

Universidad Nacional Autónoma de México

---

Facultad de Química



**PRODUCCION DE CELULOSA Y PROTEINA UNICELULAR  
A PARTIR DE DESECHOS AGRICOLAS**

**Daniel Alejandro Paz Zavala**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

1 9 8 0

M-21729



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES:

*Alicia Zavala de Paz.*

*Octavio Paz Legaria.*

A MIS HERMANOS:

*Beatriz y Octavio.*

*Al Dr. Alfredo Echegarar Alemán  
por su valiosa colaboración en  
la elaboración de este trabajo.*

A ELIZABETH .

PRESIDENTE LILIA VIERNA GARCIA

VOCAL ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN

Jurado asignado originalmente SECRETARIO JORGE SOTO SORIA

según el tema

1 er.SUPLENTE OLGA VELAZQUEZ MADRAZO

2 do.SUPLENTE BEATRIZ LUNA MILLAN

Sitio donde se desarrolló

el tema:

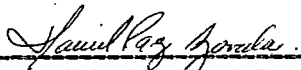
BIBLIOTECA:FAC. QUIMICA, FAC. CIENCIAS,

CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS

AVANZADOS I.P.N., INSTITUTO MEXICANO DEL

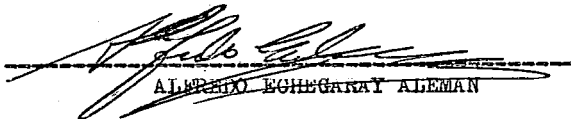
PETROLEO, LAB. BIOQUIMEX S.A.

Nombre y firma del sustentante:



DANIEL ALEJANDRO PAZ ZAVALA

Nombre y firma del asesor del tema:



ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN

# I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION .....	1
OBJETIVOS .....	3
Capítulo I	
*CELULOSA .....	4
I.1 Estructura de la Celulosa .....	4
I.2 Paredes Celulares Vegetales .....	8
I.3 Hidrólisis de Celulosa .....	11
*Capítulo II	
ENZIMAS .....	13
II.1 Clasificación de las Celulasas .....	13
II.2 Degradación Enzimática de Celulosa .....	14
Capítulo III	
MEDICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA .....	17
III.1 Determinación de Azúcares Reductores por el método del ácido Dinitrosalicílico .....	23
III.2 Medición de Actividad en Exo Beta Glucanasas .....	25
III.3 Medición de Actividad en Endo Beta Glucana-- sas .....	26
III.4 Medición de Actividad Enzimática Total .....	27
Capítulo IV	
SELECCION DEL MICROORGANISMO CELULOLITICO .....	30
IV.1 Características Generales del Género <u>Trichoderma</u> .....	33

	Pág.
IV.2 Inducción de Celulasas .....	34
IV.3 Efecto de Aditivos en la Producción de Celulosa por <u>T. viride</u> .....	39
 Capítulo V	
PROTEINA UNICELULAR .....	43
V.1 Eliminación del Contenido de Acidos Nucléicos	44
V.2 Proceso General para Producir Proteína Unicelular .....	46
V.3 Trabajos realizados hasta la fecha en nuestro país .....	46
 Capítulo VI	
SELECCION DEL MATERIAL CELULOSICO .....	50
VI.1 Composición y Valor de la Paja de Cebada ...	51
VI.2 Características Generales de la Paja de Cebada .....	51
VI.3 Deslignificación del Material Celulósico ...	52
 Capítulo VII	
ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA APLICABILIDAD DE LA PAJA DE CEBADA DESLIGNIFICADA MEDIANTE EL METODO PEITERSEN, EN EL DESARROLLO DE MICROORGANISMOS CELULOLITICOS .....	54
 Capítulo VIII	
ESTUDIOS FERMENTATIVOS PARA LA PRODUCCION DE ALTOS NIVELES DE ENZIMA .....	59

Capítulo IX

PRODUCCION DE CELULASA Y PROTEINA UNICELULAR A PARTIR DE LA MEZCLA DE CULTIVOS DE <u>T. VIRIDE</u> Y UNA LEVADURA .....	69
CONCLUSIONES .....	80
BIBLIOGRAFIA .....	82



## INTRODUCCION

Recientemente, gran número de investigadores y gobiernos de varios países se han interesado en el problema de encontrar nuevos alimentos para nuestra creciente población. Las fuentes tradicionales de proteínas para consumo humano y animal, pueden reemplazarse por proteínas procedentes de microorganismos, ya que éstos contienen las mismas y además se reproducen rápidamente. Un aspecto fundamental consistió en encontrar materia prima barata y en abundancia durante todo el año. Las primeras investigaciones se centraron en la utilización de derivados del petróleo, cosa que hubo que abandonarse por varias razones, como son: la toxicidad y el aumento en el precio de los productos petroleros, etc.

La producción en gran escala de proteína unicelular partiendo de desperdicios agrícolas, ha sido considerada con marcado interés como una respuesta al problema de la alimentación.

La celulosa, siendo el componente primordial de las plantas verdes, representa una de las más grandes fuentes alimenticias, proveedoras de energía existentes en la tierra. Desafortunadamente el hombre y muchos otros animales no pueden digerirla. Para poderla utilizar como alimento, es necesario primeramente hidrolizarla a glucosa; sin embargo, el principal requerimiento nutricional del hombre son las proteínas más que los carbohidratos.

En la degradación aeróbica de materiales celulósicos, en la naturaleza participan muchos microorganismos tales como bacterias, actinomicetos, hongos y protozoarios. La acción continua de éstos impide la acumulación de restos de vegetales sobre la superficie terrestre, ya que transforman a la celulosa en sustancias que pueden ser utilizadas por otros seres vivientes. El hongo celolítico Trichoderma viride produce una enzima extracelular capaz de degradar una extensa variedad de materiales celulósicos. La actividad de la enzima es suficiente pa-

ra llevar a cabo la conversión de aproximadamente el 70% del sustrato celulósico a azúcar. Últimamente, se han desarrollado metodologías basadas en el aprovechamiento de esta propiedad, las cuales fundamentalmente consisten en la utilización del azúcar previamente formada, como sustrato para el crecimiento de levaduras altamente productoras de proteína unicelular de gran calidad.

