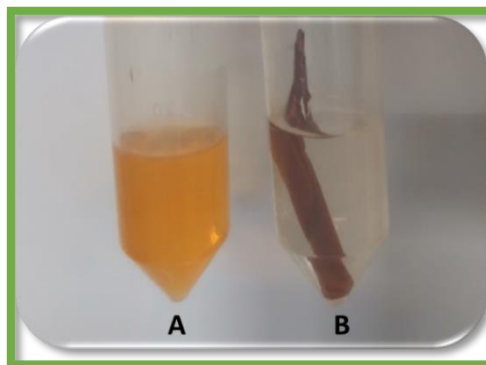


Figura 4.29. Fotografía que muestra solución del colorante textil Orange II $100\mu\text{M}$ (A) y retención del colorante por hidrogeles elaborados con quitosano y álcali lignina en proporción 70/30 tras 24h (B).

Cabe señalar así mismo, que no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con los hidrogeles obtenidos con las ligninas no funcionalizadas y las funcionalizadas con SilA. En consecuencia, se puede deducir que, en las condiciones ensayadas, la funcionalización de las ligninas por SilA no ejerce una mejora significativa en la capacidad de retención de colorantes textiles. Sin embargo, el hecho demostrado de que estos hidrogeles formulados con lignina y quitosano presentan una gran capacidad de adsorción, sugiere su posible aplicación como un nuevo biomaterial bioadsorbente para la depuración de

Tabla. 4.7. Porcentaje de retención de colorantes textiles por los hidrogeles elaborados con 70% de quitosano y 30% de ligninas residuales funcionalizadas o no con SiA tras 24 h de tratamiento.

	K 70/30	KF 70/30	AL 70/30	ALF 70/30
Methyl Orange				
100µM	97,75	80,89	99,52	93,82
500µM	82,55	81,94	95,58	89,31
1mM	96,37	94,29	99,25	97,87
Orange II				
100µM	94,30	94,68	97,55	99,87
500µM	92,47	92,25	99,28	98,89
1mM	97,35	98,63	99,81	99,60
Ponceau SS				
100µM	70,07	70,03	74,64	61,20
500 µM	82,08	80,56	95,94	85,03
1 mM	86,51	95,89	99,36	99,74

aguas residuales provenientes de la industria textil. Es bien conocido que el tratamiento ecológico y económicamente racional de las aguas residuales industriales es una necesidad debido a la creciente escasez de agua dulce (Varjani *et al.*, 2021).

En esta industria preocupa especialmente el vertido de los colorantes de tipo azo tanto por la cantidad, al ser el grupo de tintes más utilizados, como por su baja biodegradabilidad (Dos Santos *et al.*, 2007). Este último hecho se ve agravado porque en las condiciones anaerobias inherentes a los tratamientos de depuración convencional de aguas, tiene

lugar la reducción del enlace tipo azo lo que da lugar a la formación de aminas aromáticas y tóxicas (o-toluidina y tipo aminobifenil) y potenciales carcinógenos (Tauber *et al.*, 2005; Popli y Patel, 2015).

En los últimos años se han estudiado tecnologías avanzadas de tratamiento de aguas residuales para resolver este problema, siendo los tratamientos biológicos mediante la utilización de microorganismos y/o sus enzimas oxidativas los más prometedores en cuanto a eficacia, sostenibilidad y, en un futuro, rentabilidad. Sin embargo, en estos estudios se ha puesto de manifiesto ciertos inconvenientes que

impiden hoy por hoy la implementación de estos sistemas degradativos. Uno de ellos reside en las propiedades físico-químicas de los efluentes, (pH, temperatura, el contenido en NaCl, otras sales y metales) que afectan negativamente a la viabilidad de los microorganismos y a la actividad de las enzimas (Bulgariu *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha observado en ocasiones un aumento de la toxicidad debido a subproductos incoloros resultantes de la acción enzimática (Moya *et al.*, 2010) y/o del microorganismo (Katheresan *et al.*, 2018). Por estos motivos, hoy en día se sugieren estrategias mixtas para el tratamiento de efluentes con tintes textiles en donde el primer paso sea la adsorción de los colorantes y a continuación se proceda a la bio-remediación de este material. Entre los métodos físico-químicos, la adsorción es una alternativa prometedora para eliminar colorantes de medios acuosos, debido a su eficiencia, alta selectividad, bajo costo, facilidad de operación, simplicidad y disponibilidad en una amplia gama de condiciones experimentales (Bulgariu *et al.*, 2019). Estos mismos autores, entre otros, demuestran la utilidad de nuevos bioadsorbentes hechos con residuos lignocelulósicos (hojas) para la eliminación de colorantes azoicos y sus posibles usos en el tratamiento de aguas residuales industriales (Abdolali *et al.*,

2014; Tran *et al.*, 2015; Bulgariu *et al.*, 2019).

Así, la utilización de los hidrogeles de lignina y quitosano podrían ser utilizados en una primera fase de adsorción de los colorantes en el efluente y gracias a su alta biodegradabilidad ser sometidos a procesos de biorremediación (compostaje) o a un tratamiento específico con microorganismos y/o enzimas seleccionadas.

4.6. Biodegradabilidad de hidrogeles: evolución del CO₂

Como ya se mencionó anteriormente en el apartado 4.2.3, la biodegradabilidad es un parámetro crucial para determinar el riesgo ambiental asociado a sustancias químicas cuando se despliegan en el medio ambiente (Cecutti y Agius, 2008). Aun sabiendo que los polímeros lignina y quitosano son biodegradables a largo plazo, para asegurar el posible riesgo ambiental potencialmente asociado a la degradación de los hidrogeles obtenidos, se evaluaron tanto su degradación aerobia, como su ecotoxicidad.

En la Figura 4.30 se muestra la evolución del CO₂ en las muestras de suelo tras la adición de los hidrogeles obtenidos con ambas ligninas y quitosano, en comparación con el perfil respirométrico de una muestra de suelo

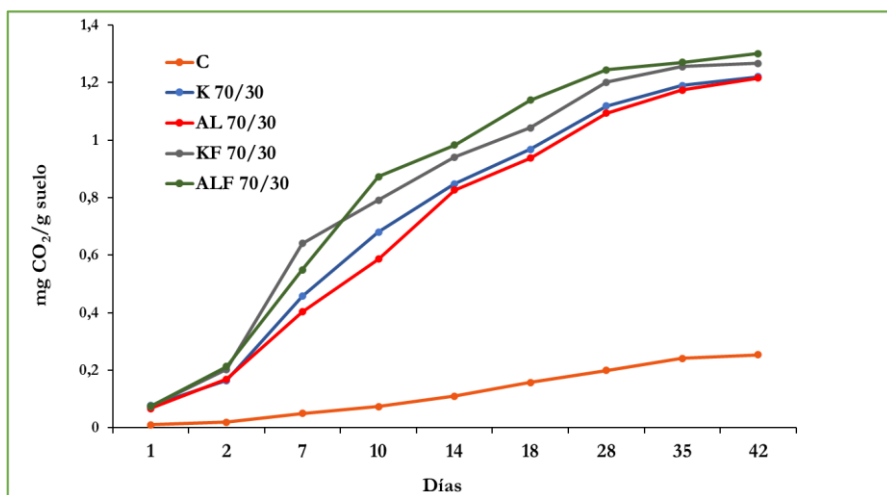


Figura 4.30. Evolución de la producción del CO² acumulado en los suelos control (C) y suplementados con hidrogeles formulados con ligninas residuales funcionalizadas o no en una proporción 70/30. (n=3, datos medios \pm s.e.m.). K=lignina Kraft; KF: lignina Kraft funcionalizada; AL: álcali lignina; ALF: álcali lignina funcionalizada

sin modificar (control). Inicialmente, las muestras de suelos adicionados de los hidrogeles elaborados con ambas ligninas mostraron perfiles similares y una respiración significativamente más alta que la muestra control.

La tasa de degradación de las muestras funcionalizadas aumentó claramente, mostrando una mayor producción de CO₂, y por tanto una mayor biodegradabilidad que los hidrogeles obtenidos a partir de ligninas sin funcionalizar. Así, en comparación con el suelo control, las tasas de respiración mostradas por estos hidrogeles fueron 6 veces superiores. Se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre todas las formulaciones,

en comparación con el suelo control. La biodegradabilidad mostrada por los hidrogeles obtenidos abre una vía de aplicación de los mismos como sustituyentes de materiales plásticos reconocidos en la actualidad como uno de los principales causantes de daño ambiental en los ecosistemas.

4.7. Ensayo ecotoxicológicos de los hidrogeles frente a *Lactuca sativa*

El impacto ecotoxicológicos asociado a los hidrogeles ensayados se evaluó utilizando *L. sativa* como modelo de referencia. Los ensayos de ecotoxicidad se realizaron en un suelo adicionado con los hidrogeles a tiempo 0 (t₀) y a los 40

días de adición de los hidrogeles (t40), a 28 °C.

En t0 y t40 no se observó ningún efecto significativo sobre la germinación con relación al control, y por tanto ninguna toxicidad, para las sustancias ensayadas en los tiempos analizados (Figura 4.31).

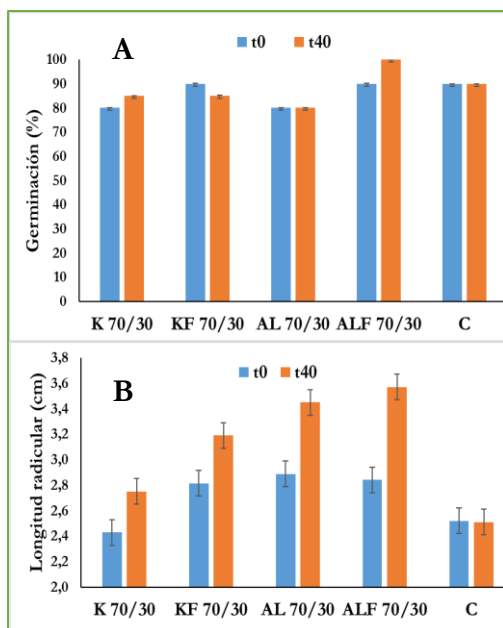


Figura 4.31. Porcentaje de germinación de semillas (A) y longitud radicular (B) de *L. sativa* en el suelo control y en las muestras de suelo con hidrogeles añadidos a t0 y t40 (n=3, datos medios \pm s.e.m.).

Sin embargo, se observó que, tras 40 días de degradación del hidrogel, los productos de biodegradación favorecen el crecimiento radicular (Figura 4.32). Estos resultados sugieren que los

hidrogeles a base de lignina y quitosano no producen efectos tóxicos en el desarrollo de la planta.



Figura 4.32. Fotografía de plántulas de *L. sativa* expuestas a suelos con hidrogeles de quitosano y ligninas residuales funcionalizadas en comparación con el suelo control

Es bien sabido que la transformación microbiana de la biomasa lignocelulósica conduce a la liberación de subproductos que a su vez podrían incorporarse a las fracciones húmicas del suelo (Tuomela *et al.*, 2000). Así, el aumento observado en la longitud de las raíces tras 40 días de exposición del suelo a los hidrogeles, podría ser una consecuencia del enriquecimiento del suelo en materia orgánica.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. Los residuos agrícolas paja de trigo y paja de cebada se transformaron con éxito por la acción enzimática de *Streptomyces* mediante un proceso de fermentación en estado sólido (SSF). Entre las enzimas detectadas destaca el papel de la xilanasa en la solubilización de la lignina de ambos sustratos.

2. La aplicación del método de análisis multivariante OPLS-DA permitió la optimización de los factores que afectan al proceso de SSF, seleccionándose para futuros ensayos a la cepa *S. MDG 301* por su mayor eficacia en la modificación del sustrato paja de trigo tras 7 días de fermentación a 45 °C.

3. Las observaciones morfológicas realizadas al microscopio electrónico de barrido y los espectros FTIR de la paja de trigo fermentada por la cepa *S. MDG 301*, pusieron de manifiesto la capacidad del microorganismo para colonizar el sustrato y alterar la estructura del mismo.

4. Los oleogeles elaborados a partir de paja de trigo fermentada y paja de trigo control presentaron características reológicas distintas, resultando sorprendentemente más resistentes en su estructura los formulados con paja de trigo sin inocular que presentaron

valores del módulo Plateau comparables a los de un lubricante comercial que contenía litio como espesante.

5. La lacasa bacteriana SilA demostró su eficacia para la polimerización de ligninas residuales, siendo más efectiva la polimerización sobre la álcali lignina. La aplicación de la metodología MSR permitió establecer la significación estadística de los factores que afectan al grado de polimerización de dichas ligninas.

6. Las ligninas residuales funcionalizadas con SilA demostraron su eficacia como espesantes en la mejora de la resistencia de los oleogeles obtenidos, que se manifiesta en los valores de sus funciones viscoelásticas lineales y flujo viscoso. El efecto positivo observado en estos oleogeles, les otorga características competitivas con los lubricantes comerciales, constituyendo una alternativa ventajosa a tener en cuenta para su aplicación industrial.

7. La combinación en distintas proporciones de quitosano con las ligninas residuales funcionalizadas, dio lugar a hidrogeles que permitieron la obtención de películas uniformes con una gran versatilidad de aplicación, en función de su solubilidad y capacidad de absorción de agua.

8. Los hidrogeles obtenidos con una proporción 70/30 de quitosano y ligninas funcionalizadas, presentaron una resistencia estructural y unas propiedades mecánicas que avalan su utilidad como material bio-absorbente.

9. Los hidrogeles elaborados con una proporción 70/30 de quitosano y ligninas residuales mostraron una gran capacidad de adsorción de microorganismos y de colorantes textiles, lo que ofrece una alternativa prometedora como nuevo material bio-adsorbente para eliminar contaminantes de medios acuosos.

10. La alta tasa de biodegradabilidad y la ausencia de ecotoxicidad mostradas por los oleogeles e hidrogeles formulados en este trabajo, ponen de manifiesto su utilidad para el desarrollo de nuevos productos de interés industrial y avalan su consideración como productos seguros en términos ecológicos.

Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelaziz, O., Hulteberg, C.** 2017. Physicochemical characterisation of technical lignins for their potential valorisation, *Waste and Biomass Valorization*. 8, 859-869.
- Abdolali, A., Guo, W., Ngo, H.H., Chen, S.S., Nguyen, N.C., Tung, K.L.** 2014. Typical lignocellulosic wastes and by-products for biosorption process in water and wastewater treatment: a critical review. *Bioresour. Technol.* 160, 57–66.
- Abdullah, Z., Dong, Y.** 2019. Biodegradable and water-resistant poly (vinyl) alcohol (PVA)/starch (ST)/glycerol (GL)/halloysite nanotube (HNT) nanocomposite films for sustainable food packaging. *Front. Mater. Sci.* 6, 58.
- Adhvaryu, A., Liu, Z., Erhan, S.** 2005. Synthesis of novel alkoxyated triacylglycerols and their lubricant base oil properties. *Ind. Crop. prod.* 21, 113-119.
- Akinyemi, B., Dai, C.** 2020. Development of banana fibers and wood bottom ash modified cement mortars. *Constr. build. mater.* 241, 118041.
- Alzagameem, A., Klein, S., Bergs, M., Do, X.T., Korte, I., Dohlen, S., Hüwe, C., Kreyenschmidt, J., Kamm, B., Larkins, M.** 2019. Antimicrobial activity of lignin and lignin-derived cellulose and chitosan composites against selected pathogenic and spoilage microorganisms. *Polym. J.* 11 (4): 670.
- Antonopoulos, V., Hernández, M., Arias, M., Mavrakos, E., Ball, A.** 2001. The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus Kraft pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 92-97.
- Aradmehr, A., Javanbakht, V.** 2020. A novel biofilm based on lignocellulosic compounds and chitosan modified with silver nanoparticles with multifunctional properties: Synthesis and characterization. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects.* 600, 124952.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, Á.** 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr. Chem. Biol.* 3, 203-230.
- Argüelles-Monal, W., Lizardi-Mendoza, J., Fernández-Quiroz, D., Recillas-Mota, M.T., Montiel-Herrera, M.** 2018. Chitosan derivatives: Introducing new functionalities with a

controlled molecular architecture for innovative materials. *Polym. J.* 10, 342.

Arias, M.E., Arenas, M., Rodríguez, J., Soliveri, J., Ball, A.S., Hernández, M. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1953-1958.

Arias, M.E., Blánquez, A., Hernández, M., Rodríguez, J., Ball, A.S., Jiménez-Morillo, N.T., González-Vila, F.J., González-Pérez, J.A. 2016. Role of a thermostable laccase produced by *Streptomyces ipomoeae* in the degradation of wheat straw lignin in solid state fermentation. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 122, 202-208.

ASTM. 2015. F2661-07. Standard Test Method for Determining the Tribological Behavior and the Relative Lifetime of a Fluid Lubricant using the Spiral Orbit Tribometer, ASTM International, West Conshohocken, PA.

Bajpai, P. 2014. Xylan: occurrence and structure. In: Bajpai, P. (eds.). Xylanolytic enzymes. Elsevier Inc. Oxford. UK, pp: 9-14.

Bakshi, P., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., Kumar, N. 2020. Chitosan as an environment friendly

biomaterial—a review on recent modifications and applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 150, 1072-1083.

Balanta, D., Grande, C., Zuluaga, F. 2010. Extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelio de *Aspergillus niger* y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas. *Rev. Iberoam. Polim.* 11, 297-316.

Baumgaertel, M., Winter, H. 1992. Interrelation between continuous and discrete relaxation time spectra. *J. Non Newtonian Fluid Mech.* 44, 15-36.

Becerra-Jiménez, J., Valdivia-Urdiales, B., Aguilar, C., Martínez-Hernández, J., Contreras-Esquivel, J., Lozano, C. 2011. Quitosán fúngico: fuentes y propiedades. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila.* 3,5.

Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 326-338.

Behera, B., Sethi, B., Mishra, R., Dutta, S., Thatoi, H. 2017. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 15, 197–210.