En estas fermentaciones que utilizan más de un microorganismo, las interacciones que se presentan pueden ser de diferentes tipos. La fermentación anteriormente descrita presenta una interacción conocida como mutualismo competitivo.

A pesar de que las investigaciones sobre este tema sólo han sido efectuadas en pequeña escala, los resultados indican que los procesos pueden ser aplicables a nivel industrial.

## OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio monográfico son:

### Objetivo Genérico:

Dar a conocer las fermentaciones celulolíticas que presentan las mejores perspectivas de aplicabilidad a nivel industrial.

### Objetivos Específicos:

- a) Exponer la conveniencia de utilizar al hongo Trichoderma viride sobre los demás microorganismos celulolíticos.
- b) Señalar las ventajas de una adecuada selección del sustrato celulósico, tomando en cuenta que sea una fuente renovable alimentaria hasta ahora no aprovechada.
- c) Seleccionar el pretratamiento deslignificante más apropiado al sustrato celulósico seleccionado.
- d) Indicar los parámetros óptimos de la fermentación.
- e) Elegir y describir los métodos analíticos necesarios, para seguir detalladamente el curso de las fermentaciones celulolíticas.
- f) Servir de información básica fundamental, para dar lugar a la realización de futuras investigaciones enfocadas a utilizar otros sustratos y pretratamientos.
- g) Plantear la obtención de mejores rendimientos, tanto en la producción de enzima como de proteína unicelular, mediante la utilización de mutantes producidas a partir de cepas de efectividad celulolítica comprobada.

## I.0 CELULOSA

Los procesos evolutivos de la naturaleza han seleccionado variedades de vegetales con pared celular gruesa, adaptada para soportar el cuerpo de la planta, el viento, la lluvia y capaz de sostener hojas fotosintetizadoras - que permitan el máximo acceso a la luz y al aire. Puesto que los carbohidratos son un producto económico y abundante en estas plantas, obtenidos fácilmente a partir de dióxido de carbono y agua mediante la fotosíntesis, no es de sorprendernos su utilización para construir el soporte esquelético. Las moléculas de azúcar se unieron unas con otras para formar grandes cadenas y, a su vez, estas cadenas se enlazaron mediante uniones laterales para formar lo que se conoce como celulosa.

La celulosa constituye más del 50% del carbono orgánico total presente en la biosfera; es el polisacárido estructural de las paredes celulares más abundante y sencillo del mundo vegetal. La madera está formada por un 40-60% de celulosa (en peso seco), y el algodón es celulosa casi pura. La celulosa también se encuentra en algunos - invertebrados inferiores; se presenta casi siempre como - material extracelular.

Un soporte estructural resistente al ataque de --- otros organismos, resulta ser el más adecuado esqueleto - vegetal, y la celulosa, no obstante estar compuesta por - azúcar fácilmente metabolizable, es resistente a la digestión enzimática de los animales superiores.

### I.1 ESTRUCTURA DE LA CELULOSA

La celulosa es un homopolisacárido lineal compuesto de unidades D-(+)-glucosa ligadas entre sí por enlaces -- B(1-4). Cuando la celulosa se metila exhaustivamente y - luego se hidroliza, produce tan solo 2,3,6-tri-O-metil-D-

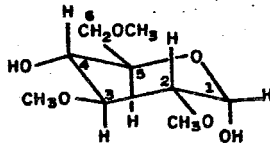
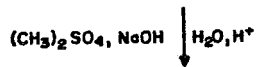
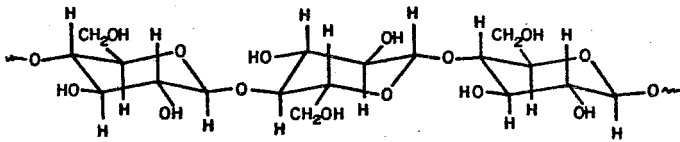
glucosa, lo cual demuestra que todos sus enlaces glucosídicos son (1-4), y que no existen puntos de ramificación (Fig. 1). El tratamiento con anhídrido acético y ácido sulfúrico nos produce octa-O-acetilcelobiosa; lo cual es la evidencia de que todos sus enlaces glucosídicos son uniones beta (Fig. 2).

Mediante métodos físicos se ha determinado el peso molecular de la celulosa, encontrándose en un rango que va de 50,000 a 500,000, que es el equivalente de 300 a 3000 restos de glucosa por molécula.

Las cadenas de celulosa podrían estar torsionadas o enrolladas, pero debido a la naturaleza del enlace B-glucosídico tienden a quedar extendidas. Esta rigidez se ve incrementada mediante la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígeno del C#6 y del C#2 de unidades de glucosa adyacentes. En una molécula de celulosa existen sitios en los que las cadenas se encuentran entretejidas en forma desordenada (región amorfa) y sitios en los que se encuentran con una distribución cristalina. Esta combinación de regiones cristalinas y regiones amorfas da por resultado que la celulosa tenga algunas propiedades físicas de gran importancia para las fibras de las plantas. En las regiones cristalinas las cadenas se encuentran unidas entre sí por medio de fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno; por lo tanto, aun cuando individualmente las cadenas son débiles, los agregados son fuertes; las fibras vegetales tienen la misma fuerza tensil que el acero. Debido a la compacidad de las regiones cristalinas, la mayoría de los reactivos atacan a la celulosa únicamente en las regiones amorfas y sólo algunos reactivos penetran en las regiones cristalinas.