- Berghel, J., Frodeson, S., Granström, K., Renström, R., Ståhl, M., Nordgren, D., Tomani, P.** 2013. The effects of Kraft lignin additives on wood fuel pellet quality, energy use and shelf life. *Fuel Process. Technol.* 112, 64-69.
- Berrocal, M., Ball, A., Huerta, S., Barrasa, J., Hernández, M., Pérez-Leblic, M.I., Arias, M.E.** 2000. Biological upgrading of wheat straw through solid-state fermentation with *Streptomyces cyaneus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 764-771.
- Bhargav, S., Panda, B., Ali, M., Javed, S.** 2008. Solid-state fermentation: an overview. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 22, 49-70.
- Blánquez, A., Ball, A. S., González-Pérez, J. A., Jiménez-Morillo, N. T., González-Vila, F., Arias, M. E., Hernández, M.** 2017. Laccase SilA from *Streptomyces ipomoeae* CECT 3341, a key enzyme for the degradation of lignin from agricultural residues?. *PLoS One.* 12:11, e0187649.
- Blánquez, A.** 2015. Caracterización y función biológica de la lacasa producida por "*Streptomyces ipomea*" CECT 3341: aprovechamiento de su potencial oxidativo para la degradación de contaminantes ambientales. (Tesis doctoral, Universidad de Alcalá, Madrid, España).
- Blánquez, A., Guillén, F., Rodríguez, J., Arias, M. E., Hernández, M.** 2016. The degradation of two fluoroquinolone based antimicrobials by SilA, an alkaline laccase from *Streptomyces ipomoeae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32(3), 52.
- Blanquicet, R., De Hoyos, C., Montes, Y., Fuentes, E., Ruiz, J.** 2015. Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero. *Polímeros.* 25(1), 58-69.
- Boccard, J., Rutledge, D.** 2013. A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion. *Anal. Chim. Acta.* 769, 30-39.
- Borrero-López, A. M., Valencia, C., Blánquez, A., Hernández, M., Eugenio, M. E., Franco, J. M.** 2020. Cellulose Pulp-and Castor Oil-Based Polyurethanes for Lubricating Applications: Influence of *Streptomyces* Action on Barley and Wheat Straws. *Polymers.* 12(12), 2822.
- Borrero-López, A.M., Blánquez, A., Valencia, C., Hernández, M., Arias, M.E., Eugenio, M.E., Fillat, U., Franco, J.M.** 2018a. Valorization of soda lignin from wheat straw solid-state

- fermentation: Production of oleogels. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6, 5198-5205.
- Borrero-López, A.M., Santiago-Medina, F.J., Valencia, C., Eugenio, M.E., Martin-Sampedro, R., Franco, J.M.** 2018b. Valorization of Kraft lignin as thickener in castor oil for lubricant applications. *J. Renew. Mater.* 6, 347-361.
- Borrero-López, A.M., Valencia, C., Franco, J.M.** 2017. Rheology of lignin-based chemical oleogels prepared using diisocyanate crosslinkers: Effect of the diisocyanate and curing kinetics. *Eur. Polym. J.* 89, 311-323.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G.** 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267, 99-102.
- Bourgine, J., Teigiserova, D., Thomsen, M.** 2021. Production of enzymes via solid state fermentation from cereals. Mendeley Data, V2. DOI:10.17632/k2xv3yss8m.2.
- Bousios, S., Worrell, E.** 2017. Towards a Multiple Input-Multiple Output paper mill: Opportunities for alternative raw materials and sidestream valorisation in the paper and board industry. *Resour. Conserv. Recycling.* 125, 218-232.
- Bulgariu, L., Escudero, L.B., Bello, O.S., Iqbal, M., Nisar, J., Adegoke, K.A., Alakhras, F., Kornaros, M., Anastopoulos, J.** 2019. The utilization of leaf-based adsorbents for dyes removal: A review. *J. Mol. Liq.* 276, 728-747.
- Buta, J.G., Zadrazil, F., Galletti, G.C.** 1989. FT-IR determination of lignin degradation in wheat straw by white rot fungus *Stropharia rugosoannulata* with different oxygen concentrations. *J. Agric. Food Chem.* 37, 1382-1384.
- Bylesjö, M., Rantalainen, M., Cloarec, O., Nicholson, J.K., Holmes, E., Trygg, J.** 2006. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J. Chemom.* 20, 341-351.
- Cannel, E., M. Moo-Young.** 1980. Solid-state Fermentation Systems. *Process Biochem.* 15(5), 2-7.
- Cecutti, C., Agius, D.** 2008. Ecotoxicity and biodegradability in soil and aqueous media of lubricants used in forestry applications. *Bioresour. Technol.* 99, 8492-8496.
- Champness, W.** 2000. Actinomycete development, antibiotic production, and phylogeny: questions and challenges, p. 11-31. In Y. V. Brun and L. J. Shimkets

- (ed.), Prokaryotic development. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Chapman, J., Ismail, A., Dinu, C.** 2018. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*. 8(6), 238.
- Chater, K.F., Biró, S., Lee, K.J., Palmer, T., Schrempf, H.** 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 171-198.
- Chávez-Sifontes, M., Domine, M.** 2013. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. 4(4), 15-46.
- Chen, L., Tang, C. Y., Ning, N. Y., Wang, C. Y., Fu, Q., & Zhang, Q.** 2009. Preparation and properties of chitosan/lignin composite films. *Chinese J. Polym. Sci.* 27(05), 739-746.
- Chen, P., Zhang, L., Peng, S., Liao, B.** 2006. Effects of nanoscale hydroxypropyl lignin on properties of soy protein plastics. *J. Appl. Polym. Sci.* 101(1), 334-341.
- Christopher, L., Yao, B., Ji, Y.** 2014. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Front. Energy*. 2, 12.
- Clarke, J., Davidson, K., Rixon, J., Halstead, J., Fransen, M., Gilbert, H., Hazlewood, G.** 2000. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and α -galactosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 661-667.
- Cortés-Triviño, E., Valencia, C., Delgado, M.A., Franco, J.M.** 2018. Modification of alkali lignin with poly (ethylene glycol) diglycidyl ether to be used as a thickener in bio-lubricant formulations. *Polym. J.* 10, 670.
- Costa, C., Pinto, P., Rodrigues, A.** 2018. Lignin fractionation from *E. Globulus* Kraft liquor by ultrafiltration in a three stage membrane sequence. *Sep. Purif. Technol.* 192, 140-151.
- Couto, S., Herrera, J.** 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol. Adv.* 24, 500-513.
- Couto, S., Sanromán, M.** 2006. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *J. Food Eng.* 76, 291-302.

- Crawford, D.** 1978. Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 1041-1045.
- Crouvisier-Urien, K., Da Silva, Farias., Fernanda, Regina., Arunatat, S., Griffin, D., Gerometta, M., Rocca-Smith, J.R., Weber, G., Sok, N., Karbowiak, T.** 2019. Functionalization of chitosan with lignin to produce active materials by waste valorization. *Green Chem.* 21, 4633-4641.
- Crouvisier-Urien, K., Lagorce-Tachon, A., Lauquin, C., Winckler, P., Tongdeesontorn, W., Domenek, S., Debeaufort, F., Karbowiak, T.** 2017. Impact of the homogenization process on the structure and antioxidant properties of chitosan-lignin composite films. *Food Chem.* 236, 120-126.
- Cuadros, S.** 2008. Residuos agrícolas, forestales y lodos. Master en Ingeniería y Gestión Medioambiental. *Madrid, España: EOI Escuela de negocios.*
- Dash, A., Sahoo, S.** 2021. Role of Enzymes in Textile Processing. In: *Bioprospecting of Enzymes in Industry, Healthcare and Sustainable Environment* (pp. 395-410). Springer, Singapore.
- Debandi, M., Bernal, C., Francois, N.** 2016. Development of biodegradable films based on chitosan/glycerol blends suitable for biomedical applications. *J. Tissue Sci. Eng.* 3, 2157-7552.1000187.
- Deobald, L., Crawford, D.** 1987. Activities of cellulase and other extracellular enzymes during lignin solubilization by *Streptomyces viridosporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, 158-163.
- Dessbesell, L., Paleologou, M., Leitch, M., Pulkki, R., Xu, C.** 2020. Global lignin supply overview and Kraft lignin potential as an alternative for petroleum-based polymers, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 123, 109768.
- Dhawan, S., Kaur, J.** 2007. Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27, 197-216.
- Diossa, G., Velásquez, J.A., Quintana, G.C., Gómez, V.** 2017. Efecto de la presión de prensado y la adición de lignina Kraft en la producción de tableros aglomerados autoenlazados a partir de *Gynerium sagittatum* pretratada con vapor. *Maderas Ciencia y Tecnología.* 19, 525-538.
- Dongre, P., Bujanovic, B.** 2021. Lignin-based thermoset resins, Chapter

6. In: M. Gonzalez Alriols *et al.*, ed., "What to know about lignin". 249-301.
- Dornez, E., Gebruers, K., Delcour, J., Courtin, C.** 2009. Grain-associated xylanases: occurrence, variability, and implications for cereal processing. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 495-510.
- Dos Santos, A., Cervantes, F. J., Van Lier, J.** 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresour. Technol.* 98(12), 2369-2385.
- El Mansouri, N., Yuan, Q., Huang, F.** 2011. Characterization of alkaline lignins for use in phenol-formaldehyde and epoxy resins. *BioResources.* 6, 2647-2662.
- El-Hefian, E., Nasef, M., Yahaya, A.** 2014. Chitosan-Based Polymer Blends: Current Status and Applications. *J. Chem. Soc. Pak.* 36,1.
- Eriksson, K., Blanchette, R., Ander, P.** 1990. Biodegradation of cellulose, Anonymous Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. *Springer Science & Business Media.* pp. 89-180.
- Estrategia Española de Bioeconomía: Horizonte 2030.** 2015. Secretaria de Estado de Investigación Desarrollo e Innovación. Ministerio de Economía Y Competitividad. Gobierno de España. España. Documento reunión de 9 de julio de 2015.
- Eugenio M.E., Hernández, M. Moya, R., Martín-Sampedro, R., Villar, J.C., M.E, Arias.** 2011. Evaluation of a new laccase produced by *Streptomyces ipomoea* on biobleaching and ageing of Kraft pulps. *Bioresources.* 6(3), 3231-3241.
- Faix, O., Böttcher, J.** 1992. The influence of particle size and concentration in transmission and diffuse reflectance spectroscopy of wood. *Holz als Roh- und Werkstoff.* 50, 221-226.
- Farahnaky, A., Saberi, B., Majzoobi, M.** 2013. Effect of glycerol on physical and mechanical properties of wheat starch edible films. *J. Texture Stud.* 44, 176-186.
- Farhoudian, S., Yadollahi, M., Namazi, H.** 2016. Facile synthesis of antibacterial chitosan/CuO bio-nanocomposite hydrogel beads. *Int. J. Biol. Macromol.* 82, 837-843.
- Fearon, O., Kuitunen, S., Ruuttunen, K., Alopaeus, V., Vuorinen, T.** 2020. Detailed Modeling of Kraft Pulping

- Chemistry. Delignification. *Ind. Eng. Chem. Res.* 59, 12977-12985.
- Ferreira, S.** 2014. Laccase Enzymatic Polymerization. Novel Adhesion System for Wood Panel Manufacture (*Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis, University of Vigo, Vigo*).
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R., Henrissat, B., Martinez, A., Otilar, R.** 2012. The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science.* 336, 1715-1719.
- Fodil, M., Trache, D., Brosse, N., Benaliouche, F., Ahmed Fouzi Tarchoun, A.** 2020. Comparison of the physicochemical properties and thermal stability of organosolv and Kraft lignins from hardwood and softwood biomass for their potential valorization. *Waste Biomass Valor.* 11, 6541–6553.
- Franco, J., Delgado, M., Valencia, C., Sánchez, M., Gallegos, C.** 2005. Mixing rheometry for studying the manufacture of lubricating greases. *Chem. Eng. J.* 60, 2409-2418.
- Furukawa, T., Sawaguchi, C., Watanabe, A., Takahashi, M., Nigorikawa, M., Furukawa, K., Sonoki, T.** 2013. Application of fungal laccase fused with cellulose-binding domain to develop low-lignin rice plants. *J. Biosci. Bioeng.* 116(5), 616-619.
- Gallego, R., Piras, C., Rutgeerts, L., Fernandez-Prieto, S., De Borggraeve, W., Franco, J., Smets, J.** 2020. Green approach for the activation and functionalization of jute fibers through ball milling. *Cellulose.* 27, 643-656.
- Gellerstedt, G.** 2009. Chemistry of chemical pulping. *J. Wood Chem.* 2, 91-120.
- Gnanasambadam, R., Hettiarachchy, N., Coleman, M.** 1997. Mechanical and barrier properties of rice bran films. *J. Food Sci.* 62 (2), 395-398.
- Goodfellow, M., Cross, T.** 1984. Classification. In *The Biology of Actinomycetes*, pp. 7-164. Edited by M. Goodfellow, M. Mordarski & S. T. Williams. London: Academic Press.
- Gosselink, R.** 2011. Lignin as a renewable aromatic resource for the chemical industry. *FBR BP Biorefinery & Natural Fibre Technology.* ISBN 9789461731005 – 191.
- Gupta, S., Bhushan, B., Hoondal, G. S.** 2000. Isolation, purification and characterization of xylanase from

- Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of Kraft pulp. *J. Appl. Microbiol.* 88(2), 325-334.
- Hernández-Cocoletzi, H., Águila Almanza, E., Flores Agustin, O., Viveros Nava, E.L., Ramos Cassellis, E.** 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío.* 22, 57-60.
- Hernández, M., Hernández-Coronado, M., Montiel, M. D., Rodríguez, J., Pérez, M. I., Bocchini, P., Arias, M. E.** 2001. Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry as a useful technique to evaluate the ligninolytic action of *streptomyces* on wheat straw. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 58, 539-551.
- Hernández, M., Hernández-Coronado, M.J., Pérez, M.I., Revilla, E., Villar J.C., Ball, A.S., Viikari, L., Arias, M.E.** 2005. Biomechanical pulping of spruce wood chips with *Streptomyces cyanus* CECT 3335 and handsheets characterization. *Holzforschung*, 59: 173-177.
- Hernández, T., García, C.** 2003. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos. Ed. Mundi-Prensa Madrid.
- Hernández-Coronado, M.J., Hernández, M., Centenera, F., Pérez-Leblic, M.I., Ball, A.S., Arias, M.E.** 1997. Chemical characterization and spectroscopic analysis of the solubilization products from wheat straw produced by *Streptomyces* strains grown in solid-state fermentation. *Microbiology*. 143, 1359-1367.
- Hesseltine, C.** 1972. Biotechnology report: solid state fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 14, 517-532.
- Hinze, W., Uemasu, I., Dai, F., Braun, J.** 1996. Analytical and related applications of organogels. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1, 502-513.
- Hoffman, A.** 2012. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 18-23.
- Holm, A.** 2018. The effect on wood components during soda pulping., Pretreatment and pulping of forest residues in a biorefinery concept. (Master's thesis. Department of Chemistry and Chemical Engineering. Chalmers University of Technology, Gothenburg, Sweden).
- Hopwood, D.** 2007. *Streptomyces* in nature and medicine: the antibiotic makers. Oxford University Press.

- Hu, T.** 2002. Chemical modification, properties, and usage of lignin. Springer. ISBN: 978-1-4615-0643-0.
- Huber, D., Ortner, A., Daxbacher, A., Nyanhongo, G., Bauer, W., Guebitz, G.** 2016. Influence of oxygen and mediators on laccase-catalyzed polymerization of lignosulfonate. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4, 5303-5310.
- Ibrahim, V., Mamo, G., Gustafsson, P., Hatti-Kaul, R.** 2013. Production and properties of adhesives formulated from laccase modified Kraft lignin. *Ind Crops Prod.* 45, 343-348.
- Ioannidou, O., Zabaniotou, A.** 2017. Agricultural residues as precursors for activated carbon production—a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 11, 1966-2005.
- Isikgor, F., Becer, C.** 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.* 6, 4497-4559.
- Jain, S., Reddy, C., Swami, R., Kushwah, V.** 2018. Amphotericin B loaded chitosan nanoparticles: implication of bile salt stabilization on gastrointestinal stability, permeability and oral bioavailability. *AAPS PharmSciTech.* 19, 3152-3164.
- Ji, X., Guo, M.** 2018. Preparation and properties of a chitosan-lignin wood adhesive. *Int. J. Adhes.* 82, 8-13.
- Jiménez-López, L., Eugenio, M.E., Ibarra, D., Darder, M., Martín, J.A., Martín-Sampedro, R.** 2020. Cellulose Nanofibers from a Dutch Elm Disease-Resistant *Ulmus minor* Clone. *Polym. J.* 12, 2450.
- Johar, N., Ahmad, I., Dufresne, A.** 2012. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Ind. Crops. Prod.* 37, 93-99.
- Jones, S., Elliot, M.** 2018. Exploring the regulation of *Streptomyces* growth and development. *Curr. Opin. Microbiol.* 42, 25-30.
- Juturu, V., Wu, J.** 2012. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnol. Adv.* 30, 1219-1227.
- Kamali, E., Sahari, M., Barzegar, M., Ahmadi Gavlighi, H.** 2019. Novel oleogel formulation based on amaranth oil: Physicochemical characterization. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 7, 1986-1996.
- Katheresan, V., Kansedo, J., Lau, S.Y.** 2018. Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: A