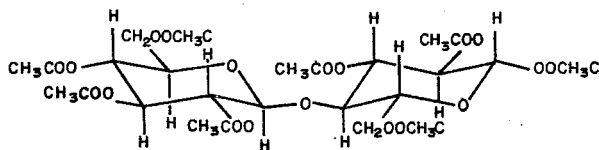
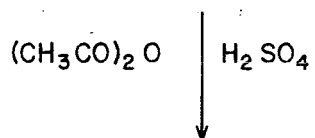
FIG. 1

## Estructura de la Celulosa



2,3,6-Tri-O-metil-D-glucosa

FIG. 2  
CELULOSA



Octa-O-acetilcelobiosa

## I.2 PAREDES CELULARES VEGETALES

Mediante el análisis por difracción de rayos X, se ha logrado saber que las moléculas de celulosa en las paredes celulares se hallan organizadas en haces de cadenas paralelas, o fibrillas, unidas transversalmente mediante enlaces de hidrógeno. Tales fibrillas son del todo insolubles en agua. Las fibrillas poseen un espesor de 100 a 250 Å y varias micras de longitud. Estas se encuentran cementadas por una matriz constituida por otros tres materiales polímeros: la hemicelulosa, la pectina y la extensina. El más abundante de estos materiales lo constituyen las hemicelulosas, que no se hallan relacionadas estructuralmente con la celulosa, sino que son D-xilanos, con enlaces B(1-4) y cadenas laterales de arabinosa y otros azúcares. La pectina es un polímero de metil-D-galactouronato. La extensina, es una proteína y se encuentra unida covalentemente a las fibrillas de celulosa.

Las plantas leñosas contienen otra sustancia polimérica, la lignina, que comunica a la pared celular su fuerza y rigidez, constituyendo casi el 25% del peso seco de estas plantas. La estructura de la lignina no es bien conocida; pero se sabe que está constituida por alcoholes aromáticos polimerizados.

La pared celular consta de tres capas: la sustancia intercelular o lámina media, la pared primaria y la pared secundaria.

La lámina media es la capa que se forma entre dos paredes celulares adyacentes y se compone principalmente de polímeros de pectina, pero también puede tener lignina como en el caso de las plantas leñosas. Las pectinas ayudan a fijar unas a otras las células vecinas; cuando se quitan las pectinas por reacciones enzimáticas o químicas, se separan las células conservando su pared y su forma.

La pared primaria está formada por fibrillas de celulosa, hemicelulosa, pectinas y lignina.



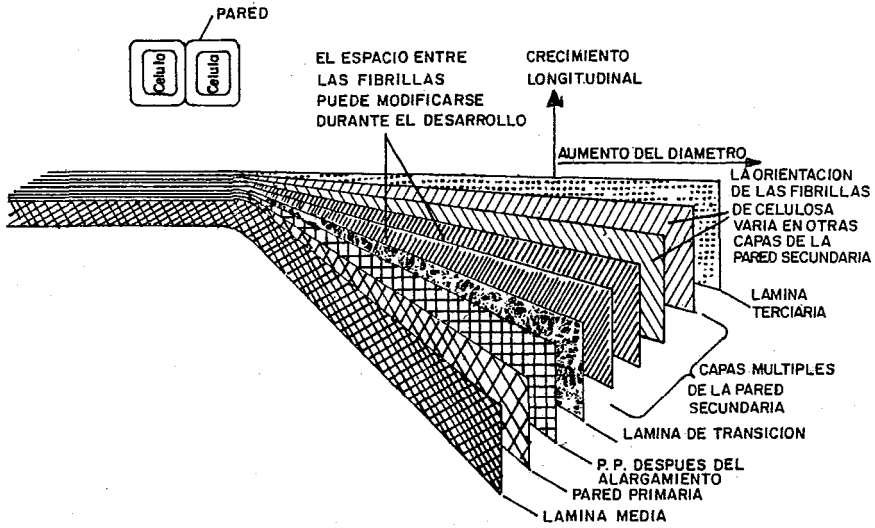
La pared secundaria, que se asienta al final, contiene principalmente celulosa y pequeñas cantidades de hemicelulosa y lignina. Se caracteriza por tener varias subcapas; en cada una de ellas las fibrillas aisladas de celulosa se orientan paralelamente, pero en capas sucesivas, la dirección de las fibras forman ángulos variables; esta disposición de las microfibrillas en enrejados tridimensionales sumamente ordenados le proporciona a la pared celular vegetal una gran fuerza y plasticidad. También, aparecen un gran número de aberturas, cuya forma y distribución varía, las cuales se denominan fosos. Penetrando a través de los fosos y atravesando las paredes primarias y las láminas medias de células adyacentes existen unos microtúbulos conocidos con el nombre de plasmodesmata. El retículo endoplásmico de las células fluye libremente a través de la plasmodesmata, con lo que se permite el libre intercambio de materiales y hormonas entre las células.

También puede existir una pared celular terciaria, que se caracteriza por ser delgada y poseer pequeñas partículas granulares, por lo que recibe el nombre de capa granulosa (Fig. 3).

Se sabe muy poco acerca de los mecanismos de secreción de la pared celular y de la regulación por la célula de la disposición de túbulos y fibrillas de celulosa.

Las radioautografías muestran que las primeras etapas de incorporación de glucosa tienen lugar en el aparato de Golgi, y que las vacuolas del mismo nombre intervienen en la formación de la lámina media y de las paredes celulares primarias adyacentes durante la división celular por mitosis. Este organelo, rico en enzimas para la síntesis de los fosfolípidos y de la celulosa, libera pequeñas vacuolas que se alinean y funden en forma lineal. Al principio constituyen una matriz tipo gel, que posteriormente se desarrolla en la lámina media mediante el depósito de hemicelulosas y pectinas.

FIG. 3



PAREDES CELULARES VEGETALES.

### I.3 HIDROLISIS DE CELULOSA

Algunas de las propiedades más importantes de la celulosa, se basan en su alta resistencia contra el desdoblamiento químico y enzimático.

#### I.3.1 HIDROLISIS QUIMICA

Se requiere un calentamiento prolongado con ácidos minerales concentrados ( $H_2SO_4$ ) para hidrolizar todas las uniones glucosídicas y transformar el polímero en glucosa. Está comprobado que el proceso es incosteable, pues debe contarse con equipo especial anticorrosivo. La hidrólisis deberá ser neutralizada y el azúcar recuperado deberá someterse a diversos procesos de purificación, debido a que su extracción requiere de la eliminación de las sales en exceso y de productos tóxicos como el furfural, formados también durante el proceso.