- review. *J. Environ. Chem. Eng.* 6, 4676-4697.
- Kansoh, A., Nagieb, Z.** 2004. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood Kraft pulp. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 85, 103-114.
- Kawase, T., Yokokawa, S., Saito, A., Fujii, T., Nikaidou, N., Miyashita, K., Watanabe, T.** 2006. Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 988-998.
- Kerch, G.** 2015. Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 46, 159-166.
- Khalaf, S.** 2004. Production and characterization of fungal chitosan under solid-state fermentation conditions. *Int. J. Agric. Biol.* 6(6), 1033-1036.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.** 2000. Practical *Streptomyces* genetics norwich, UK: John Innes Foundation. 161-210.
- Kim, S., Fernandes, M., Matamá, T., Loureiro, A., Gomes, A., Cavaco-Paulo, A.** 2013. Chitosan–lignosulfonates sono-chemically prepared nanoparticles: characterisation and potential applications. *Colloids Surf. B.* 103, 1-8.
- Klapiszewski, Ł, Rzemieniecki, T., Krawczyk, M., Malina, D., Norman, M., Zdarta, J., Majchrzak, I., Dobrowolska, A., Czaczyk, K., Jesionowski, T.** 2015. Kraft lignin/silica–AgNPs as a functional material with antibacterial activity. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 134, 220-228.
- Kouisni, L., Fang, Y., Paleologou, M., Ahvazi, B., Hawari, J., Zhang, Y., Wang, X.** 2011. Kraft lignin recovery and its use in the preparation of lignin-based phenol formaldehyde resins for plywood. *Cell. Chem. Technol.* 45, 515.
- Kramer, K.J., Masanet, E., Xu, T., Worrell, E.** 2009. Energy efficiency improvement and cost saving opportunities for the pulp and paper industry, Berkeley, CA: Lawrence Berkeley National Laboratory.
- Krull, S., Brock, S., Prüße, U., Kuenz, A.** 2020. Hydrolyzed agricultural residues—low-cost nutrient sources for l-lactic acid production. *Fermentation.* 6, 97.
- Kumar, A., Purohit, P., Rana, S., Kandpal, T.** 2002. An approach to the

- estimation of the value of agricultural residues used as biofuels. *Biomass and Bioenerg.* 22(3), 195-203.
- Kumar, G., Kesavan, V.** 2020. Study of structural properties evaluation on coconut fiber ash mixed concrete. *Mater. Today.* 22, 811-816.
- Kumar, P., Dwivedi, P.** 2020. Lignin estimation in sorghum leaves grown under hazardous waste site. *Plant Arch.* 20, 2558-2561.
- Kumar, P., Kapoor, S.** 2017. Production, properties and applications of endo- β -mannanases. *Biotechnol. Adv.* 35, 1-19.
- Kumar, P., Teng, T., Chand, S., Wasewar, K.** 2011. Treatment of paper and pulp mill effluent by coagulation, World Academy of Science. *Engineering and Technology International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering.* 5 (8).
- Lárez C., Sánchez, J., Millán, E.** 2008. Viscosimetric studies of chitosan nitrate and chitosan chlorhydrate in acid free NaCl aqueous solution. *J. Polym.* 14-18.
- Lawton, T., Sayavedra-Soto, L., Arp, D., Rosenzweig, A.** 2009. Crystal structure of a two-domain multicopper oxidase, *J. Biol. Chem.* 284, 10174-10180.
- Li, J., He, Y., Inoue, Y.** 2003. Thermal and mechanical properties of biodegradable blends of poly (L-lactic acid) and lignin. *Polym. Int.* 52(6), 949-955.
- Li, Y., Zhang, X., Chen, X., Tang, K., Meng, Q., Shen, C., Zhang, G.** 2019. Zeolite imidazolate framework membranes on polymeric substrates modified with poly (vinyl alcohol) and alginate composite hydrogels. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 11, 12605-12612.
- Liang, G., Zhu, H., Zhang, Z., Wu, Q., Du, J.** 2019. Investigation of the waterproof property of alkali-activated metakaolin geopolymer added with rice husk ash. *J. Clean. Prod.* 230, 603-612.
- Lin, S., Dence, C.** 2012. Methods in lignin chemistry. Springer Science & Business Media.
- Lindholm-Lehto, P., Knuutinen, J., Ahkola, H., Herve, S.** 2015. Refractory organic pollutants and toxicity in pulp and paper mill wastewaters. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 6473-6499.
- López, O., García, M.A., Villar, M.A., Gentili, A., Rodriguez, M.S., Albertengo, L.** 2014. Thermo-compression of biodegradable thermoplastic corn starch films

- containing chitin and chitosan. *LWT*. 57, 106-115.
- López-Fernández, C., Rodríguez, J., Ball, A., Copa-Patino, J. L., Perez-Leblic, M. I., Arias, M. E.** 1998. Application of the affinity binding of xylanases to oat-spelt xylan in the purification of endoxylanase CM-2 from *Streptomyces chattanoogensis* CECT 3336. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50(2), 284-287.
- Luhar, S., Cheng, T., Luhar, I.** 2019. Incorporation of natural waste from agricultural and aquacultural farming as supplementary materials with green concrete: A review. *Compos. B. Eng.* 175, 107076.
- Machczynski, M., Vijgenboom, E., Samyn, B., Canters, G.** 2004. Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Sci.* 13, 2388-2397.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker J.** 2004. Brock: Biología de los microorganismos. 10ª edición. Pearson Educación, S.A., Madrid. 1011 pps.
- Majumdar, S., Lukk, T., Solbiati, J., Bauer, S., Nair, S.K., Cronan, J., Gerlt, J.** 2014. Roles of small laccases from *Streptomyces* in lignin degradation. *Biochemistry.* 53, 4047-4058.
- Manan, M., Webb, C.** 2017. Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *J Appl. Biotechnol. Bioeng.* 4, 91.
- Mandeep, G., Kumar, G., Shukla, P.** 2020. Insights into the resources generation from pulp and paper industry wastes: Challenges, perspectives and innovations. *Bioresour. Technol.* 297, 122496.
- Manteca, A., Fernández, M., Sánchez, J.** 2005. Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves. *BMC microbiology.* 5(1), 1-11.
- Martín-Alfonso, J.E., Moreno, G., Valencia, C., Sánchez, M.C., Franco, J.M., Gallegos, C.** 2009a. Influence of soap/polymer concentration ratio on the rheological properties of lithium lubricating greases modified with virgin LDPE. *J Ind Eng Chem.* 15, 687-693.
- Martín-Alfonso, J.E., Valencia, C., Sánchez, M.C., Franco, J.M., Gallegos, C.,** 2009b. Rheological modification of lubricating greases with recycled polymers from different plastics waste, *Ind Eng Chem Res.* 48, 4136-4144.

- Martín-Alfonso, J., Núñez, N., Valencia, C., Franco, J., Díaz, M.** 2011. Formulation of new biodegradable lubricating greases using ethylated cellulose pulp as thickener agent. *J Ind Eng. Chem.* 17, 818-823.
- Martins, J., Cerqueira, M., Vicente, A.** 2012. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocoll.* 27, 220-227.
- Martins, L., Soares, C., M.M. Pereira, M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G., Henriques, A.** 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly subtilis endospore coat. *J. Biol. Chem.* 277, 18849-18859
- Martin-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Moreno, J.A., Revilla, E., Villar, J.C.** 2014. Integration of a Kraft pulping mill into a forest biorefinery: Pre-extraction of hemicellulose by steam explosion versus steam treatment. *Bioresour. Technol.* 153, 236-244.
- Martín-Sampedro, R., Miranda, J., García-Fuentevilla, L.L., Hernández, M., Arias, M.E., Díaz, M.J., Eugenio, M.E.** 2015. Influence of process variables on the properties of laccase biobleached pulps. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 113-123.
- McCarthy, A., Williams, S.** 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment—a review. *Gene.* 115, 189-192.
- Meng, F., Yu, J., Tahmasebi, A., Han, Y., Zhao, H., Lucas, J., Wall, T.** 2014. Characteristics of chars from low-temperature pyrolysis of lignite. *Energy Fuels.* 28, 275-284.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.** 2012. Agricultura, Alimentación y medio ambiente en España. Secretaria Nacional Técnica. ISBN: 978-84-491-1299-7. España.
- Molina Campos, D., Vergaray Campos, Y.** 2020. Revisión bibliográfica de la adsorción de cadmio y plomo en agua usando biocarbón elaborado con residuos forestales (*Tesis para obtener Ingeniería ambiental, Universidad Cesar Vallejos. Lima, Perú*).
- Molina-Guijarro, J.M., Pérez Torres, J., Muñoz-Dorado, J., Guillén Carretero, F., Moya Lobo, R., Hernández Cutuli, M., Arias Fernández, M.E.** 2009. Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. *Int. J. Microbiol.* 12,13-21.

- Montiel, M., Hernández, M., Rodríguez, J., Arias, M.** 2002. Evaluation of an endo- β -mannanase produced by *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 for the biobleaching of pine Kraft pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 67-72.
- Montiel, M., Rodríguez, J., Pérez-Leblic, M., Hernández, M., Arias, M. E., Copa-Patiño, J. L.** 1999. Screening of mannanases in actinomycetes and their potential application in the biobleaching of pine Kraft pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52(2), 240-245.
- Moreira, L., Filho, E.** 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 165-178.
- Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Torri, G., Crini, G.** 2019. Fundamentals and applications of chitosan. *J. Sustain Agr.* 35, 49-123.
- Moya, R., Hernández, M., García-Martín, A. B., Ball, A. S., Arias, M. E.** 2010. Contributions to a better comprehension of redox-mediated decolouration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Bioresour. Technol.* 101(7), 2224-2229.
- Moya, R., Saastamoinen, P., Hernández, M., Suurnäkki, A., Arias, E., Mattinen, M.** 2011. Reactivity of bacterial and fungal laccases with lignin under alkaline conditions. *Bioresour. Technol.* 102, 10006-10012.
- Nakamura, K., Go, N.** 2005. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2050-2066.
- Nasir, M., Khali, D., Jawaid, M., Tahir, P.M., Siakeng, R., Asim, M., Khan, T.** 2019. Recent development in binderless fiber-board fabrication from agricultural residues: a review. *Constr. Build. Mater.* 211, 502-516.
- National Lubricating Grease Institute (NLGI). Lubricating Grease Guide L.G.G.** 1994. Lubricating Grease Guide. National Lubricating Grease Institute, Kansas City, MO.
- National Renewable Energy Laboratory, NREL.** 2010. Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures. (Retrieved from http://www.eere.energy.gov/biomass/analytical_procedures.html).
- Neamhom, T.** 2019. Use of Agricultural Residues to Remove Iron

- from Groundwater in Modified Airlift Aerator. *Environ. Nat. Resour.* 17, 58-67.
- Negm, N., Hefni, H., Abd-Elaal, A., Badr, E., Abou Kana, M.** 2020. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 152, 681-702.
- Nigam, P., Singh, D.** 1994. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. *J. Basic Microbiol.* 34, 405-423.
- Nitz, H., Semke, H., Landers, R., Mülhaupt, R.** 2001. Reactive extrusion of polycaprolactone compounds containing wood flour and lignin. *J. Appl. Polym. Sci.* 81(8), 1972-1984.
- Nuaklong, P., Jongvivatsakul, P., Pothisiri, T., Sata, V., Chindaprasirt, P.** 2020. Influence of rice husk ash on mechanical properties and fire resistance of recycled aggregate high-calcium fly ash geopolymer concrete. *J. Clean. Prod.* 252, 119797.
- Núñez, N., Martín-Alfonso, J., Eugenio, M., Valencia, C., Díaz, M.J., Franco, J.** 2011. Preparation and characterization of gel-like dispersions based on cellulosic pulps and castor oil for lubricant applications. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50, 5618-5627.
- Núñez-Flores, R., Giménez, B., Fernández-Martín, F., López-Caballero, M.E., Montero, M., Gómez-Guillén, M.** 2013. Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. *Food Hydrocoll.* 30, 163-172.
- Nwe, N., Stevens, W.** 2002. Chitosan isolation from the chitosan-glucan complex of fungal cell wall using amylolytic enzymes. *Biotechnol. Lett.* 24, 1461-1464.
- Ojagh, S., Rezaei, M., Razavi, S.H., Hosseini, S.** 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chem.* 122, 161-166.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).** 2018. Programa informático para series cronológicas de estadísticas de pesca y acuicultura. Residuos. División de pesca. (disponible en: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstati/es>).
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).** 2014. Residuos agrícolas y residuos ganaderos. Bioenergía y Seguridad Alimentaria

evaluación rápida (BEFS RA). Módulo Recursos Naturales. (disponible en: <http://www.fao.org/publications>).

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2020. Residuos agrícolas-emisiones directas. (disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/GA>).

Ortner, A., Hofer, K., Bauer, W., Nyanhongo, G., Guebitz, G. 2018. Laccase modified lignosulfonates as novel binder in pigment-based paper coating formulations. *React. Funct. Polym.* 123, 20-25.

Panagiotou, G., Olsson, L. 2007. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 250-258.

Panchal, T., Patel, A., Chauhan, D., Thomas, M., Patel, J. 2017. A methodological review on bio-lubricants from vegetable oil-based resources. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 70, 65-70.

Pandey, A., Soccol, C., Mitchell, D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process biochem.* 35, 1153-1169.

Pandey, K., Pitman, A. 2003. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 52, 151-160.

Pardo, I., Rodríguez-Escribano, D., Aza, P., de Salas, F., Martínez, A.T., Camarero, S. 2018. A highly stable laccase obtained by swapping the second cupredoxin domain. *Scientific report.* 8:15669.

Parlamento Europeo. 2008. DIRECTIVA marco de residuos 2008/98/CE. Sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas. *Diario Oficial de la Unión Europea.*

Peng, Y., Wu, Y., Li, Y. 2013. Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials. *Int. J. Biol. Macromol.* 59, 282-289.

Pereda, M., Ponce, A.G., Marcovich, N.E., Ruseckaite, R.A., Martucci, J.F. 2011. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocoll.* 25, 1372-1381.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatment

- of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5, 53-63.
- Picazo, J.** 2000. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Recomendaciones de la Sociedad española de enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Pietrzyk, D., Frank, C.** 1979. Analytical chemistry *J. Chem. Educ.* 56, 12, A379. Publication Date.
- Plataforma Tecnológica Española de la Biomasa (BIOPLAT) y Sustainable Chemistry (SUSCHEM).** 2017. Manual sobre las Biorrefinerías en España. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. España.
- Pleissner, D., Venus, J.** 2016. Utilization of protein-rich residues in biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100(5), 2133-2140.
- Popli, S., Patel, U.** 2015. Destruction of azo dyes by anaerobic–aerobic sequential biological treatment: a review. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 12, 405–420.
- Potůček, F., Gurung, B., Hájková, K.** 2014. Soda pulping of rapeseed straw. *Cellul. Chem. Technol.* 48(7-8), 683-691.
- Pourbafrani, M., McKechnie, J., Shen, T., Saville, B.A., MacLean, H.L.** 2014. Impacts of pre-treatment technologies and co-products on greenhouse gas emissions and energy use of lignocellulosic ethanol production. *J. Clean. Prod.* 78, 104-111.
- Puls, J.** 1997. Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromol.* 120(1), 83-196.
- Puls, J., Schuseil, J.** 1993. Brock: Hemicellulose and Hemicellulases, edited by MP Coughlan & GP Hazlewood.
- Raafat, D., Von Barga, K., Haas, A., Sahl, H.** 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3764-3773.
- Ragauskas, A., Beckham, G., Bidy, M., Chandra, R., Chen, F., Davis, M., Davison, B., Dixon, R., Gilna, P., Keller, M.** 2014. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery, *Science.* 344(6185).
- Raheem, A., Ikotun, B.** 2020. Incorporation of agricultural residues as partial substitution for cement in

- concrete and mortar—A review. *J. Build. Eng.* 101428.
- Rai, S., Dutta, P.K., Mehrotra, G.** 2017. Lignin incorporated antimicrobial chitosan film for food packaging application, *Journal of Polymer Materials.* 34, 171.
- Ralph, J., Brunow, G., Boerjan, W.** 2007. Lignins. *eLS.* <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020104>.
- Ralph, J., Lapierre, C., Boerjan, W.** 2019. Lignin structure and its engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 56, 240-249.
- Ralph, J., Ralph, J., Landucci, L., Landucci, L.** 2004. NMR database of lignin and cell wall model compounds, US Forest Prod.Lab., Madison, WI (<http://ars.usda.gov/Services/docs.htm>).
- Ramos, ÓL., Silva, S.I., Soares, J.C., Fernandes, J.C., Poças, M.F., Pintado, M.E., Malcata, F.** 2012. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Res. Int.* 45, 351-361.
- Rao, M., Tanksale, A., Ghatge, M., Deshpande, V.** 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 597-635.
- Ravishankar, K., Venkatesan, M., Desingh, R.P., Mahalingam, A., Sadhasivam, B., Subramaniam, R., Dhamodharan, R.** 2019. Biocompatible hydrogels of chitosan-alkali lignin for potential wound healing applications. *Mater. Sci. Eng. C.* 102, 447-457.
- Rede, D., Santos, L.H., Ramos, S., Oliva-Teles, F., Antão, C., Sousa, S.R., Delerue-Matos, C.** 2019. Individual and mixture toxicity evaluation of three pharmaceuticals to the germination and growth of *Lactuca sativa* seeds. *Sci. Total Environ.* 673, 102-109.
- Reinhammar B., Malstrom B.** 1981. Blue copper containing oxidases. In: Spiro TG (Ed) copper proteins (Metal ions in biology 3) Wiley, New York, 109-149.
- Ren, L., Yan, X., Zhou, J., Tong, J., Su, X.** 2017. Influence of chitosan concentration on mechanical and barrier properties of corn starch/chitosan films. *Int. J. Biol. Macromol.* 105, 1636-1643.
- Rhim, J., Ng, P.** 2007. Natural biopolymer-based nanocomposite films

- for packaging applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 411-433.
- Rhim, J., Wang, L., Hong, S.** 2013. Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. *Food Hydrocoll.* 33, 327-335.
- Rinaudo, M.** 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31(7), 603-632.
- Rinaudo, M., Goycoolea, F.** 2019. Advances in chitin/chitosan characterization and applications. *MDPI-Multidisciplinary Digital Publishing Institute.*
- del Río, J., Gutiérrez, A., Rodríguez, I., Ibarra, D., Martínez, A.** 2007. Composition of non-woody plant lignins and cinnamic acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 79, 39-46.
- Rodríguez-Mirasol, J., Cordero, T., Rodríguez, J.** 1993. Activated carbons from carbon dioxide partial gasification of eucalyptus Kraft lignin. *Energy Fuels.* 7, 133-138.
- Roopesh, K., Ramachandran, S., Nampootheri, K.M., Szakacs, G., Pandey, A.** 2006. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresour. Technol.* 97, 506-511.
- Roset, J., Cabrera, M., Vera, A., Cornejo, J., Ordas, I., Tolosana, E., Ambrosio, Y., Martinez, I., Vignote, S., Hotait, N., Lafarga, A., Garraza, J.** 2011. Evaluación del potencial de energía de la biomasa. Estudio técnico PER 2011-2020. Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDEA). Madrid, España.
- Rubilar, J.F., Cruz, R.M., Silva, H.D., Vicente, A.A., Khmelinskii, I., Vieira, M.C.** 2013. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *J. Food Eng.* 115, 466-474.
- Sachindra, N., Bhaskar, N., Mahendrakar, N.** 2005. Carotenoids in crabs from marine and fresh waters of India. *LWT-food Science and Technology.* 38, 221-225.
- Sadeghifar, H., Ragauskas, A.** 2020. Perspective on Technical Lignin Fractionation. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 8, 8086-8101.
- Sahoo, S., Misra, M., Mohanty, A.K.** 2011a. Enhanced properties of lignin-based biodegradable polymer composites using injection moulding