Recientemente, se ha reexperimentado en los procesos de hidrólisis ácidas. Dentro de las innovaciones se encuentra un pretratamiento de la celulosa mediante calentamiento y posterior trituración, obteniéndose una mayor solubilidad y susceptibilidad a la hidrólisis ácida.

El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales (INIF) de México, ha desarrollado un nuevo sistema de pretratamiento para extraer celulosa y lignina a partir de cualquier vegetal, obteniéndose una celulosa fácilmente hidrolizable. El sistema consiste en un proceso de oxidación basado en el uso de ácido nítrico, y un suave baño alcalino a una temperatura de  $70^\circ C$ . Con este nuevo sistema se extrae de 20 a 30% de lignina y de 50 a 60% de celulosa, contenidas en cualquier vegetal. (1)

### 1.3.2 HIDROLISIS ENZIMATICA

Muchos microorganismos tales como bacterias, hongos, actinomicetos y protozoarios pueden digerir la celulosa - por medio de enzimas para utilizarla como alimento. Las bacterias celulolíticas y los protozoarios son frecuentemente anaeróbicos por lo que dificultan su cultivo. Además, las bacterias tienden a la producción de grandes cantidades de sustancias viscosas y su poder de penetración a través de las paredes celulares vegetales es lento. Los hongos y los actinomicetos celulolíticos crecen fácilmente sobre medios de cultivo simples y segregan sus celulasas al medio. El hecho de producir la enzima extracelularmente, aunado al mayor poder de penetración debido a la morfología de sus hifas, hace de los hongos celulolíticos los microorganismos más indicados para su aplicación industrial.

El hecho de que la celulosa esté compuesta de azúcar, la convierte en una fuente potencial de alimento, y algunos animales superiores, incapaces de utilizarla, han desarrollado mecanismos para hospedar y permitir el crecimiento de microorganismos celulolíticos. En consecuencia, esto ha conducido a asociaciones funcionales íntimas entre animales y microorganismos, en los cuales los microorganismos digieren la celulosa que les provee el huésped. Este tipo de asociación es una forma de simbiosis conocida como mutualismo, en la cual ambas especies se benefician recíprocamente.

Uno de los ejemplos más notables de mutualismo que involucra la digestión de la celulosa, es la que existe entre los termes y sus protozoarios intestinales. También un gran número de mamíferos consumidores de pastos, utilizan la celulosa mediante la ayuda de microorganismos simbióticos que se encuentran en su tracto digestivo especialmente organizado.

## II.0 ENZIMAS

Las enzimas son moléculas proteicas muy especializadas, elaboradas por las células a partir de aminoácidos. Las enzimas superan notablemente a los catalizadores producidos por el hombre en especificidad reactiva, así como en eficacia, a tal grado que son capaces de catalizar secuencias de reacciones muy complejas en milésimas de segundo. Presentan una propiedad especialmente importante a nivel industrial: las reacciones catalizadas enzimáticamente tienen lugar con un rendimiento del 100% y no hay subproductos.

Las enzimas poseen parámetros característicos en los cuales su actividad es máxima, tal es el caso del pH, la temperatura, etc.

Los procesos microbiológicos industriales dependen de la acción coordinada de enzimas producidas por microorganismos seleccionados. En estos últimos años se ha venido utilizando la capacidad enzimática específica de varios microorganismos para llevar a cabo determinadas modificaciones químicas en el sustrato en sustitución de los métodos químicos, a los que aventajan ampliamente en rendimiento.

## II.1 CLASIFICACION DE LAS CELULASAS

Las enzimas celulolíticas se encuentran en el grupo de las hidrolasas y en el subgrupo que actúa sobre grupos glucosídicos. También se clasifican dentro del grupo de enzimas inducibles, pues requieren para su formación de un compuesto inductor, para ser producidas en cantidades que no sean mínimas. Las celulosas se producen únicamente cuando el microorganismo crece sobre celulosa, glucanos y sobre algunos oligosacáridos.

Aunque todas las enzimas se forman inicialmente dentro de las células, algunas de ellas son segregadas a través de la pared celular y ejercen su acción sobre el medio externo. De esta manera, se consideran dos tipos de enzimas, según el lugar en el cual actúan: enzimas intracelulares o endoenzimas y enzimas extracelulares o exoenzimas. Las enzimas intracelulares tienen por objeto sintetizar el material celular, y activar las reacciones catabólicas que proveen las demandas energéticas de la célula. Las enzimas extracelulares tienen como función principal transformar en elementos nutritivos las sustancias alimenticias que se encuentran en el medio externo para que puedan penetrar en la célula. Las celulasas pertenecen al grupo de enzimas extracelulares.

A través de los años se han comparado miles de microorganismos degradadores de celulosa y factibles a producir la enzima extracelularmente. Los resultados han sido bien claros, las bacterias juegan un papel insignificante en la degradación de la celulosa en comparación con los hongos.

## II.2 DEGRADACION ENZIMATICA DE CELULOSA

La teoría de Reese (37) acerca de la degradación enzimática de celulosa, ampliada por Nisizawa (33), es considerada como la mejor y de acuerdo con ella el complejo celulásico está constituido por las siguientes enzimas:

- a) Una enzima  $C_1$  (no hidrolítica), que actúa sobre la celulosa nativa impartiendo cierta solubilidad.
- b) Una serie de enzimas- $C_x$  (hidrolíticas), que actúan rompiendo las cadenas de celulosa soluble (activa), liberando unidades de celobiosa. La explicación del porqué solamente se produce celobiosa, puede describirse de la siguiente forma: las moléculas de

glucosa en la larga cadena de celulosa presentan los mismos enlaces químicos, excepto en que alteran su posición, de modo que unos se encuentran hacia la superficie externa del cristal de celulosa, mientras que otros se localizan hacia la superficie interna. Esto provoca que todos los enlaces sean semejantes, pero no idénticos, pues difieren en cuanto a su posición respecto a las moléculas que unen. Las enzimas- $C_x$  presentan afinidad por solamente uno de estos tipos de enlace; de modo que su acción causa el desprendimiento de dos moléculas unidas de glucosa en lugar de una.