- process, *Compos Part A-Appl S.* 42, 1710-1718.
- Sahoo, S., Seydibeyoğlu, M.Ö., Mohanty, A.K., Misra, M.** 2011b. Characterization of industrial lignins for their utilization in future value added applications. *Biomass Bioenergy.* 35, 4230-4237.
- Samanta, A., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A., Senani, S., Sridhar, M.** 2015. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: production and applications. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre.* 5(1), 62-71.
- Sánchez, R., Franco, J.M., Delgado, M.A., Valencia, C., Gallegos, C.** 2011a. Thermal and mechanical characterization of cellulosic derivatives-based oleogels potentially applicable as bio-lubricating greases: Influence of ethyl cellulose molecular weight. *Carbohydr. Polym.* 83, 151-158.
- Sánchez, R., Franco, J.M., Delgado, M.A., Valencia, C., Gallegos, C.** 2011b. Rheology of oleogels based on sorbitan and glyceryl monostearates and vegetable oils for lubricating application. *Grasas y aceites.* 62 (3), 328-336.
- Santana-Méridas, O., González-Coloma, A., Sánchez-Vioque, R.** 2012. Agricultural residues as a source of bioactive natural products. *Phytochem Rev.* 11, 447-466.
- Santos, R. B., Capanema, E. A., Balakshin, M. Y., Chang, H.-M., and Jameel, H.** 2011. Effect of hardwoods characteristics on Kraft pulping process: Emphasis on lignin structure. *BioResources.* 6(4), 3623-3637.
- Santos, R. B., Hart, P., Jameel, H., and Chang, H.** 2012. Kinetics of hardwood carbohydrate degradation during Kraft pulp cooking. *Ind. Eng. Chem. Res.* 51, 38, 12192-12198.
- Schutyser, W., Kruger, J., Robinson, A., Katahira, R., Brandner, D., Cleveland, N. S., Beckham, G.** 2018. Revisiting alkaline aerobic lignin oxidation. *Green Chem.* 20(16), 3828-3844.
- Selim, S., Zayed, M., Atta, H.** 2012. Evaluation of phytotoxicity of compost during composting process. *J. Nat. Sci.* 10, 69-77.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.** 1995. Routine operation, calibration, development and network system management manual. NIRSystems Inc., Silver Spring, MD, USA.
- Shraddha N., Joshi, K.** 2020. A comparative study of production of

- hydrophobin like proteins (HYD-LPs) in submerged liquid and solid state fermentation from white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 23, 101440.
- Shrivastava, S., Kumar, V., Baweja, M., Shukla, P.** 2016. Enhanced xylanase production from *Thermomyces lanuginosus* NCIM 1374/DSM 28966 using statistical analysis. *J. Pure. Appl. Microbio.* 10, 2225-2231.
- Singh, R., Hu, J., Regner, M.R., Round, J.W., Ralph, J., Saddler, J.N., Eltis, L.** 2017a. Enhanced delignification of steam-pretreated poplar by a bacterial laccase. *Scientific reports.* 7, 1-13.
- Singh, Y., Farooq, A., Raza, A., Mahmood, M.A., Jain, S.** 2017b. Sustainability of a non-edible vegetable oil-based bio-lubricant for automotive applications: A review. *Process Saf. Environ. Prot.* 111, 701-713.
- Sjostrom, E.** 1993. Wood chemistry: Fundamentals and Applications, Second Edition. *Gulf professional publishing.*
- Skálová, T., Dohnálek, J., Østergaard, L.H., Østergaard, P.R., Kolenko, P., Dušková, J., Štěpánková, A., Hašek, J.** 2009. The structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases. *J. Mol. Biol.* 385, 1165-1178.
- Sobrero, M., Ronco, A.** 2008. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. IDRC, IMTA, Canadá. 202 pp.
- Solle, M.A., Arroyo, J., Burgess, M.H., Warnat, S., Ryan, C.** 2019. Value-added composite bioproducts reinforced with regionally significant agricultural residues. *Compos Part A-Appl S.*124, 105441.
- Solomon, E., Augustine, A., Yoon, J.** 1996. O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases. *Dalton Transactions.* (30), 3921-3932.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160, 61-68.
- Stolte, S., Steudte, S., Areitioaurtena, O., Pagano, F., Thöming, J., Stepnowski, P., Igartua, A.** 2012. Ionic liquids as lubricants or lubrication additives: an ecotoxicity and biodegradability assessment. *Chemosphere.* 89, 1135-1141.

- Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Geng, Z.C., Fowler, P., Baird, M.** 2005. Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydr. Polym.* 60, 15-26.
- Tagami, A.** 2018. Towards molecular weight-dependent uses of Kraft lignin (Doctoral dissertation, KTH Royal Institute of Technology).
- Tagami, A., Gioia, C., Lauberts, M., Budnyak, T., Moriana, R., Lindström, M.E., Sevastyanova, O.** 2019. Solvent fractionation of softwood and hardwood Kraft lignins for more efficient uses: Compositional, structural, thermal, antioxidant and adsorption properties. *Ind. Crop. Prod.* 129, 123-134.
- Tamaru, Y., Araki, T., Amagoi, H., Mori, H., Morishita, T.** 1995. Purification and characterization of an extracellular beta-1, 4-mannanase from a marine bacterium, *Vibrio sp.* strain MA-138. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4454-4458.
- Tanjung, F., Husseinsyah, S., Hussin, K., Hassan, A.** 2015. Mechanical and thermal properties of organosolv lignin/sodium dodecyl sulphate binary agent-treated polypropylene/chitosan composites. *Polymer Bulletin.* 73(5), 1427-1445.
- Tauber, M., Guebitz, G. M., Rehorek, A.** 2005. Degradation of azo dyes by laccase and ultrasound treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(5), 2600-2607.
- Thakur, K., Kalia, S., Pathania, D., Kumar, A., Sharma, N., Schauer, C.** 2016. Surface functionalization of lignin constituent of coconut fibers via laccase-catalyzed biografting for development of antibacterial and hydrophobic properties. *J. Clean. Prod.* 113, 176-182.
- Thielemans, W., Wool, R.** 2004. Butyrate Kraft lignin as compatibilizing agent for natural fiber reinforced thermoset composites. *Compos Part A-Appl. S.* 35, 327-338.
- Thielemans, W., Wool, R.** 2005. Lignin esters for use in unsaturated thermosets: lignin modification and solubility modeling. *Biomacromolecules.* 6, 1895-1905.
- Thurston, C.** 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* 140, 19-26.
- Toriz, G., Denes, F., Young, R.** 2002. Lignin-polypropylene composites. Part 1: Composites from unmodified lignin and polypropylene. *Polym. Compos.* 23, 806-813.

- Tran, V.S., Ngo, H.H., Guo, W., Zhang, J., Liang, S., Ton-That, C., Zhang, X.** 2015. Typical low cost biosorbents for adsorptive removal of specific organic pollutants from water. *Bioresour. Technol.* 182, 353–363.
- Trygg, J., Wold, S.** 2002. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J. Chemom.* 16, 119-128.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M.** 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresour. Technol.* 72, 169-183.
- Varjani, S., Rakholiya, P., Shindhal, T., Shah, A.V., Ngo, H.H.** 2021. Trends in dye industry effluent treatment and recovery of value added products. *J. Water Process Eng.* 39, 101734.
- van de Pas, D., Hickson, A., Donaldson, L., Lloyd-Jones, G., Tamminen, T., Fernyhough, A., Mattinen, M.** 2011. Characterization of fractionated lignins polymerized by fungal laccases. *BioResources.* 6, 1105-1121.
- Vieira, R., Oliveira, M., Guibal, E., Rodríguez-Castellón, E., Beppu, M.** 2011. Copper, mercury and chromium adsorption on natural and crosslinked chitosan films: an XPS investigation of mechanism. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects.* 374, 108-114.
- Weber, T., Welzel, K., Pelzer, S., Vente, A., Wohlleben, W.** 2003. Exploiting the genetic potential of polyketide producing *Streptomyces*, *J. Biotechnol.* 106, 221-232.
- Werner, W., Rey, H., Wielinger, H.** 1970. Über die Eigenschaften eines neuen Chromogens für die Blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD-Methode. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie.* 252, 224-228.
- Widsten, P., Kandelbauer, A.** 2008. Laccase applications in the forest products industry: a review. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 293-307.
- Widsten, P., Tamminen, T., Liitiä, T.** 2020. Natural sunscreens based on nanoparticles of modified Kraft lignin (CatLignin). *ACS omega.* 5, 13438-13446.
- Wu, H., Aam, B., Wang, W., Norberg, A., Sørli, M., Eijsink, V., Du, Y.** 2012. Inhibition of angiogenesis by chitooligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization. *Carbohydr. Polym.* 89, 511-518.

- Yang, S., Fu, X., Yan, Q., Guo, Y., Liu, Z., Jiang, Z.** 2016. Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*. *Food Chem.* 192, 1041-1048.
- Yin, X., Gagnat, J., Gerbaud, C., Guérineau, M., Virolle, M.** 1997. Cloning and characterization of a new α -amylase gene from *Streptomyces lividans* TK24. *Gene.* 197, 37-45.
- Zainal, N., Zulkifli, N., Gulzar, M., Masjuki, H.** 2018. A review on the chemistry, production, and technological potential of bio-based lubricants. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 82, 80-102.
- Zeng, J., Singh, D., Laskar, D., Chen, S.** 2013. Degradation of native wheat straw lignin by *Streptomyces viridosporus* T7A. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 10, 165-174.
- Zhang, D., Zhou, W., Wei, B., Wang, X., Tang, R., Nie, J., Wang, J.** 2015. Carboxyl-modified poly (vinyl alcohol)-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. *Carbohydr. Polym.* 125, 189-199.
- Zhang, J., He, Z., Hu, K.** 2000. Purification and characterization of β -mannanase from *Bacillus licheniformis* for industrial use. *Biotechnol. Lett.* 22, 1375-1378.
- Zhang, Y., Khademhosseini, A.** 2017. Advances in engineering hydrogels. *Science.* 356(8).
- Zhong, Q., Xia, W.** 2008. Physicochemical properties of edible and preservative films from chitosan/cassava starch/gelatin blend plasticized with glycerol. *Food Technol. Biotechnol.* 46, 262-269.
- Zhou, H., Jiang, L., Cao, X., Li, J., Chen, X.** 2015. Glycerophosphate-based chitosan thermosensitive hydrogels and their biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 117, 524-536.
- Zhou, H., Xu, L., Wen, Y., Lin, K., Zeng, X.** 2017. Ring-like structured chitosan-metal hydrogel: mass production, formation mechanism and applications. *J. Colloid Interface Sci.* 490, 233-241.

Anexos

Article

Assessment of Sustainability of Bio Treated Lignocellulose-Based Oleogels

Carmen Fajardo ^{1,*}, Alba Blázquez ¹, Gabriela Domínguez ¹, Antonio M. Borrero-López ², Concepción Valencia ², Manuel Hernández ¹, María E. Arias ¹ and Juana Rodríguez ¹

¹ Departamento de Biomedicina y Biotecnología, Universidad de Alcalá, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain; alba.blanquez@edu.uah.es (A.B.); gabriela.dominguez@edu.uah.es (G.D.); manuel.hernandez@uah.es (M.H.); enriqueta.arias@uah.es (M.E.A.); juana.rodriguez@uah.es (J.R.)

² Departamento de Ingeniería Química, Campus de “El Carmen”, Universidad de Huelva, 21071 Huelva, Spain; am.borrero@diq.uhu.es (A.M.B.-L.); barragan@uhu.es (C.V.)

* Correspondence: carmen.fajardo@uah.es; Tel.: +34-91-885-46-76

Abstract: The development of biological strategies to obtain new high-added value biopolymers from lignocellulosic biomass is a current challenge for scientific community. This study evaluates the biodegradability and ecotoxicity of new formulated oleogels obtained from fermented agricultural residues with *Streptomyces*, previously reported to show improved rheological and tribological characteristics compared to commercial mineral lubricants. Both new oleogels exhibited higher biodegradation rates than the commercial grease. Classical ecotoxicological bioassays using eukaryotic organisms (*Lactuca sativa*, *Caenorhabditis elegans*) showed that the toxic impact of the produced bio-lubricants was almost negligible and comparable to the commercial grease for the target organisms. In addition, high throughput molecular techniques using emerging next-generation DNA-sequencing technologies (NGS) were applied to study the structural changes of lubricant-exposed microbial populations of a standard soil. Results obtained showed that disposal of biomass-based lubricants in the soil environment did not substantially modify the structure and phylogenetic composition of the microbiome. These findings point out the feasibility and sustainability, in terms of biodegradability and eco-safety, of the new bio-lubricants in comparison with commercial mineral greases. This technology entails a promising biological strategy to replace fossil and non-renewable raw materials as well as to obtain useful biopolymers from agricultural residues with potential for large-scale applications.

Keywords: lignocellulosic fermented residues; *Streptomyces*; bio-based oleogels; biodegradability; ecotoxicity; soil microbiome



Citation: Fajardo, C.; Blázquez, A.; Domínguez, G.; Borrero-López, A.M.; Valencia, C.; Hernández, M.; Arias, M.E.; Rodríguez, J. Assessment of Sustainability of Bio Treated Lignocellulose-Based Oleogels. *Polymers* **2021**, *13*, 267. <https://doi.org/10.3390/polym13020267>

Received: 18 December 2020

Accepted: 11 January 2021

Published: 15 January 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The depletion of petroleum resources, the increase in oil prices and the greater awareness of the current society opinion about preservation of the environment have impelled the scientific community to focus efforts on the use of natural alternative resources. The search for new biological strategies that allow not only the substitution of oil by renewable sources but also provide benefit to a variety of residues is a current challenge for biotechnologists. Thereby, researches have explored new renewable feedstock such as proteins, tree leaves, various seaweeds, vegetable oils, coffee pulp, paper mill sludge, lignocellulose and other agro-residues for the synthesis of a wide variety of products such as bio-plastic, bio-diesel, bio-lubricant, bio-adsorbent, bio-stimulants and bio-ethanol [1]. Particularly, the urgent need to diminish the climate alteration is pushing scientists to develop sustainable approaches/methodologies towards the transformation of lignocellulosic biomass into biofuels/bioenergy and range of value-added products [2–4].

Lignocellulose biomass has been used to obtain paper, biodegradable plastics, binders, feed, ceramics, pavements, chelating agents, production of boards, production of chemical

compounds (phenols, catechol, vanillin, etc.) and even for medical uses (anti-inflammatory and anti-tumor activities) [5–7]. Biorefining of lignocellulosic biomass into these products is not only primarily linked to pollution prevention, but also offers sustainable development, involving the three pillars of sustainability: people, planet and profit (i.e., social, environmental and economic elements) [4].

However, its full exploitation, although attractive, is still far from being achieved. Even worse, the disposal of residual lignin from several industries is a major problem and, even now in some cases, its discharge to continental waters producing a large environmental impact is the only way out for this waste causing high pollution degree [8].

Previous studies carried out by our work group demonstrated that residual lignin obtained from lignocellulosic residues microbiologically pre-treated was a suitable raw material for the development of new products (bio-lubricants), contributing to the sustainable management of agricultural or industrial wastes [9]. In a further approach, the straight use of fermented lignocellulosic residues by streptomycetes to obtain oleogels was screened. For this, solid-state fermentation of two agricultural residues (wheat and barley straws) with different *Streptomyces* sp. strains was performed and once functionalized, the residues were used as thickeners to elaborate lubricant greases. The rheological and tribological analyses of the new formulations showed that these oleogels exhibited better properties and structures than some of the current industrial lubricants, highlighting their potential as substitutes of the commercial greases [10].

Lignin is a natural polymer, and although recalcitrant, it presents good biocompatibility and non-toxicity [11]. Accordingly, the new formulations produced are expected to be biodegradable to some extent, although the potential environmental associated risks to the eventual release (or disposal) of the lubricants could lead to unintended consequences [12]. Thus, research on oleogels biodegradation under soil environments, combined with evaluation of the environmental consequences of their exposure towards soil organisms, become a relevant aspect.

Classical bioassays have been widely used to assess the impact of different chemicals on reference test organisms, and among them, *Caenorhabditis elegans* has been recognized as a useful bioindicator for toxicological studies in soil [13,14]. In addition, plants are also considered as key reference organisms in soil ecotoxicity assessment because they are crucial components of this ecosystem, maintaining its normal ecological function [15]. Nevertheless, for better understanding the impact of such chemicals on soil health and functionality, in addition to the classical tests, new relevant endpoints are increasingly considered. The growth and function of microorganisms, as well as the composition and diversity of the microbial community, can be severely affected by chemical substances that reaches the soil matrix [16]; thus, parameters such as the biodiversity and functionality of soil microbiota allow us to reliably monitor environmental impacts on contaminated soils.

This paper focusses on the ecotoxicity and biodegradability characteristics of two novel lignocellulose-based lubricants, compared to an industrial and commercially available grease. Classical ecotoxicological bioassays on terrestrial eukaryotic test organisms (*Lactuca sativa* and *C. elegans*) and high throughput molecular techniques using emerging next-generation DNA-sequencing technologies (NGS) were applied to study the impact of oleogels on soil biota and the structural modifications of lubricant-exposed microbial population of a standard soil.