- c) Una Celobiasa, la acción de esta enzima es la de convertir a la celobiosa en dos moléculas de glucosa.

Wood y Mc. Crae (6), son de los investigadores que más estudios tienen sobre la naturaleza de las enzimas celulolíticas en hongos. Primeramente, se cultiva al microorganismo en estudio sobre algún material celulósico. Las enzimas producidas durante la fermentación pueden ser fácilmente separadas del micelio y de la celulosa residual mediante centrifugación o filtración. Las celulasas en el filtrado se extraen precipitándolas con acetona, obteniéndose así preparaciones enzimáticas puras y libres de células para su posterior utilización en los métodos analíticos. Mediante análisis de cromatografía de intercambio iónico (que aprovecha las diferencias en propiedades ácido-básicas), cromatografía de adsorción con adsorbentes tales como el hidroxapatito, el almidón o el gel de alúmina, la electroforesis de zona sobre bloques de almidón o de poliacrilamida, han logrado el fraccionamiento y purificación de los constituyentes de varias celulasas. Los resultados son los siguientes:

- a) La enzima  $C_1$  es una exo-b-1-4-glucanasa, presentándose por lo menos una de éstas en todos los hongos celulolíticos en estudio.

- b) Las enzimas del complejo  $C_x$  pertenecen a las endo- $\beta$ -1-4-glucanasas, pudiendo presentarse de 2 a 5. Aun que en la mayoría de los casos se presentan 5.
- c) La celobiasa es una  $\beta$ -glucosidasa, presentándose 1 ó 2 de estas enzimas.



### III.0 MEDICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA (25,26,27,42)

La celulasa es un complejo enzimático que presenta tres tipos diferentes de actividad, que son: exo-B-1-4-glucanasa, endo-B-1-4-glucanasa y B-glucosidasa. Para cada una de las actividades señaladas existen diferentes métodos de detección en el laboratorio y que pueden ser separados en dos grupos:

- a) Métodos que determinan la actividad enzimática en forma individual para alguna de las enzimas que integran el complejo celulásico.
- b) Métodos que determinan conjuntamente la actividad enzimática de todo el complejo.

Estos métodos difieren marcadamente en sensibilidad, sustrato utilizado, forma de efectuar la medición, duración de la prueba y condiciones de ejecución de la misma.

Para cuantificar el trabajo de la actividad enzimática, las unidades de medición deberán basarse en:

- a) Capacidad hidrolítica de la enzima por unidad de tiempo.
- b) Tiempo requerido para que la preparación enzimática efectúe un cambio.
- c) Concentración de enzima requerida para que se efectúe el cambio en una unidad de tiempo.

Los métodos de detección propuestos por Mandels y Weber (27), han sido estandarizados para las determinaciones de actividad en filtrados crudos, así como para determinaciones de la enzima purificada. Estos métodos miden la producción de azúcares reductores medidos como glucosa por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (29). Para la correcta medición de las actividades tanto total como parciales, se han seleccionado los

sustratos específicos así como los tiempos necesarios de reacción para cada una de ellas.

Los parámetros de incubación seleccionados para la ejecución de las pruebas son:

- a) pH de 4.8, en él la hidrólisis que presenta la enzima al actuar sobre una extensa variedad de sustratos celulósicos es máxima (Tabla I, Fig. 4).
- b) Temperatura de 50°C, en la cual se observa una marcada relación lineal entre la concentración enzimática y su correspondiente capacidad hidrolítica (Tabla II, Fig. 5).

El hongo *Trichoderma viride* QM No. 6a fue el utilizado para la selección de los parámetros óptimos de incubación. La fuente de celulosa utilizada para el crecimiento del hongo fue Solka Floc S.W. 40A (Brown Co., Berlin, N.H.) al 1.0%, la cual es una celulosa purificada. Los cultivos en frasco fueron inoculados con una suspensión de esporas y cultivados a 29°C sobre dispositivos de agitación durante 18 días.

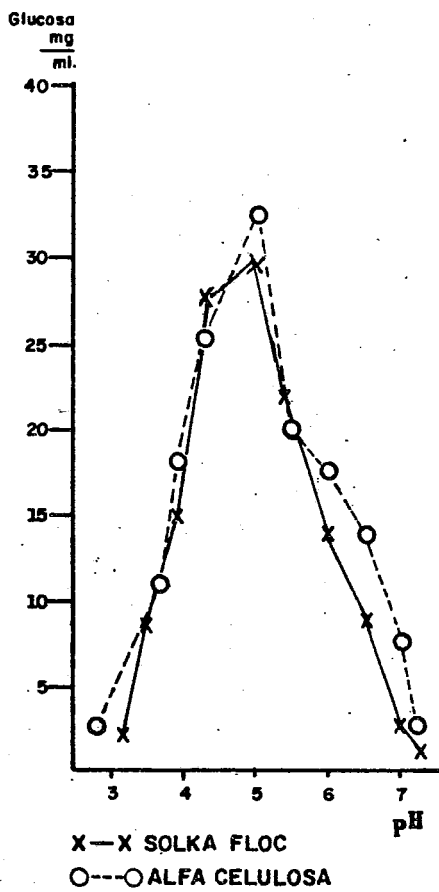
## T A B L A I

Efecto del pH en la Capacidad Hidrolítica de la Enzima

pH	glucosa mg/ml	
	Solka Floc	$\beta$ -Celulosa
3.0	1.79	2.39
3.6	8.37	11.66
4.0	18.72	16.45
4.5	28.29	25.12
4.8	29.61	32.00
5.5	21.23	20.34
6.0	14.06	17.20
6.5	8.37	12.86
7.0	2.87	6.88
7.5	1.38	2.39

Sustrato 500 mg + 10 ml del filtrado crudo libre de células, se incuban en tubos de ensaye al pH probado y a una temperatura de 50°C, durante 10 días. Después de la incubación se toma 1.0 ml y se determina la producción de azúcares reductores por el método DNS (descrito en la sección III.1).

FIG. 4



## T A B L A II

Efecto de la Concentración de Enzima y Temperatura en la hidrólisis de Carboximetilcelulosa y Papel Filtro

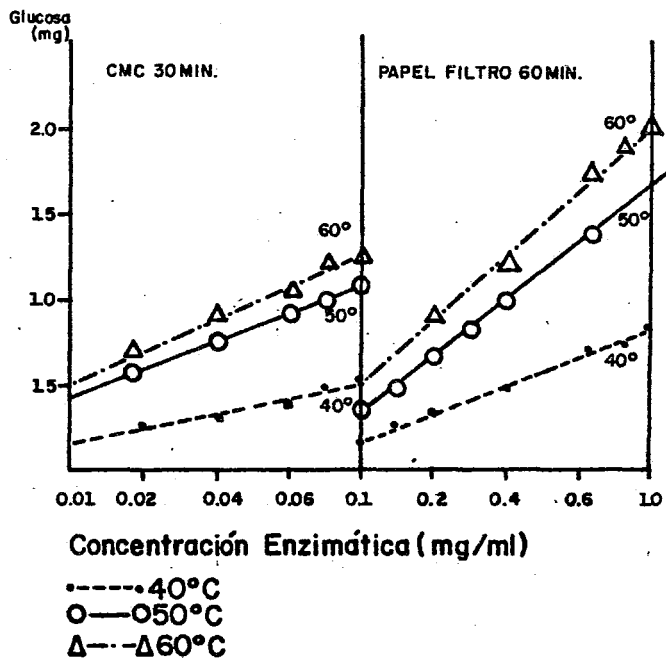
Carboximetilcelulosa			
enzima mg / ml	40°C	50°C	60°C
	mg de glucosa		
0.01	0.122	0.363	0.436
0.02	0.231	0.563	0.681
0.04	0.299	0.763	0.954
0.06	0.372	0.877	1.049
0.08	0.454	1.122	1.068
0.10	0.499	1.136	1.345

Ver determinación en la Sección III.3.

Papel Filtro			
enzima mg / ml	40°C	50°C	60°C
	mg de glucosa		
0.10	0.163	0.299	0.499
0.20	0.272	0.641	0.818
0.40	0.568	1.022	1.209
0.60	0.659	1.318	1.699
0.80	0.681	1.545	1.913
1.00	0.799	1.745	2.045

Ver determinación en la Sección III.4

FIG. 5



### III.1 DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES POR EL METODO DEL ACIDO DINITROSALICILICO (29).

En solución alcalina caliente, la glucosa reduce al ácido 3,5 dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, de tal manera que los grupos aldehído del azúcar se oxidan a grupos carboxilo, produciéndose un color anaranjado rojo. La densidad óptica del color producido es directamente proporcional a la cantidad de glucosa en la solución.

Los reactivos utilizados son:

- Solución de ácido dinitrosalicílico. Se mezclan - 300 ml de solución de NaOH al 4.5%; 880 ml de solución acuosa de ácido dinitrosalicílico al 1%; y 225 g de tartrato doble de sodio y potasio (para prevenir la oxidación del reactivo).
- Solución estándar de glucosa. Se desarrolla una - curva estándar con soluciones de glucosa en concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/ml.

Se disponen en tubos de ensayo las sustancias siguientes:

	Problema	Patrón	Blanco
Muestra Problema	1.0 ml	--	--
Solución patrón de glucosa	--	1.0 ml	--
Agua destilada	--	--	1.0 ml
Solución de ácido dinitrosalicílico	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml

Los tubos se mezclan y se ponen en baño de agua hirviente durante 5 minutos exactamente. Se enfrían bajo la llave. Cada solución se diluye a 25 ml con agua destilada.

da y se mezcla. Se leen las densidades ópticas a 550 nm; el cero se establece con el blanco.

La concentración de la muestra problema se establece de la extrapolación de su densidad óptica en la curva Estándar de glucosa.



### III.2 MEDICION DE ACTIVIDAD EN EXO BETA GLUCANASAS (27)

Para efectuar esta determinación, se ha optado por la utilización directa del filtrato crudo, pues aún con las interferencias que pueden provocar las demás enzimas celulolíticas, se obtienen resultados más significativos que los obtenidos con enzima purificada. Esto es debido a que los métodos actuales de separación y purificación recuperan un porcentaje menor de enzima.

El método puede describirse de la manera siguiente: Para 50 mg. de algodón absorbente se adicionan 1.0 ml de buffer de citrato de Na, 0.05M pH de 4.8 y 1.0 ml de muestra. Incubar durante 24 horas a 50°C, adicionar el reactivo DNS y determinar azúcares reductores. Una modificación utiliza como sustrato algodón en fibras a una temperatura de incubación de 40°C.

Los mg de azúcares reductores producidos deberán convertirse a Unidades Internacionales de Actividad Enzimática. Por acuerdo de la Unión Internacional de Bioquímica, 1.0 unidad de actividad enzimática se define como la cantidad que origina la transformación de 1.0 micromol ( $10^{-6}$ ) de sustrato por minuto en condiciones óptimas de medida. El cálculo de unidades de actividad en celulasas se basa en las micromoles de glucosa desprendidas por minuto. Para esta determinación 1.0 mg de glucosa producidos equivalen a 0.00385 unidades, esto es:

1.0 micromol de glucosa equivale a 0.180 mg, por lo que 1.0 mg de glucosa en una determinación de 24 horas será igual a  $\frac{1}{(24 \times 60) \times 0.180} = 0.003858$