2. Materials and Methods

2.1. Obtention and Chemical Composition of Oleogels

Bio-lubricants samples were obtained from Castor oil added of fermented straw (wheat and barley) with *Streptomyces* sp., and functionalized with 1,6-Hexamethylene diisocyanate (HMDI) (at a proportion 2:1), as previously reported. In brief, wheat straw and barely straw fermented with *Streptomyces* were directly blended with HMDI (1/2 cellulose pulp/HMDI weight ratio) and castor oil (85% or 90% *w/w*) under stirring at room

temperature (~20 °C) for 24 h using an RW20 (IKA, Staufen, Germany) equipped with an anchor impeller at 70 rpm [10,17].

The obtained lignocellulose-based lubricants were named as follows: BL, obtained from fermented barley straw; WL, obtained from fermented wheat straw. Additionally, the commercial mineral grease Castrol Optipit® (Castrol Limited, Landlord, BP, UK), containing lithium as thickener agent, was used for comparative purposes (named CL).

Elemental analyses (C, H, and N) of all lubricants were performed in triplicate using a LECO CHNS-932 analyser (LECO Instruments S.L, Tres Cantos, Spain) at the Centre of Chemical Analyses of the University of Alcalá.

2.2. Soil and Experimental Set Up

A standard and commercially available soil, Lufa 2.2 (LUFAspeyer, Speyer, Germany), was used to assess biodegradability and the lubricants-induced impact on exposed organisms (*C. elegans*, *L. sativa* and soil bacterial community). This soil is supplied as field fresh with active microbiota. According to the supplier, the physicochemical characteristics of this loamy-sand soil (USDA) were: total organic carbon, 1.77%; nitrogen, 0.17%; pH 5.5; cation exchange capacity, 10.1 meq/100 g; and water holding capacity, 41.8 g/100 g (all values refer to dry matter).

One kg per treatment of Lufa 2.2 soil (22% *w/w* humidity) was mixed with each tested sample (bio-lubricants and commercial grease) at a dose of 1% (*w/w*), while no oleogel-spiked soil was used as control (C).

2.3. Biodegradability of Lubricants: CO₂ Evolution

The evaluation tests of lubricants' biodegradability were carried out according to published protocols [18]. The test determines biodegradation over an incubation period, measuring CO₂ evolution in the soil samples containing the assessed lubricants and compared with untreated soil. In brief, the testing vessels containing 50 g of each spiked soil (CL, BL and WL) and control soil (C) were incubated for 40 days at 28 °C and weighed periodically to maintain humidity (22% *w/w*). The carbon dioxide evolved by microbial respiration was captured in 10 mL sodium hydroxide solution (0.5 N), 5 mL barium chloride (0.5 M) was added, and the residual hydroxide was titrated with HCl 0.5 N. The carbon dioxide accumulated was calculated and represented versus the incubation time. All the experiments were run in triplicate.

2.4. Ecotoxicological Assays (*C. elegans* and *L. sativa*)

The ecotoxicity tests were performed at 0 days (t0) and 40 days post-incubation (t40). All the experiments were run in triplicate.

The phytotoxicity of commercial lubricant (CL) and bio-lubricants (BL and WL) was evaluated using *L. sativa* L. cultivar Trocadero as model organism and published protocols with minimal modifications [19]. In brief, *L. sativa* seeds were sterilized with ethanol 70% (*v/v*) for 10 min and thoroughly rinsed five times with sterilized distilled water. A total of 50 g of each lubricant-spiked soil were placed in a Petri dish and 10 seeds were sown per plate. Distilled water (4 mL) was added on the plates, being periodically replaced to maintain humidity. The Petri dishes were sealed with a cap with holes to allow air exchange and to avoid humidity losses, incubated in the dark for 48 h (room temperature), and afterwards under 16 h photoperiod. After 72 h, germinated seeds were counted. In accordance to Rede et al. [20], after seven days of exposure, we measured maximum root length to analyze plants development. Tests were considered valid if the germination of control test was ≥80% and the root length was up to 2 mm.

Ecotoxicity assays in each analyzed soil were also performed using *C. elegans* as test organism and previous protocols [21,22]. In brief, the *C. elegans* wild type strain N2 was obtained from the *Caenorhabditis* Genetic Center (University of Minnesota, St. Paul, MN, USA), and maintained on nematode growth medium (NGM) plates seeded with *Escherichia coli* strain OP50 at 20 °C. To obtain nematodes at the first juvenile stage, chunks of

agar starved plates with worms from stocks of dauer larvae were transferred to fresh NGM plates seeded with OP50 strain. After 3 days, age-synchronization of worms was achieved by washing them off the plates with K-medium (32 mM KCl, 52 mM NaCl, cholesterol $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) and filtering through a $10 \mu\text{m}$ nylon net filter (Merck Millipore Ltd. Cork, IRL) which retained all but L1-L2 juvenile stage nematodes. The mean initial body length of 100 randomly selected L1 organisms was measured using a stereomicroscope ($268 \pm 2.2 \mu\text{m}$, *s.e.m.*).

The experiments were performed in 12-well microtiter plates (Nunclon Delta SI, Nunc, Roskilde, Denmark) in accordance with ISO 10872 [23]. Each well contained 0.5 mL of *E. coli* OP50 (2.5×10^{10} cells mL^{-1}), five L1 nematodes, 0.2 mL K-medium and 0.3 g of each tested soil. After incubation for 96 h at $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (in darkness), 0.5 mL of a Rose Bengal solution (0.4 g L^{-1}) was added to each test well to stain the nematode cuticle and the experiment was stopped by heating (15 min, $80 \text{ }^\circ\text{C}$). The endpoints reproduction, survival and growth were evaluated.

2.5. DNA Extraction, Metagenome Library Construction and Sequencing

Total bacterial community DNA was isolated from 0.5 g of each lubricant-spiked and control soils at 40 days post-incubation using the Power Soil DNA isolation kit (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) and the manufacturer's protocols. DNA libraries from each soil sample were prepared at the Genomics Unit of the Complutense University of Madrid (Spain) in accordance to published protocols [24]. Briefly, the V3-V4 region of the 16S rRNA gene was amplified with primers containing the 341F and 805R sequences and Illumina-specific adapters. In a second PCR amplification, two specific 8-nucleotide index and i5/i7 Illumina adapters were added to the previous amplicons. A library pool was prepared for sequencing by mixing equal amounts of the individual sample libraries and then subjected to electrophoresis. The bands containing the amplified fragments were excised, purified and sequenced (Illumina MiSeq, 2×300 reads) using the 600 cycle MiSeq Reagent Kit v.

The FASTQ files containing the sequencing reads were analyzed using the CLC Genomics Workbench version 11.0.1 (QIAGEN Aarhus A/S www.qiagenbioinformatics.com). Sequence data were trimmed (0.05 as a limit for quality scores, 2 as the maximum number of ambiguities) and further analyzed using the CLC Microbial Genomics Module version 4.0. Sequence reads were clustered and chimeric sequences detected using an identity of 97% as the Operational Taxonomic Unit (OTU) threshold. Reference OTU data used were downloaded from the Greengenes database v13_5 for 16S rRNA. The Shannon diversity index was calculated considering the assigned species. The β -diversity was determined by principal coordinate analysis (PCoA) based on weighed UniFrac distance.

2.6. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using the software package GraphPad Prism version 5.0 (Graph-Pad Software, San Diego, CA, USA). One-way analysis of variance followed by Tukey post-test were used for multiple comparisons to determine the significance of the differences between the groups.

The version available on the online WebMeV (Multiple Experiment Viewer) platform (<http://mev.tm4.org>) was used to perform hierarchical clustering. The table of OTUs generated by the CLC Microbial Genomics Module (QIAGEN) from each microbiome classified at class level was used as the input.

3. Results

3.1. Chemical Composition of Oleogels

The elemental analysis (%) of both lignocellulose-based oleogels BL and WL in comparison with that from the control lubricant (CL) was performed. The results obtained demonstrate that the carbon and hydrogen contents resulted higher in the commercial oleogel (CL) (84.46 and 12.25%, respectively) being both contents similar in oleogels BL

and WL (71.48 and 71.76% of carbon content for BL and WL, respectively; 10.98 and 10.97% of hydrogen content for BL and WL, respectively). However, the nitrogen content of biomass-oleogels BL (2.92%) and WL (2.25%) was higher than in CL (1.48%).

3.2. Biodegradability of Lubricants

The CO₂ evolution in the soil samples was followed to determine the course of biodegradation of both lignocellulose-based lubricants (BL and WL) and commercial grease (CL) in comparison with the respirometric profile of the unamended soil sample (C). The results are shown in Figure 1.

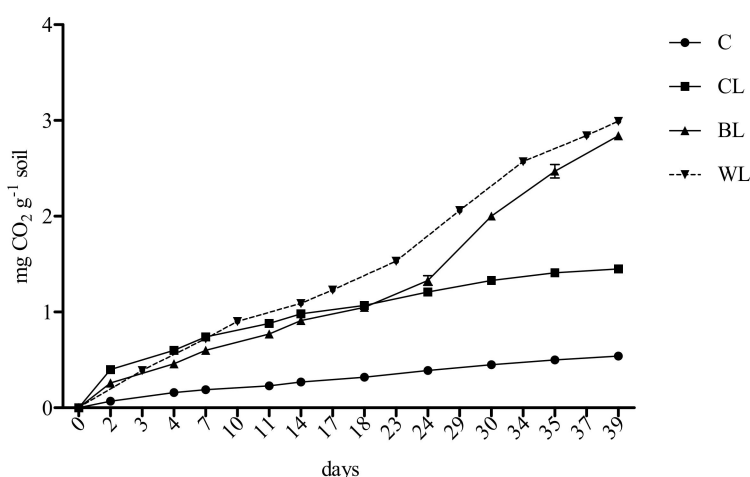


Figure 1. Accumulated CO₂ production in the grease-spiked and control soils during the incubation period (n = 3, mean data ± s.e.m.).

Initially, soils spiked with both new formulated and commercial lubricants exhibited similar profiles and higher respiration than control sample (C). After 24 days, they evolved differentially, and the degradation rate of BL and WL samples clearly increased. Thus, the BL and WL soil samples showed higher CO₂ production and, therefore, higher biodegradability than the soil amended with the commercial lubricant (CL), accounting for 2.84 and 2.91 mg CO₂ accumulated g⁻¹ soil after the incubation period, respectively. Accordingly, compared to control soil, BL and WL respiration rates were higher than 5-fold; related to the CL sample, a 2-fold increase was observed.

3.3. Toxicity of Lubricants on Selected Test Organisms

The effect of exposure to the tested lubricants in *L. sativa* seed germination and root elongation is shown in Figure 2. At t₀, no significant effect on the considered endpoints, and thus no toxicity, was observed for the tested substances ($p < 0.05$). Similarly, after the incubation period (t₄₀), the biodegradation process did not affect seed germination parameter, although an increase in root elongation was detected in BL and WL samples, compared to CL.

When *C. elegans* was exposed to the lubricant-spiked soils (CL, BL and WL) at t₀, two endpoints (survival and reproduction) did not show statistically significant differences relative to the control soil (C) (Table 1). Only growth parameter was slightly decreased in worms exposed to BL and WL samples. After 40 days we found a similar pattern, and only growth parameter decreased in CL, BL and WL spiked soil samples compared to control.

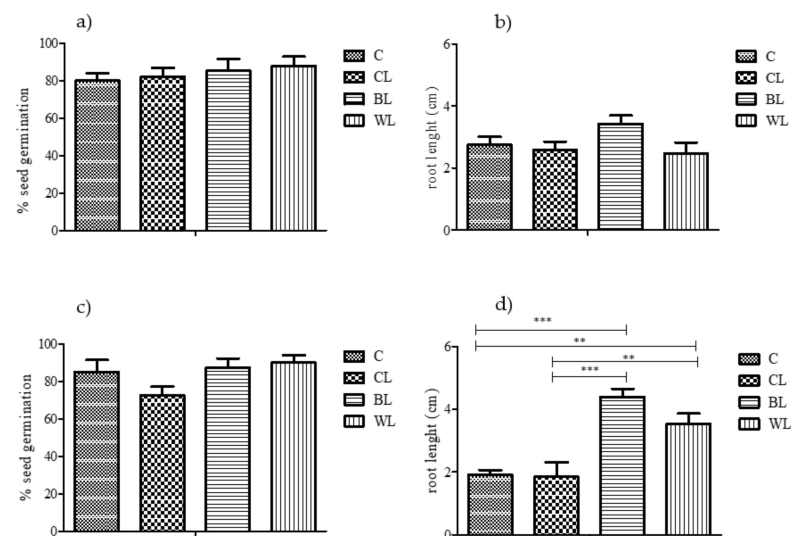


Figure 2. Seed germination percentage and root length of *L. sativa* in the control (C) and lubricant-spiked soil samples (CL, BL and WL): (a,b) data at t0; (c,d) data at t40 (n = 3, mean data \pm s.e.m.). Significant differences at $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) are shown.

Table 1. Growth, reproduction and survival ecotoxicological endpoints of *C. elegans* in the lubricant-spiked and control soils, at 0 and 40 days post-incubation. Values are given as mean \pm s.e.m. (n = 12).

SAMPLE	Growth (μ m)		Reproduction (Offsprings/Adult)		Survival (Worms)	
	t0	t40	t0	t40	t0	t40
C	1114 \pm 11	1061 \pm 11	113 \pm 11	84 \pm 3.9	8.8 \pm 0.5	9.0 \pm 0.8
CL	1121 \pm 10	1021 \pm 9.4 *	136 \pm 24	84 \pm 5.1	8.7 \pm 0.7	9.9 \pm 0.7
BL	1050 \pm 8.2 ***	881 \pm 9.6 ***	129 \pm 7.3	63 \pm 6.9	9.1 \pm 0.3	9.3 \pm 0.7
WL	1017 \pm 7.2 ***	909 \pm 10 ***	108 \pm 7.9	67 \pm 5.7	8.6 \pm 0.4	9.3 \pm 0.4

*: Significant differences ($p < 0.05$) between control and treatment. ***: Significant differences ($p < 0.001$) between control and treatment.

3.4. Soil Microbiome Analyses

High-throughput sequencing of 16S rRNA gene was performed to assess the impact of the tested lubricants, both lignocellulose-based and mineral, on the biodiversity and phylogenetic composition of soil microbiomes. The mean number and percentage of OTUs classified at the phylum, class, genus, and species levels in each analyzed microbiome are shown in Table 2.

Table 2. Data obtained after bacterial community DNA sequencing and classification of Operational Taxonomic Units (OTUs) according to the CLC Microbial Genomics Module and the Greengenes database (n = 3, mean data \pm s.e.m.).

SAMPLE	N° OTUs	%Classified to Phylum	%Classified to Class	%Classified to Genus	%Classified to Species	Shannon Index
C	5383 \pm 285	100 \pm 0.00	100 \pm 0.00	35.17 \pm 0.45	1.42 \pm 0.03	3.3424 \pm 0.034
CL	4278 \pm 337 *	100 \pm 0.00	100 \pm 0.00	29.23 \pm 1.08	2.30 \pm 0.04	2.7394 \pm 0.040
BL	3660 \pm 93 **	100 \pm 0.00	100 \pm 0.00	46.75 \pm 4.34	13.09 \pm 5.53	1.7051 \pm 0.907 *
WL	3921 \pm 70 **	100 \pm 0.00	100 \pm 0.00	39.74 \pm 0.38	2.66 \pm 0.10	3.0015 \pm 0.037

*: Significant differences ($p < 0.05$) between control and treatment. ** Significant differences ($p < 0.01$) between control and treatment.

To compare the species richness among the tested samples, the rarefaction curves were generated (97% cut-off). The samples exhibited similar trends and all curves tended to reach saturation; thus, we can assume that the sampling representativeness was high enough to detect most sequence types (Figure S1, Supplementary Information). The Shannon index suggested a similar diversity among the assessed soil samples, although alpha diversity in BL microbiome was lower than in control sample (C) (Table 2).

The total number of phyla ranged from 31 in C soil to 24 in WL sample. Only 12 phyla showed a relative abundance >0.5% in all the samples, where *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia* represented >75% of all the identified sequences (Figure 3).

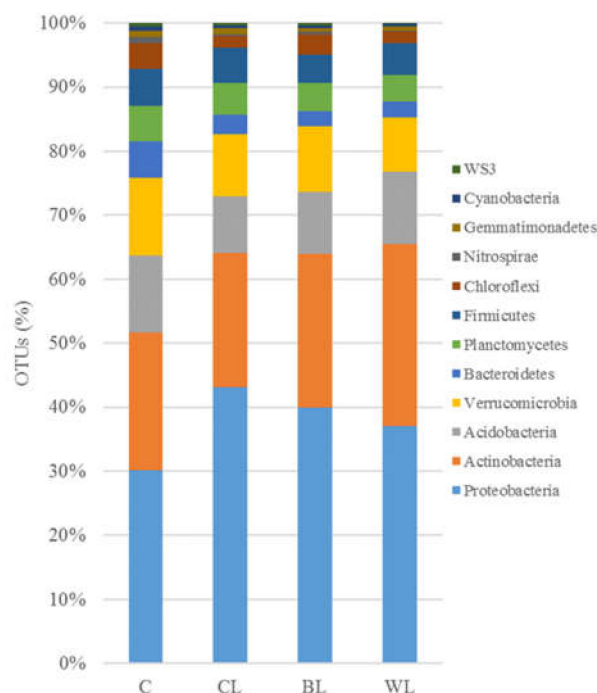


Figure 3. Relative abundances of phyla in the control and grease-spiked soil microbiomes (mean values, $n = 3$). Relative abundances are based on the proportional frequencies of OTUs that could be classified.

At the phylum level, microbiomes of all soils supplemented with lubricants (commercial and lignocellulose-based) showed scarce structural shifts compared to control soil ($p < 0.05$). The samples BL, WL and, particularly, CL were enriched in *Proteobacteria* (Figure 3). The observed higher abundance of reads belonging to this phylum was due to the increase of the class γ -*Proteobacteria*, mostly in CL, α -*Proteobacteria* in WL, or β -*Proteobacteria* in BL sample (Figure 4).

The *Actinobacteria* phylum was significantly overrepresented in the sample WL (28.3%), while it showed decreased abundance in OTUs affiliated to *Verrucomicrobia* phylum, compared to control soil (C) (Figure 3). At the class level, *Actinobacteria* taxon was increased within microbial communities of CL and WL soil samples (13.6 and 16.5%, respectively), although a decreased number in the OTUs affiliated with *Thermoleophilia* class was detected in CL (Figure 4).

When compared the microbiomes of the different lubricant-spiked soils, we found some class-specific responses ($p < 0.05$). Lignocellulose-based oleogels induced increase in the bacterial population belonging to α -*Proteobacteria* and *Thermoleophilia* classes, whereas CL sample was enriched in OTUs affiliated to γ - and δ -*Proteobacteria*. The microbiomes of BL and WL samples followed a similar pattern, and their taxonomical profiles only differed in the *Actinobacteria*, β - and γ -*Proteobacteria* population.

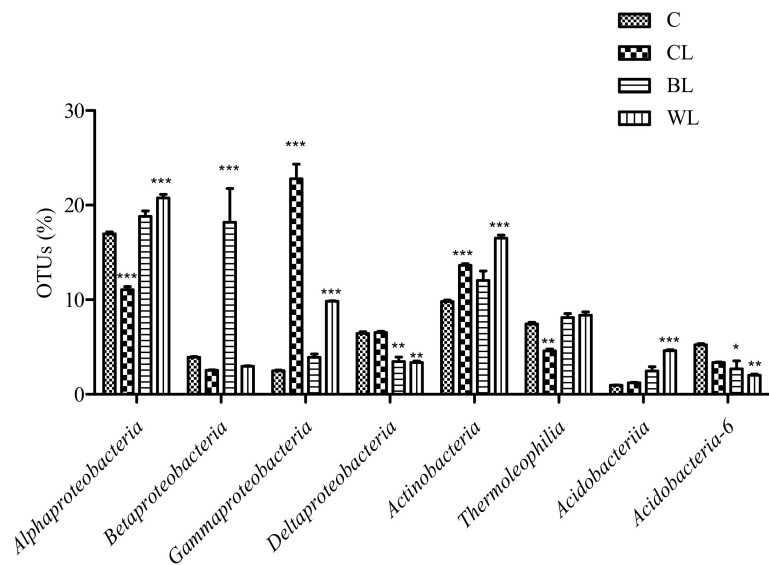


Figure 4. Most abundant identified classes in control soil and lubricant-spiked soils after 40 days of exposure (n = 3, mean values ± s.e.m.). Significant differences at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) with respect to control soil are shown.

The hierarchical clustering and PCA analyses supported the differences previously described among the assessed samples in terms of the phylogenetic structure (Figure 5). Soil microbiomes at the class level appeared grouped into three different clusters: CL sample clustered separate from control soil and samples amended with the lignocellulose-based lubricants.

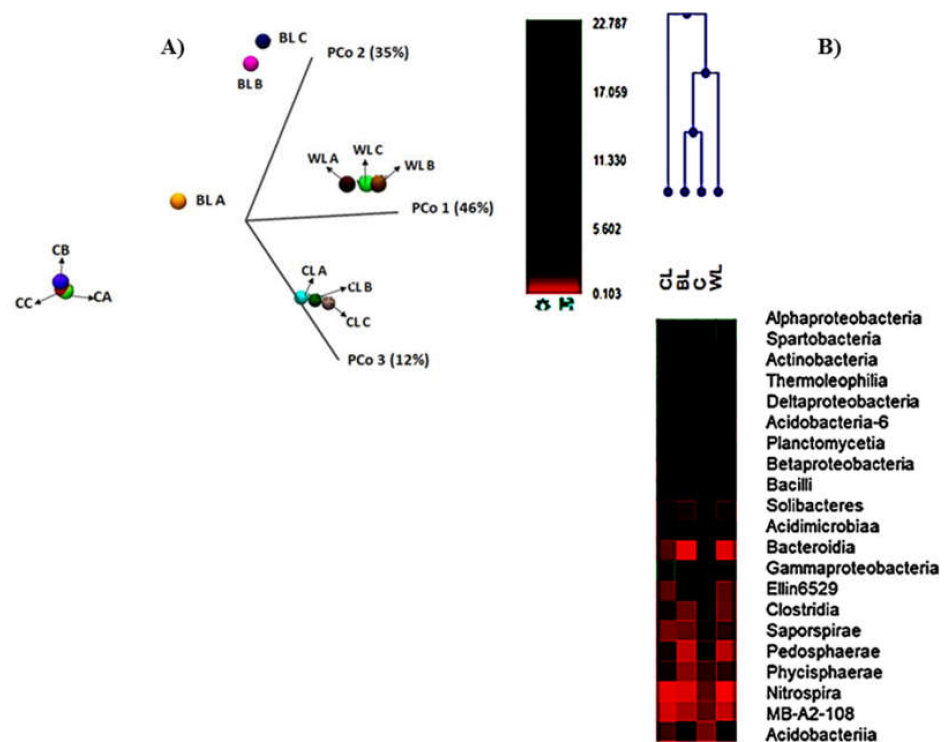


Figure 5. Principal coordinate analysis (PCoA) Euclidian beta diversity of the soil metagenomes (A), heat map and dendrogram (B) of the most abundant bacterial classes in the microbial community of soil samples.

4. Discussion

The huge amount of base stock oils and finished lubricants worldwide used makes these products likely to end up and accumulate in ecosystems, through production and distribution processes, usage or disposal after their utilization [25]. Biodegradability is a crucial parameter to determine the environmental risk associated with those chemicals when deployed in the environment. If the lubricant, due to its hydrophobic nature, remains adsorbed by the soil particles and is biodegradable, it could be transformed by the soil's microorganisms, decreasing environmental damage [26]. Therefore, high biodegradability implies a reduced tendency to bio-accumulate or to persist in the environment [27].

In this study, we have evaluated the biodegradability of two lignocellulose-based lubricants and compared the same feature of a commercial one widely employed as lubricant. Previously, we have demonstrated that the bio-based oleogels, obtained after the biological treatment, exhibited favorable viscoelastic responses and viscosity values. Furthermore, the friction coefficient and dimensions of wear scars measured in a tribological contact were comparable to, or even lower than, those found with commercial lubricating greases [10].

The main components of the lignocellulose-based oleogels are natural compounds, and thus, they were expected to be potentially biodegradable; this point was further demonstrated in this study, even when the new greases also contained HMDI. Here, higher biodegradation rates of the new formulated bio-lubricants with respect to the commercial grease were obtained within 40 days of incubation. These results are in accordance with previous studies, where bio-lubricants (vegetable-based oils) showed ultimate biodegradability higher than a fluid of mineral origin, especially in a soil environment [26]. Both tested lignocellulose-based oleogels showed very similar degradation kinetics and differed from that of the mineral lubricant. Differences in the biodegradability of the assessed products over time could be mainly ascribed to the complex chemical mixture (including lithium) contained in the commercial grease. According to their elemental composition, soil amendment with all tested greases might imply an initial increase in the organic matter content available for the aerobic heterotrophic microorganisms. Consequently, in the first weeks, a similar and enhanced respirometric profile was recorded in the spiked soil samples compared to the unamended control soil. However, the organic C consumption would lead to a release of lithium to the soil environment treated with the commercial lubricant, which could delay the biodegradation process. After this point, significant differences among bio-lubricants and commercial grease were evident. The obtained results highlighted that lignocellulose-based oleogels were biodegraded at higher rates than the industrial lubricant, providing them key valuable features to be considered as eco-safety products.

When considering complex chemical mixtures such as commercial lubricant agents, where the complete composition is often unknown, chemical analyses might provide partial information on the potential hazards for the environment related to their inadequate management. However, biological-based approaches are useful strategies to achieve this goal [28]. In this study, we conducted a set of bioassays to test the potential ecotoxicological effects of bio-lubricants, using the nematode *C. elegans* and the plant *L. sativa* as test organisms. A decrease in the growth of *C. elegans* was detected in BL and WL samples at t0, although at t40, all three spiked soils (CL, BL and WL) exhibited similar toxicity towards exposed worms. Although previous studies reported ecotoxicity of mineral and semi-synthetic commercial lubricants [29], our results from the bioassay using *L. sativa* showed no effect of tested lubricants at t0, either in the germination rates or in root length of plants; thus, lignocellulose-based oleogels did not produce toxic impact on the plant. Even more, after the biodegradation process has occurred, an increase in root length of exposed plants was found in the soils amended with the novel lubricants. It is well known that microbial transformation of lignocellulosic biomass leads to the release of sub products (i.e., aromatic acids) which could in turn be incorporated into soil humic fractions [30]. The observed increase in the root length after 40 days of soil exposure to the assessed bio-lubricants could be a consequence of the organic matter soil enrichment.

Therefore, the overall results showed that the toxic impact of the produced bio-lubricants was almost negligible for *L. sativa* in comparison with the control soil (even a positive effect on the root length once the biodegradation occurred was observed). The effect on *C. elegans* was comparable to the commercial grease for this eukaryotic target organism. Microorganisms are known to play key roles in soil and other ecosystems but several stressors, such as chemicals released to the environment, can adversely affect them. In this study, we assessed the lubricant-induced perturbation on the microbial community composition in order to know their potential impact on soil ecosystem functions [16]. The application of high-resolution molecular techniques (NGS) allowed generation of metagenomic profiles of the soil microbiomes, and identification of shifts on microbial diversity in response to chemical-induced stress.

We found that addition of lubricants at the assessed concentration did not induce remarkable impact on the soil microbiome: phylogenetic profile of control soil did not dramatically differ from treated soils after the biodegradation process has occurred. *Proteobacteria* was particularly abundant in the grease-spiked soils compared to the untreated sample, which is consistent with previous studies that have reported *Proteobacteria* as major phylum in soils added of used oil lubricants or hydrocarbon-containing soils [31]. In this context, CL soil showed an increased percentage of γ -*Proteobacteria*, which includes many hydrocarbon-degrading genera as *Pseudomonas*.

Particularly, our results showed that disposal of lignocellulose-based lubricants in the soil environment did not disturb the structure and phylogenetic composition of the microbiome. Although some phylum- and class-specific responses linked to the grease amendments were highlighted, the obtained results revealed that after the biodegradation process, the microbiome of soils with lignocellulose-based substances added exhibited higher similarity to the control soil than the sample treated with the commercial grease.

5. Conclusions

This study demonstrates that lignocellulose-based oleogels exhibited, according to most assays performed, improved or at least comparable essential features for environmental sustainability. So far, biodegradability and eco-safety of these oleogels get better when compared with a commercial grease. In addition, the biodegradation process that takes place in soil entailed no risk for the surrounding soil biota; no marked disturbance was found on bacterial phylogenetic profile or null phytotoxic impact and only slightly over *C. elegans*. Therefore, this study highlights the great potential of using lignocellulose-based oleogels to replace commercial greases providing an innovative approach to obtain biopolymers through the upgrading of agricultural residues without negative impact on the environment. Both achievements fit well the increasing social demand for environmentally friendly technologies and circular economy requirements.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2073-4360/13/2/267/s1>, Figure S1: title: Rarefaction curves (alpha-diversity) for the analyzed microbiomes at the 97% similarity level.

Author Contributions: Methodology: A.B. and G.D.; investigation: C.F., A.M.B.-L. and C.V.; conceptualization: C.F., M.H., M.E.A. and J.R.; supervision: M.H., M.E.A. and J.R.; writing—original draft preparation: C.F., M.H., M.E.A. and J.R.; funding acquisition: M.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project CTQ2014-56038-C3-2-R).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing is not applicable to this article.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the technical assistance and scientific support of Gonzalo Costa on ecotoxicological tests.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Panchal, T.M.; Patel, A.; Chauhan, D.D.; Thomas, M.; Patel, J.V. A methodological review on bio-lubricants from vegetable oil based resources. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2017**, *70*, 65–70. [[CrossRef](#)]
2. Isikgor, F.H.; Becer, C.R. Lignocellulosic biomass: A sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 4497–4559. [[CrossRef](#)]
3. Sheldon, R.A. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: State of the art. *Green Chem.* **2014**, *16*, 950–963. [[CrossRef](#)]
4. Chandel, A.K.; Garlapat, V.K.; Singh, A.K.; Fernandes, A.F.A.; Silva, S.S. The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresour. Technol.* **2018**, *264*, 370–381. [[CrossRef](#)]
5. Baurhoo, B.; Ruiz, F.C.A.; Zhao, X. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals. A review. *Anim. Feed Sci. Tech.* **2008**, *144*, 175–184. [[CrossRef](#)]
6. Sena, M.G.; Almeida, V.E.; Duarte, J.C. Eco-friendly new products from enzymatically modified industrial lignins. *Ind. Crops Prod.* **2008**, *27*, 189–195. [[CrossRef](#)]
7. Ragauskas, A.J.; Beckham, G.T.; Bidy, M.J.; Chandra, R.; Chen, F.; Davis, M.F.; Davison, B.H.; Dixon, R.A.; Gilna, P.; Keller, M.; et al. Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery. *Science* **2014**, *344*, 709–718. [[CrossRef](#)]
8. Ashrafi, O.; Yerushalm, L.; Haghghat, F. Wastewater treatment in the pulp and paper industry: A review of treatment processes and the associated greenhouse gas emission. *J. Environ. Manag.* **2015**, *158*, 146–157. [[CrossRef](#)]
9. Borrero, L.A.M.; Blázquez, A.; Valencia, C.; Hernández, M.; Arias, M.E.; Eugenio, M.E.; Fillat, U.; Franco, J.M. Valorization of soda lignin from wheat straw solid-state fermentation: Production of oleogels. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6*, 5198–5205. [[CrossRef](#)]
10. Borrero, L.A.M.; Valencia, C.; Blázquez, A.; Hernández, M.; Eugenio, M.E.; Franco, J.M. Cellulose pulp- and Castor oil-based polyurethanes for lubricating applications: Influence of *Streptomyces* action on barley and wheat straws. *Polymers* **2020**, *12*, 2822. [[CrossRef](#)]
11. Dai, L.; Liu, R.; Hu, L.Q.; Zou, Z.F.; Si, C.L. Lignin nanoparticle as a novel green carrier for the efficient delivery of Resveratrol. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, *5*, 8241–8249. [[CrossRef](#)]
12. Singh, Y.; Farooq, A.; Raza, A.; Mahmood, M.A.; Jain, S. Sustainability of a non-edible vegetable oil based bio-lubricant for automotive applications: A review. *Process. Saf. Environ. Prot.* **2017**, *111*, 701–713. [[CrossRef](#)]
13. Höss, S.; Ahlf, W.; Bergtold, M.; Bluebaum, G.E.; Brinke, M.; Donnevert, G.; Menzel, R.; Möhlenkamp, C.; Ratte, H.T.; Traunspurger, W.; et al. Interlaboratory comparison of a standardized toxicity test using the nematode *Caenorhabditis elegans* (ISO 10872). *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31*, 1525–1535. [[CrossRef](#)]
14. Saccà, M.L.; Fajardo, C.; Costa, G.; Lobo, C.; Nande, M.; Martín, M. Integrating classical and molecular approaches to evaluate the impact of nanosized zero-valent iron (nZVI) on soil organisms. *Chemosphere* **2014**, *104*, 184–189. [[CrossRef](#)]
15. Machado, S.; Stawiński, W.; Slonina, P.; Pinto, A.R.; Grosso, J.P.; Nouws, H.P.A.; Albergaria, J.T.; Delerue, M.C. Application of green zero-valent iron nanoparticles to the remediation of soils contaminated with ibuprofen. *Sci. Total Environ.* **2013**, *461*, 323–329. [[CrossRef](#)]
16. Fajardo, C.; Costa, G.; Nande, M.; Botías, P.; García, C.J.; Martín, M. Pb, Cd, and Zn soil contamination: Monitoring functional and structural impacts on the microbiome. *Appl. Soil Ecol.* **2019**, *135*, 56–64. [[CrossRef](#)]
17. Borrero, L.A.M.; Blázquez, A.; Valencia, C.; Hernández, M.; Arias, M.E.; Franco, J.M. Influence of solid-state fermentation with *Streptomyces* on the ability of wheat and barley straws to thicken castor oil for lubricating purposes. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *140*, 1–10. [[CrossRef](#)]
18. Hernández, T.; García, C. *Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos*; Ed. Mundi-Prensa Madrid: Madrid, Spain, 2003.
19. Selim, S.M.; Zayed, M.S.; Atta, H.M. Evaluation of phytotoxicity of compost during composting process. *Nat. Sci.* **2012**, *10*, 69–77.
20. Rede, D.; Santos, L.; Ramos, S.; Oliva, T.F.; Antão, C.; Sousa, S.R.; Delerue, M.C. Individual and mixture toxicity evaluation of three pharmaceuticals to the germination and growth of *Lactuca sativa* seeds. *Sci. Total Environ.* **2019**, *673*, 102–110. [[CrossRef](#)]
21. Fajardo, C.; Costa, G.; Nande, M.; Martín, C.; Martín, M.; Sánchez, F.S. Heavy metals immobilization capability of two iron-based nanoparticles (nZVI and Fe₃O₄): Soil and freshwater bioassays to assess ecotoxicological impact. *Sci. Total Environ.* **2019**, *656*, 421–432. [[CrossRef](#)]
22. Fajardo, C.; Martín, M.; Nande, M.; Botías, P.; García, C.J.; Mengs, G.; Costa, G. Ecotoxicogenomic analysis of stress induced on *Caenorhabditis elegans* in heavy metal contaminated soil after nZVI treatment. *Chemosphere* **2020**, *254*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. *Water Quality-Determination of the Toxic Effect of Sediment and Soil Samples on Growth, Fertility and Reproduction of Caenorhabditis elegans (Nematoda)*; ISO 10872; ISO (International Organization for Standardization): Geneva, Switzerland, 2010; Available online: <https://www.iso.org/standard/46253.html> (accessed on 11 January 2021).
24. Fajardo, C.; Sánchez, F.S.; Costa, G.; Nande, M.; Botías, P.; García, C.J.; Mengs, G.; Martín, M. Evaluation of nanoremediation strategy in a Pb, Zn and Cd contaminated soil. *Sci. Total Environ.* **2020**, *706*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Luna, F.M.T.; Cavalcante, J.B.; Silva, F.O.N.; Cavalcante, C.L. Studies on biodegradability of lignocellulose-based lubricants. *Tribol. Int.* **2015**, *92*, 301–306. [[CrossRef](#)]