De acuerdo a lo anterior, tendremos que las Unidades Internacionales de Actividad enzimática  $C_1 \cdot \text{ml}^{-1}$ , van a ser iguales a:

$$\frac{\text{mg de glucosa producidos} \times 0.003858}{\text{ml de enzima}} = (\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1}) C_1$$

### III.3 MEDICION DE ACTIVIDAD EN ENDO BETA GLUCANASAS (27)

Al igual que en el caso anterior, se prefiere la utilización directa del filtrado crudo. El sustrato seleccionado para la determinación es la Carboximetilcelulosa (CMC) 50T (Hercules Powder Co.). El desarrollo del método es el siguiente: Para 0.5 ml de CMC al 1.0% en buffer de citrato de Na 0.05 M se adicionan 0.5 ml de muestra. Se incuban durante 30 min. a 50°C y a pH de 4.8, adicionar el reactivo DNS y determinar azúcares reductores. La conversión de los mg de glucosa obtenidos a Unidades Internacionales de Actividad Enzimática es la siguiente:

$$\frac{1}{30 \times 0.180} = 0.185$$

$$\frac{\text{mg de glucosa producidos} \times 0.185}{\text{ml de enzima}} = (\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1}) C_x$$

### III.4 MEDICION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA TOTAL (27, 35, 36)

En la producción de celulasas para una aplicación - específica, el método ideal de medición va a ser aquel - que muestre la más estrecha relación con las condiciones bajo las cuales la enzima va a ser utilizada. Como lo - que nos interesa es la producción de azúcar a partir de - desperdicios agrícolas, la medición de actividad más apropiada será la que nos proporcione la actividad enzimática de todo el complejo. Mediante la utilización de esta medición, se podrá seguir detalladamente el curso de la fermentación. El método es el siguiente:

En un tubo de ensaye se colocan 50 mg de Papel Filtro (PF) Whatman No. 1, 1.0 ml de buffer de citrato de Na 0.05M y 1.0 ml de muestra. Se incuban durante una hora a 50°C y pH de 4.8, adicionar el reactivo DNS y determinar azúcares reductores medidos como glucosa. El cálculo para la conversión a Unidades Internacionales de Actividad Enzimática es el siguiente:

$$\frac{1}{60 \times 0.180} = 0.0926$$

$$\frac{\text{mg de glucosa producidos} \times 0.0926}{\text{ml de enzima}} = (\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1}) \text{ PF.}$$

El tiempo de reacción es corto, el pH y la temperatura son óptimos y el PF como sustrato proporciona una medición confiable para el tipo de actividad requerida. La selección del PF se basó principalmente a su rápida susceptibilidad a hidrolizarse en un tiempo de reacción corto. Los resultados obtenidos por este método pueden ser fácilmente reproducibles en otros laboratorios. El PF - cortado en tiras de dimensiones estándares (1 x 6 cm) puede emplearse, evitándose así el trabajo de hacer la pesada.

El filtrado crudo libre de células producido por Trichoderma viride QM No. 6a creciendo sobre Solka Floc -

al 1.0%, fue utilizado para la selección del sustrato celulósico específico de esta prueba (Tabla III). Los cultivos en frasco fueron inoculados con una suspensión de esporas y cultivados a 29°C sobre dispositivos de agitación durante 18 días.

## T A B L A      I I I

Efecto del Sustrato en la Capacidad Hidrolítica de la Enzima

Sustrato	mg de glucosa	
	Producidos	% Hidrólisis
AF	0.15	0.30
AA	0.30	0.60
A	0.45	0.90
SF	1.30	2.60
ξ-Cel	1.30	2.60
PF	1.90	3.80

50 mg de sustrato + 1.0 ml del filtrado crudo, se incuban a pH 4.8, temperatura 50°C, durante una hora.

(AF) Algodón en fibras, desengrasado y humedecido.

(AA) Algodón Absorbente, desengrasado.

(A) Avicel, celulosa microcristalina.

(SF) Solka Floc, pulpas sulfíticas.

(ξ-Cel) ξ-Celulosa, fibras de celulosa, no nutritiva. -  
Pulpas sulfíticas con grasa.

(PF) Papel Filtro, Whatman No. 1 cortado en tiras, -  
pulpas sulfíticas.

#### IV.0 SELECCION DEL MICROORGANISMO CELULOLITICO

Muchos hongos son celulolíticos; sin embargo, solamente algunos pocos producen filtrados capaces de degradar una extensa variedad de sólidos celulósicos. En los últimos años se han comparado miles de microorganismos de gradadores de celulosa y cientos de ellos están capacitados a producir la enzima extracelularmente.

En general, los filtrados que presentan mayor actividad son producidos por los microorganismos que crecen más lentamente sobre la celulosa.

El componente  $C_1$  es el encargado de la solubilización de la celulosa nativa, lo que lo convierte en el factor más importante del complejo. Diversos investigadores (6, 11, 13, 25, 31, 33, 47), han logrado comprobar que Trichoderma viride es el mayor productor de un complejo enzimático estable incluyendo al componente  $C_1$ . Aunque algunos otros microorganismos tales como Chrysosporium pruinatum y Penicillium pusillum, también producen filtrados con valores altos del componente  $C_1$ , las enzimas que lo integran son menos estables (Tabla IV). Selby (41), ha realizado estudios muy similares con un buen número de preparaciones de celulasas, concluyendo también que la celulasas de T. viride presenta la más alta actividad sobre el algodón, el cual es el sustrato celulósico más resistente. Comparando los valores de actividad enzimática para  $C_1$  y  $C_x$  de cerca de cien cepas de T. viride, muchas de ellas producen un complejo enzimático muy similar pero en cantidades menores. La cepa QM No. 6a presenta una superioridad notable en sus actividades enzimáticas con respecto a las demás preparaciones probadas (Tabla V). Este es el motivo por el cual las investigaciones recientes centran su atención en T. viride QM No. 6a, así como en sus cepas mutantes.