26. Cecutti, C.; Agius, D. Ecotoxicity and biodegradability in soil and aqueous media of lubricants used in forestry application. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 8492–8496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Stolte, S.; Steudte, S.; Areitioaurtena, O.; Pagano, F.; Thöming, J.; Stepnowski, P.; Igartua, A. Ionic liquids as lubricants or lubrication additives: An ecotoxicity and biodegradability assessment. *Chemosphere* **2012**, *89*, 1135–1141. [[CrossRef](#)]
28. Grenni, P.; Barra, C.A.; Patrolecco, L.; Ademollo, N.; Rauseo, J.; Saccà, M.L.; Mingazzini, M.; Palumbo, M.T.; Galli, E.; Muzzini, V.G.; et al. A bioassay battery for the ecotoxicity assessment of soils conditioned with two different commercial foaming products. *Ecotox. Environ. Safe.* **2018**, *148*, 1067–1077. [[CrossRef](#)]
29. Lopes, R.N.; Montagnolli, R.; Domingues, R.; Bidoia, E.D. Toxicity and biodegradation in sandy soil contaminated by lubricants oils. *B. Environ. Contam. Tox.* **2010**, *8*, 454–458. [[CrossRef](#)]
30. Tuomela, M.; Vikman, M.; Hatakka, A.; Itävaara, M. Biodegradation of lignin in compost: A review. *Bioresour. Technol.* **2000**, *72*, 169–183. [[CrossRef](#)]
31. Meebon, N.; Leewis, M.; Kaewsuwan, S.; Maneerat, S.; Leigh, M. Changes in bacterial diversity associated with bioremediation of used lubricating oil in tropical soils. *Arch. Microbiol.* **2017**, *199*, 839–851. [[CrossRef](#)]

Eco-Friendly Oleogels from Functionalized Kraft Lignin with Laccase SilA from *Streptomyces ipomoeae*: An Opportunity to Replace Commercial Lubricants

Gabriela Domínguez, Alba Blánquez, Antonio M. Borrero-López, Concepción Valencia, María Eugenia Eugenio, María Enriqueta Arias, Juana Rodríguez, and Manuel Hernández*



Cite This: *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2021, 9, 4611–4616



Read Online

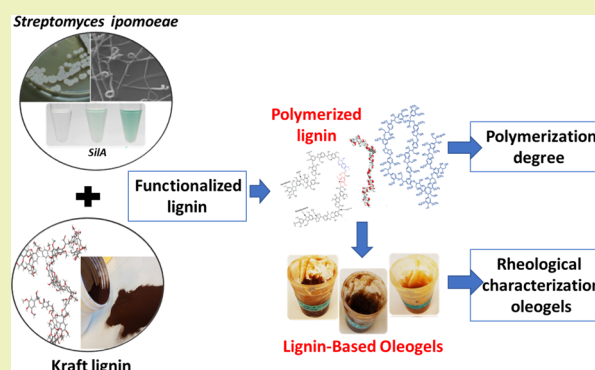
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

ABSTRACT: This work demonstrates the usefulness of SilA laccase from *Streptomyces ipomoeae* to functionalize Kraft lignin to be used as a thickener in the preparation of biodegradable oleogels for lubricating purposes. First, conditions for the enzymatic reaction were optimized by determining the polymerization degree of lignin along the incubation time. Next, using rheological characteristics as a response function, the Kraft lignin amount and incubation time were optimized to get the best characteristics of functionalized Kraft lignin to be used as a thickener in castor oil oleogels. In both cases, response surface methodology (RSM) with a factorial design 2^3 was applied. The results obtained demonstrated that Kraft lignin was oxidized by recombinant laccase from *S. ipomoeae* (SilA) increasing its reactivity and, as consequence, the molecular weight average. It was estimated that the highest polymerization occurred with a Kraft lignin concentration of 1.25 g/L and an incubation time of 24.0 min. Moreover, the maximum values of the “plateau modulus” for the oleogels within the limits of the studied region were reached with 66.6 g/L of Kraft lignin and a reaction time of 1.98 h. In conclusion, eco-friendly oleogels obtained in this work fulfil the industrial requirements concerning their rheological properties to be considered as an efficient and biodegradable alternative to traditional lubricants containing lithium as the thickener.

KEYWORDS: *Streptomyces laccase*, residual lignin valorization, response surface methodology (RSM), sustainable oleogels, rheological characterization, circular economy



1. INTRODUCTION

Polluting industries are being impelled to substitute polymeric materials derived from oil refining or petrochemical sources with natural resources that are more friendly with the environment. Among products of these industries, it should be noted lubricant greases, that are constituted not only by mineral oils but also thickeners, most of which are non-biodegradable metal soaps.¹

The thickener content in lubricant greases can range between 3 and 30% of the total weight, so there is a clear need to develop new renewable thickeners that confer adequate technical performance. Biothickeners developed from natural polymers represent an environmentally friendly alternative to synthetic polymers so that the search for new biodegradable thickeners remains as a main biotechnological target. Biopolymers, in comparison with synthetic polymers, render greater biodegradability, prominent recyclability, and reduced process energy requirements.² Among the most promising natural polymers for this purpose causes lignin,

one of the major components of lignocellulosic biomass, which is considered a good platform to produce high-value chemicals and fuels.³ Nowadays, the use of lignin as potential feedstock to produce biobased polymers is starting to attract significant attention to make better use of this important natural resource.⁴

This new technological strategy fits well with the “circular economy” concept since upgrading lignin residues into useful raw materials will allow us to re-enter them into the value chain of the production system. Recently, wheat straw-based oleogels have been obtained presenting relatively poor mechanical stability.⁵ Thus, for the industrial use of the

Received: January 6, 2021

Revised: February 24, 2021

Published: March 12, 2021



transformed residual biopolymers such as residual lignins as the raw material, it is necessary to look for appropriate sustainability strategies to increase their reactivity. Oxidative functionalization of these lignins through enzymatic catalysis^{6–8} is trying to solve the problems derived from their chemical and/or structural alteration in pulp and paper production technologies. To achieve this objective, the functionalization of residual lignins with microbial enzymes such as laccases seems to be a promising approach.

Laccases (EC 1.10.3.2) are multicopper oxidoreductases (MCOs) widely distributed in nature.^{9,10} The fact of not needing cofactors together with their oxidative capacity makes them an interesting tool for the functionalization of lignin.¹¹ Bacterial laccases, mainly from *Streptomyces*, have been recently demonstrated to be key enzymes in the lignin solubilization by these microorganisms.^{12,13} These enzymes gained attention in recent years because of their advantages to act at a wide range of pH and temperature and in the presence of high concentration of salts and inhibitors, in contrast with most of fungal laccases.^{14,15} The recombinant laccase from *Streptomyces ipomoeae* (SiLA) has shown to have a biotechnological value in the degradation of textile dyes that are harmful to the environment,¹⁶ degradation of emerging pollutants (quinolones),¹⁷ and degradation of Kraft pulp *Eucalyptus*, thus increasing the degree of whiteness in a biowhitening process.¹¹ Moreover, Moya et al.¹⁸ demonstrated that *S. ipomoeae* SiLA laccase has potential to be applied in the polymerization of industrial waste lignins under alkaline conditions, opening new possibilities to the application of SiLA for the valorization of industrial lignins.

In this work, we explore the ability of the laccase SiLA from *S. ipomoeae* CECT 3341 to generate high molecular weight lignin polymers from Kraft lignin to be used as thickeners in the formulation of biodegradable oleogels, inducing cross-linking with hexamethylene diisocyanate (HDI) in castor oil. To validate the results, response surface methodology (RSM) was applied, allowing us to establish optimal polymerization conditions to elaborate oleogels whose rheological characteristics were compared with those of commercial lubricants.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Production of SiLA Recombinant Laccase. The enzyme selected for this study was the recombinant laccase (SiLA) from *S. ipomoeae* CECT 3341.¹⁶ For the production of SiLA, the strain of *Escherichia coli* BL21 + plasmid pET28A, in which the SiLA gene was previously cloned and overexpressed, was used. Transformed *E. coli* cells were incubated at 37 °C for 24 h in a solid LB (Luria–Bertani) medium supplemented with kanamycin at a rate of 25 µg/mL. After incubation, a pre-inoculum of LB supplemented with the same antibiotic was performed, and the culture was incubated as described above until an optical density (OD, 600 nm) of 0.5–1 (exponential phase) was reached. Laccase expression was induced by adding 1 mM isopropyl β-D-L-thiogalactopyranoside (IPTG) (99% purity degree; Sigma-Aldrich). Then, the culture was incubated at 28 °C for 2 h to induce SiLA expression and the cells were recovered by centrifugation (12,439g, 20 min, 4 °C) (Beckman-Coulter, USA). The cell pellet was resuspended in phosphate buffered saline (PBS). The cell suspension was centrifuged, and the supernatant was separated from the cell debris.

2.2. Determination of Laccase Activity. Laccase activity was determined by measuring the oxidation of 5 mM 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS; 98% purity degree, Sigma-Aldrich) in 50 mM acetate buffer, pH 4.5. The increase in the absorbance at 436 nm was monitored at room temperature in a 2001 Hitachi spectrophotometer (Japan) considering a molar

extinction coefficient of 29,300 M⁻¹ cm⁻¹ for oxidized ABTS.¹⁹ International units of enzymatic activity (µmol/min) were used.

2.3. Evaluation of the Ability of the Laccase SiLA to Polymerize Kraft Lignin. **2.3.1. Preparation of the Enzyme Reaction Mixtures for Polymerization.** Before enzymatic treatment, Kraft lignin (*Eucalyptus* Kraft lignin; Sigma-Aldrich) was dissolved in a solution of NaOH (0.1 N). For the enzymatic reaction, 1 mL of the following mixtures was prepared containing phosphate buffer (50 µM), laccase SiLA (1 U/g of lignin), and lignin at different concentrations (0.25, 0.75, and 1.25 g/L). The mixtures were incubated at different times of incubation (10, 20, and 30 min) at 45 °C.^{16,19} The final pH of each sample was adjusted to pH 7–8 with 50 mM phosphate buffer.

2.3.2. Optimization of the Conditions for the Enzyme Reaction for Polymerization. The efficiency of the enzymatic treatment was assessed by determining the degree of polymerization of lignin along the incubation time. For this, the lignin polymers in control solution and treated with SiLA were separated according to their molecular mass. The molecular mass distribution of the control and treated lignin polymers was analyzed by exclusion liquid chromatography in an HPLC 1260 Infinity Binary (Agilent; USA) equipped with a 50 × 7.5 mm Polargel-M Guard pre-column (p/n PL1117-1800) and a Polargel-M 300 × 7.5 mm column (p/n PL1117-6800) in series, coupled to a diode array detector (DAD). Phosphate buffer (50 mM, pH 8) was used as the mobile phase with a flow of 1 mL/min and a column temperature of 25 °C. From each sample, 20 µL of aliquots was taken using an Agilent 1200 Infinity autoinjector. Elution chromatographic profiles were monitored at 254 nm for 20 min of run time. Moreover, to determine the optimal conditions of enzyme reaction for the polymerization of Kraft lignin with SiLA, response surface methodology (RSM) with a factorial design 2³ was applied. For the statistical optimization, the input variables used were Kraft lignin concentration (0.25, 0.75, and 1.25 g/L) and time of incubation (10, 20, and 30 min) being the output variable (response function) the degree of lignin polymerization achieved.

The obtained response values were used to estimate the model coefficients by means of the statistical package Statgraphics Centurion XV. Student's *t*-test and variance analysis (ANOVA) were also applied for the sake of reliability and accuracy of findings.

2.4. Evaluation of the Effect of Functionalized Kraft Lignin with SiLA on the Preparation of Oleogels. **2.4.1. Preliminary Assays for Oleogel Preparation.** For this purpose, enzyme reaction mixtures (100 mL) containing 100 µM phosphate buffer (pH 8), distilled water, Kraft lignin (80 g/L), and laccase (1 U/g) were incubated at 45 °C for different times (1, 2, and 3 h). The functionalized samples once acidified with HCl at pH 2 for lignin precipitation were incubated at 4 °C overnight. After 24 h, all samples were centrifuged (Beckman-Coulter, USA) at 12,439g for 20 min. The different functionalized lignins were dried at 60 °C for 48 h. Controls were prepared under the same conditions using a heat-inactivated enzyme (100 °C, 20 min).

The functionalized lignins were previously ground using a mortar to avoid large clusters obtained during processing. Then, lignin (4 g) was added to a 100 mL stainless steel reactor, together with castor oil (14 g) and 2 g of hexamethylene diisocyanate (HDI) (99% purity degree, Sigma-Aldrich). The mixture was stirred for 24 h using a RW20 IKA agitator (Germany) coupled with an anchor impeller. The vessel was maintained at 24 °C using a water bath. Once the processing was finished, the oleogels were kept at room temperature for 1 month to ensure that the free diisocyanate reacted and the sample could not undergo any internal structural change.

2.4.2. Optimization of Oleogel Preparation Conditions through RSM Application. To optimize the conditions to obtain oleogels from functionalized Kraft lignins with competitive rheological characteristics, response surface methodology (RSM) with a factorial design 2³ was used. This technique allowed us to identify the factors that influence the process and to obtain a quadratic polynomial model representing the responses obtained. A central composite design (CCD) with two independent variables, Kraft lignin concentration (50, 75, and 100 g/L) and time of incubation (1, 2, and 3 h), was

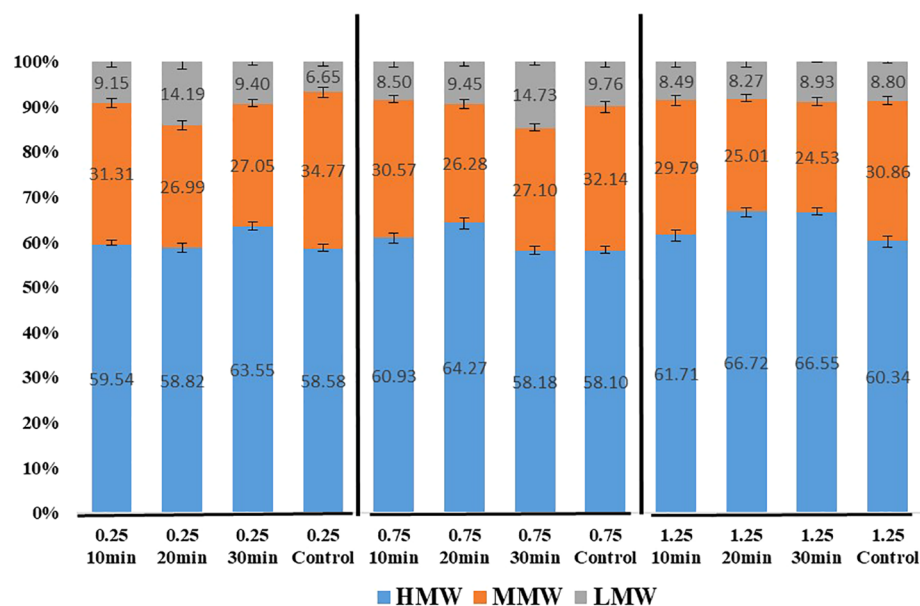


Figure 1. Percentages of high, medium, and low molecular weight (HMW, MMW, and LMW) fractions in samples containing different concentrations of Kraft lignin treated with SiA at different times of incubation, compared with controls. Range of molecular mass distribution: HMW (180–120 kDa), MMW (120–20 kDa), and LMW (20–2 kDa).

employed. The response functions measured were the rheological characteristics of oleogels. All assays were carried out at the same pH and temperature conditions as above described, and 1 U/g of laccase was used.

The regression coefficient of the response polynomials was estimated by a multiple linear regression model, Student's *t*-test, and analysis of variance. The Statgraphics Centurion XV program was used to analyze the data and obtain the response surface plots from the polynomials.

2.4.3. Rheological Characterization of the Oleogels. Linear viscoelastic behavior was analyzed by frequency sweeps in both ARES (Rheometric Scientific, UK) and Mars (Thermo Scientific, Germany). Serrated plate-plate geometries of 25 and 20 mm in diameter were used, respectively. The frequency sweeps were attained between 100 and 0.03 rad/s. The linear viscoelastic range was obtained using strain or stress sweeps.

To get only one value for comparison, the “plateau modulus” (G_n^0) was focused,²⁰ which was calculated as the value of the storage modulus (G') where the loss tangent was minimum.^{5,21}

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Statistical Optimization for Functionalization and Polymerization of Kraft Lignin by the SiA Laccase.

The elution chromatographic profiles of functionalized Kraft lignins obtained at 254 nm are shown in Figure 1. In all cases, an increase in the absorbance peaks of the samples treated with SiA both in the range of high and low molecular weight was observed (HMW and LMW, respectively). Indeed, a decrease in the absorbance peaks in the range established for the polymers of the medium molecular weight (MMW) was detected. It is important to remark that the possible contribution of the enzymatic extract to the absorbance peaks of HMW was discarded after proving by HPLC-DAD that the absorbance of an enzymatic dose of 1 U/mL was lower than that corresponding to the lignin samples treated with SiA laccase.

In SiA-treated samples containing 1.25 g/L of Kraft lignin, the highest increase of the HMW polymer fraction was observed after 20 and 30 min of incubation, representing 66.72 and 66.55% of the total area, respectively, compared with the

untreated controls (60.34%). In a similar way, these enzymatic treatments produced the greatest decrease in the MMW fraction percentages and the lowest increase of the LMW fraction percentages (Figure 1).

The results obtained demonstrated that Kraft lignin was oxidized by the bacterial SiA laccase increasing its reactivity and, as consequence, the molecular weight average. The ability of fungal laccases to oxidize lignin from lignocellulosic residues and other lignin derivatives such as liginosulfonates was previously described.^{22,23} To our knowledge, there are no references on bacterial laccases that have proven capable of polymerizing residual lignins to obtain eco-friendly value-added products with potential industrial applications. Nevertheless, previous studies carried out with laccase SiA pointed out the ability of this enzyme to polymerize SECO lignin achieving oligomers of until six units as well as several technical lignins under alkaline conditions.¹⁸

Nowadays, it is increasing interest to set up enzymatic processes as friendly tools for the development of polymers from lignocellulosic materials and/or different forms of residual lignins derived from different pulping processes. These transformed polymers offer a wide range of applications as textile fibers, composite boards, oleogels, packaging materials, etc.^{24–27}

The effectiveness of the SiA treatment on Kraft lignin polymerization was evaluated using RSM methodology. Once we obtained the data of the factorial design, the regression model, describing the correlation existing among the independent variables and the response, showed a good adjustment. The investigation results showed high accuracy of the model, signifying the model validation under the tested conditions.

The analysis of the results showed that there are no statistically significant differences ($p > 0.05$) regarding the percentage of the HMW fraction achieved in all the conditions assayed. The quadratic regression equation in terms of the coded factor for the Kraft lignin polymerization model in the HMW fraction is given as follows

lignin polymerization (HMW)

$$= 55.1582 + 0.681208 \times rt - 6.60333 \times C \\ - 0.0152667 \times rt^2 + 0.0415 \times rt \times C \\ + 6.75333 \times C^2$$

Once we obtained the adjusted polynomials for dependent variables, dimensional 3D graphs were established for the HMW fraction to investigate the optimal effect of each parameter and their interaction on Kraft lignin polymerization with SiLA laccase (Figure 2). From this response surface plot, it

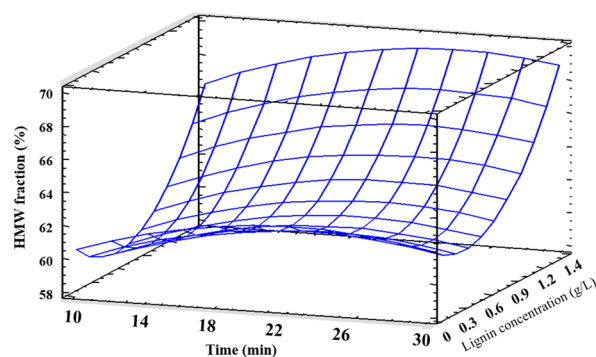


Figure 2. Response surface combined effect of Kraft lignin concentration and the reaction time of SiLA laccase on the HMW fraction obtained by lignin polymerization.

was possible to obtain a critical zone, where the combination of the optimal values of the variables studied can be located to obtain maximum polymerization. Thus, to achieve the highest polymerization, the optimal concentration of Kraft lignin was estimated at 1.25 g/L and an incubation time at 24.0 min.

Functionalization of lignin by enzymatic treatment and subsequent polymerization is a convenient way to improve its properties for biotechnological use.⁶ Then, once the lignin polymerizing capacity of laccase was demonstrated, we tried to verify that the properties of oleogels are better with laccase-polymerized lignin than with untreated lignin as the thickener. To check the oleogels' rheological properties, the required experiments were carried out using a factorial design 2³, maintaining 1 U laccase.

3.2. Optimal Conditions for Oleogel Obtention Evaluated through Their Rheological Properties. Because of the absence of data about the obtention of oleogels from functionalized lignin with laccase and to check the efficiency of the laccase in the functionalization of Kraft lignin, preliminary assays were developed to know in what extent the different variables tested could affect their quality. Kraft lignin treated with inactivated laccase was used as control.

Results obtained showed that oleogels prepared from Kraft lignin (80 g/L) functionalized with 1 U/g of SiLA laccase and 3 h of incubation presented the highest viscoelastic functions with values of 4 orders of decimal magnitude greater than the control, which implies a hardening of oleogels giving similar characteristics to the commercial greases containing lithium as the thickener.²⁷ Figure 3 shows the mechanical spectra of the oleogels as a function of the treatment of lignin with laccase.

The lineal viscoelasticity observed allows us to confirm that highly structured oleogels were obtained where the values of storage modulus G' were always considerably higher than those of loss modulus G'' over the entire frequency range

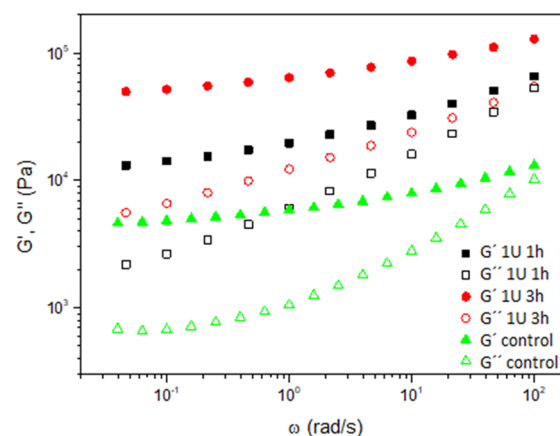


Figure 3. Evolution of the storage (G') and loss (G'') moduli with frequency for oleogels prepared from functionalized lignin with 1 U laccase at different times of incubation.

studied. However, the values of the linear viscoelastic functions clearly increase when lignin is polymerized with laccase giving higher values of G' and G'' , resulting in a qualitatively and quantitatively similar linear viscoelastic response to that found in traditional lithium soap-based lubricating greases. These commercial lubricants maintained G' standard values since 10^4 – 10^5 Pa, which are similar to those corresponding to commercial lubricants containing mineral oils and metallic soaps.^{28,29}

Oleogels obtained in this preliminary assay from functionalized residual lignin were physically stable and exhibited viscoelastic responses that are typical for thickeners usually present in traditional lubricant greases. This behavior is usually attributed, at least partially, to the cross-linking of lignin-based radicals generated as a consequence of their oxidation by SiLA.^{18,30} This phenomenon gives increase to a highly structured material that allows greater oil confinement, greater availability of the NCO-lignin complex for the subsequent reaction with castor oil, and a stronger arrangement due to the increase of hydrogen bonds joined to the covalent linkages in the structure.^{5,31,32}

To get a deeper knowledge on the influence of the lignin functionalization degree achieved with the laccase on the oleogels, the plateau modulus (G_n^0) was estimated. G_n^0 , the characteristic parameter of the plateau region, defined as the extrapolation of the contribution of the level of entanglements to G' at high frequencies, may be considered as a measure of the aggregation number among the dispersed structural units or the density of physical entanglements and, consequently, is related to the strength of the microstructural network.³³

The G_n^0 values obtained for oleogels containing 50, 75, and 100 g/L of lignin after 1, 2, and 3 h of reaction time resulted quite different and non-linear probably due to the different enzymatic reaction progress and of the generation of active groups. The maximum value of G_n^0 (35,515 Pa) corresponds to the oleogels obtained with 75 g/L of lignin functionalized with SiLA after 1 h of enzymatic reaction.

Based on the success of these results, a model was designed by the RMS technique to optimize the conditions for obtaining competitive oleogels based on the viscoelastic parameters to be used as thickeners in the industry. Once we performed the statistical analysis, the results obtained did not show significant differences ($p > 0.05$) between the rheological characteristics of oleogels (viscoelasticity) under the different conditions

assayed. The adjusted polynomial of the data allowed us to obtain the response surface that shows the behavior of the viscoelasticity of oleogels as a function of the variables studied (Figure 4).

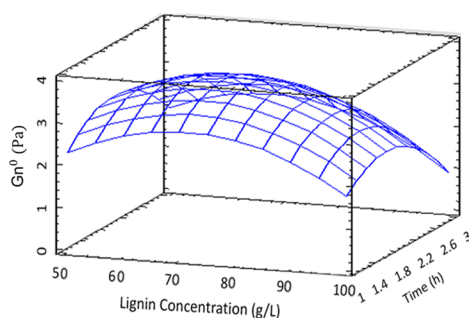


Figure 4. Three-dimensional (3D) response surface and contour plot showing the mutual interaction of Kraft lignin concentration (50–100 g/L) and time of incubation (1–3 h) on viscoelasticity of oleogels.

As shown in the figure, it is evident that the presence of a peak on the surface obtains a maximum point for the variables studied. Therefore, the maximum values of G_n^0 were coincidental with a lignin concentration of 66.6 g/L of Kraft lignin and a reaction time of 1.98 h.

4. CONCLUSIONS

In summary, the rheological properties of oleogels obtained in this work from a laccase-treated residual lignin fulfil the industrial requirements to be considered as an efficient and biodegradable alternative to traditional lubricants. Moreover, the bacterial laccase SiLa has demonstrated its effectiveness for lignin valorization improving its reactivity and making easier its transformation in high-added value products. The eco-friendly oleogels obtained proved to be suitable as thickeners for industrial purposes because they could competitively replace metals actually present in commercial greases.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Manuel Hernández – Departamento de Biomedicina y Biotecnología, Universidad de Alcalá, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain; orcid.org/0000-0002-1430-9952; Phone: +0034918855145; Email: manuel.hernandez@uah.es

Authors

Gabriela Domínguez – Departamento de Biomedicina y Biotecnología, Universidad de Alcalá, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Alba Blánquez – Departamento de Biomedicina y Biotecnología, Universidad de Alcalá, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Antonio M. Borrero-López – Pro2TecS—Chemical Process and Product Technology Research Centre, Departamento de Ingeniería Química, ETSI, Campus de “El Carmen”, Universidad de Huelva, 21071 Huelva, Spain; orcid.org/0000-0001-9483-3713

Concepción Valencia – Pro2TecS—Chemical Process and Product Technology Research Centre, Departamento de Ingeniería Química, ETSI, Campus de “El Carmen”, Universidad de Huelva, 21071 Huelva, Spain; orcid.org/0000-0002-9197-4606

María Eugenia Eugenio – INIA-CIFOR, 28040 Madrid, Spain

María Enriqueta Arias – Departamento de Biomedicina y Biotecnología, Universidad de Alcalá, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Juana Rodríguez – Departamento de Biomedicina y Biotecnología, Universidad de Alcalá, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acssuschemeng.1c00113>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the financial support given by the Spanish Ministry (MINECO) CTQ2014-56038-C3-1R and CTQ2014 56038-C3-2R. We also thank the Fundación Carolina for the PhD fellowship awarded by G.D.

REFERENCES

- Núñez, N.; Martín-Alfonso, J. E.; Valencia, C.; Sánchez, M. C.; Franco, J. M. Rheology of new green lubricating grease formulations containing cellulose pulp and its methylated derivative as thickener agents. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *37*, 500–507.
- Banu, J. R.; Kavitha, S.; Kannah, R. Y.; Devi, T. P.; Gunasekaran, M.; Kim, S.-H.; Kumar, G. A review on biopolymer production via lignin valorization. *Bioresour. Technol.* **2019**, *290*, 121790.
- Key, R. E.; Bozell, J. J. Progress toward lignin valorization via selective catalytic technologies and the tailoring of biosynthetic pathways. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2016**, *4*, 5123–5135.
- Becker, J.; Wittmann, C. A field of dreams: Lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 107360.
- Borrero-López, A. M.; Blánquez, A.; Valencia, C.; Hernández, M.; Arias, M. E.; Franco, J. M. Influence of Solid-State Fermentation with *Streptomyces* on the Ability of Wheat and Barley Straws to Thicken Castor Oil for Lubricating Purposes. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *111*, 625.
- Lange, H.; Decina, S.; Crestini, C. Oxidative upgrade of lignin—Recent routes reviewed. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 1151–1173.
- Gharehkhani, S.; Zhang, Y.; Fatehi, P. Lignin-derived platform molecules through TEMPO catalytic oxidation strategies. *Prog. Energy Combust. Sci.* **2019**, *72*, 59–89.
- Vangeel, T.; Schutyser, W.; Renders, T.; Sels, B. F. Perspective on lignin oxidation: advances, challenges, and future directions. *Topics Curr. Chem.* **2018**, *376*, 53–68.
- Dwivedi, P.; Vivekanand, V.; Pareek, N.; Sharma, A.; Singh, R. P. Co-cultivation of mutant *Penicillium oxalicum* SAUE-3.510 and *Pleurotus ostreatus* for simultaneous biosynthesis of xylanase and laccase under solid-state fermentation. *New Biotechnol.* **2011**, *28*, 616–626.
- Singh, G.; Bhalla, A.; Kaur, P.; Capalash, N.; Sharma, P. Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2011**, *10*, 309–326.
- De La Torre, M.; Martín-Sampedro, R.; Fillat, Û.; Eugenio, M. E.; Blánquez, A.; Hernández, M.; Arias, M. E.; Ibarra, D. Comparison of the efficiency of bacterial and fungal laccases in delignification and detoxification of steam-pretreated lignocellulosic biomass for bioethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *44*, 1561–1573.
- Arias, M. E.; Blánquez, A.; Hernández, M.; Rodríguez, J.; Ball, A. S.; Jiménez-Morillo, N. T.; González-Vila, F. J.; González-Pérez, J. A. Role of a thermostable laccase produced by *Streptomyces ipomoeae* in the degradation of wheat straw lignin in solid state fermentation. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2016**, *122*, 202–208.

- (13) Blázquez, A.; Ball, A. S.; González-Pérez, J. A.; Jiménez-Morillo, N. T.; González-Vila, F.; Arias, M. E.; Hernández, M. Laccase SilA from *Streptomyces ipomoeae* CECT 3341, a key enzyme for the degradation of lignin from agricultural residues? *PLoS One* **2017**, *12*, No. e0187649.
- (14) Margot, J.; Bennati-Granier, C.; Maillard, J.; Blázquez, P.; Barry, D. A.; Holliger, C. Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation. *AMB Express* **2013**, *3*, 63–14.
- (15) Moldes, D.; Sanromán, M. A. Amelioration of the ability to decolorize dyes by laccase: relationship between redox mediators and laccase isoenzymes in *Trametes versicolor*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *22*, 1197–1204.
- (16) Molina-Guijarro, J. M.; Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; Guillén, F.; Moya, R.; Hernández, M.; Arias, M. E. Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoeae*. *Int. Microbiol.* **2009**, *12*, 13–21.
- (17) Blázquez, A.; Guillén, F.; Rodríguez, J.; Arias, M. E.; Hernández, M. The degradation of two fluoroquinolone based antimicrobials by SilA, an alkaline laccase from *Streptomyces ipomoeae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *32*, 52–59.
- (18) Moya, R.; Saastamoinen, P.; Hernández, M.; Suurnäkki, A.; Arias, M. E.; Mattinen, M.-L. Reactivity of bacterial and fungal laccases with lignin under alkaline conditions. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 10006–10012.
- (19) Arias, M. E.; Arenas, M.; Rodríguez, J.; Soliveri, J.; Ball, A. S.; Hernández, M. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 1953–1958.
- (20) Delgado, M. A.; Valencia, C.; Sánchez, M. C.; Franco, J. M.; Gallegos, C. Influence of Soap Concentration and Oil Viscosity on the Rheology and Microstructure of Lubricating Greases. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45*, 1902–1910.
- (21) Martín-Alfonso, J. E.; Valencia, C.; Sánchez, M. C.; Franco, J. M. Evaluation of Thermal and Rheological Properties of Lubricating Greases Modified with Recycled LDPE. *Tribol. Trans.* **2012**, *55*, 518–528.
- (22) Thakur, K.; Kalia, S.; Pathania, D.; Kumar, A.; Sharma, N.; Schauer, C. L. Surface functionalization of lignin constituent of coconut fibers via laccase-catalyzed biografting for development of antibacterial and hydrophobic properties. *J. Cleaner Prod.* **2016**, *113*, 176–182.
- (23) Ortner, A.; Hofer, K.; Bauer, W.; Nyanhongo, G. S.; Guebitz, G. M. Laccase modified lignosulfonates as novel binder in pigment based paper coating formulations. *React. Funct. Polym.* **2018**, *123*, 20–25.
- (24) Atalah, J.; Cáceres-Moreno, P.; Espina, G.; Blamey, J. M. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresour. Technol.* **2019**, *280*, 478–488.
- (25) Liu, Y.; Luo, G.; Ngo, H. H.; Guo, W.; Zhang, S. Advances in thermostable laccase and its current application in lignin-first biorefinery: A review. *Bioresour. Technol.* **2020**, *298*, 122511.
- (26) Kalia, S.; Thakur, K.; Kumar, A.; Celli, A. Laccase-assisted surface functionalization of lignocellulosics. *J. Mol. Catal. B.: Enzym* **2014**, *102*, 48–58.
- (27) Borrero-López, A. M.; Blázquez, A.; Valencia, C.; Hernández, M.; Arias, M. E.; Eugenio, M. E.; Fillat, Ú.; Franco, J. M. Valorization of soda lignin from wheat straw solid-state fermentation: production of oleogels. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2018**, *6*, 5198–5205.
- (28) Gallego, R.; Piras, C. C.; Rutgeerts, L. A. J.; Fernandez-Prieto, S.; de Borggraeve, W. M.; Franco, J. M.; Smets, J. Green approach for the activation and functionalization of jute fibers through ball milling. *Cellulose* **2020**, *27*, 643–656.
- (29) Cortés-Triviño, E.; Valencia, C.; Delgado, M. A.; Franco, J. M. Modification of alkali lignin with poly (ethylene glycol) diglycidyl ether to be used as a thickener in bio-lubricant formulations. *Polymer* **2018**, *10*, 670–684.
- (30) van de Pas, D.; Hickson, A.; Donaldson, L.; Lloyd-Jones, G.; Tamminen, T.; Fernyhough, A.; Mattinen, M.-L. Characterization of fractionated lignins polymerized by fungal laccases. *BioResources* **2011**, *6*, 1105–1121.
- (31) Widsten, P.; Kandelbauer, A. Laccase applications in the forest products industry: a review. *Enzyme Microbiol. Technol.* **2008**, *42*, 293–307.
- (32) Gupta, S.; Bhushan, B.; Hoondal, G. S. Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus sp.* SG-13 and its application in biobleaching of Kraft pulp. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88*, 325–334.
- (33) Martín-Alfonso, J. E.; Franco, J. M. Influence of polymer reprocessing cycles on the microstructure and rheological behavior of polypropylene/mineral oil oleogels. *Polym. Test.* **2015**, *45*, 12–19.