T A B L A     I V  
Producción de Celulasa por varios Hongos

QM No.	Preparación	$UI \cdot mL^{-1}$	
		(C <sub>1</sub> )	(C <sub>x</sub> )
	Buffer (acetato 0.05M)	0	0
6a	<u>Trichoderma viride</u>	0.0964	9.25
826	<u>Chrysosporium pruinatum</u>	0.0578	12.95
137g	<u>Penicillium pusillum</u>	0.0520	20.35
1224	<u>Fusarium moniliforme</u>	NR	0.64
72f	<u>Aspergillus terreus</u>	0.0096	6.66
806	<u>Basidiomiceto</u>	0.0096	13.87
94d	<u>Stachybotrys atra</u>	0.0019	1.48
B814	<u>Streptomyces sp</u>	0.0013	7.40
38g	<u>Fusarium roseum</u>	0.0013	1.85
381	<u>Pestalotiopsis westerdijkii</u>	0.0013	11.10
460	<u>Myrothecium verrucaria</u>	0.0007	5.18
459	<u>Chaetomium globosum</u>	0.0003	0.09

Los cultivos crecieron sobre Solka Floc, excepto Penicillium pusillum 137g que creció sobre algodón.

NR = No reportado.

## T A B L A V

Actividad Celulolítica de algunas Cepas de T. viride

QM No.	UI·ml <sup>-1</sup>	
	(C <sub>1</sub> )	(C <sub>x</sub> )
6a	0.0964	9.25
317	0.0598	5.55
3161	0.0540	3.51
2098	0.0482	3.33
7733	0.0482	3.14
4093	0.0366	1.29
2647	0.0154	2.96

Los Cultivos crecieron sobre Solka Floc al 1.0%.



#### IV.1 CARACTERISTICAS GENERALES DEL GENERO TRICHODERMA

Es un hongo imperfecto, los conidios se producen en globos viscosos, los conidióforos se ramifican irregularmente, siendo las ramas finales verdaderas filídes, de las que las conidias se van separando sucesivamente. En la literatura se encuentran a menudo 3 nombres: *T. lignorum* (Tode), *T. koningi* (Oudemans) y *T. viride* (Pers. ex Fr.), que según algunos autores se diferencian entre sí por el color de las colonias y el tamaño de las esporas. Sin embargo, Bisby (citado por Smith, 44) ha examinado un gran número de cepas sin observar ninguna diferencia neta entre ellas. El considera que el género es monotípico y que el nombre correcto de la especie debe ser *T. viride*.

Se encuentra corrientemente en los restos de la madera y está también muy difundido por el suelo, especialmente en los terrenos muy húmedos, donde puede parasitar a otros hongos. Weidling (citado por Smith, 44), demostró que *T. viride*, produce una sustancia, la gliotoxina, que inhibe el desarrollo de las especies de *Pythium*, responsables de enfermedades en algunas plantas de interés económico.

*T. viride* crece bien en todos los medios comunes al desarrollo de los hongos, las colonias se desarrollan con rapidez, formando una capa micelial algo delgada, con manchas irregulares de verde grisáceo que se debe al color de las masas de esporas maduras. Las esporas se producen mejor en el extremo superficial de los cultivos en tubos inclinados y las masas de esporas de algunas especies conservan durante cierto tiempo el color blanco, volviéndose verdes tardíamente. En algunos cultivos el reverso del medio es amarillo brillante o pardusco y algunas cepas, desprenden un intenso olor a nuez de coco. Las cabezas esporóforas, frágiles y esféricas, contienen de 10 a 20 conidias cada una, globosas o ligeramente ovales, de 2.5 a 3 micras de diámetro. El micelio y conidióforo es septado.

## IV.2 INDUCCION DE CELULASAS

Normalmente, una enzima inducible se encuentra tan solo en trazas en las células, pero su síntesis resulta estimulada cuando se incorpora su sustrato al medio de cultivo; la enzima por lo tanto, va a ser requerida para transformar el sustrato en un metabolito que pueda ser utilizado directamente por la célula. La celulasa producida por los hongos es una enzima inducible. T. viride crece fácilmente sobre una gran cantidad de fuentes de carbono, pero la celulasa es producida exclusivamente cuando el microorganismo se desarrolla sobre celulosa, glucanos y sobre algunos oligosacáridos. La Tabla VI nos muestra las diferencias en la actividad enzimática que se presentan cuando T. viride crece sobre diferentes sustratos inductores de celulasa.

La celobiosa actúa como un inductor de celulasa, pero también puede actuar como un inhibidor de la acción de la celulasa (Figura 6). El papel de la celobiosa es complejo, concentraciones altas de ésta (0.5-1.0%) u otra fuente de carbono rápidamente metabolizable como la glucosa o el glicerol, reprimen fuertemente la síntesis de celulasa. Cuando estos azúcares son adicionados en concentraciones que van del 0.2-1.0% a un cultivo de un microorganismo productor de celulasa, se produce la inactivación de la enzima previamente formada. Si el cultivo es joven, la actividad enzimática puede reaparecer después de que el azúcar haya sido consumida (Figura 7). Sin embargo, cuando T. viride está creciendo sobre celulosa insoluble o cuando la celulasa está siendo inducida sobre niveles bajos ( $10^{-3}M$ ) de un inductor altamente activo tal como Sophorosa, la adición de pequeñas cantidades (0.1%) de sustratos fácilmente metabolizables como glucosa, glicerol, o peptona, tienen un efecto marcadamente positivo en los niveles de producción de celulasa.

La lactosa, (B(1-4) galactósido, induce la formación de celulasa en T. viride y en algunos otros hongos.

T A B L A      VI  
 Inducción de Celulasa en T. viride

Inductor	UI ml <sup>-1</sup> Inducidas por mg de Inductor	
	(C <sub>1</sub> )	(C <sub>x</sub> )
Algodón en fibras	0.0169	0.795
Solka Floc	0.0169	1.850
Papel Filtro	0.0135	1.572
Celobiosa	0.0048	0.703
Sophorosa	2.3148	518.000
Lactosa	0.0019	0.888
Glucosa	0	0
Almidón	0	0
Glicerol	0	0

FIG. 6

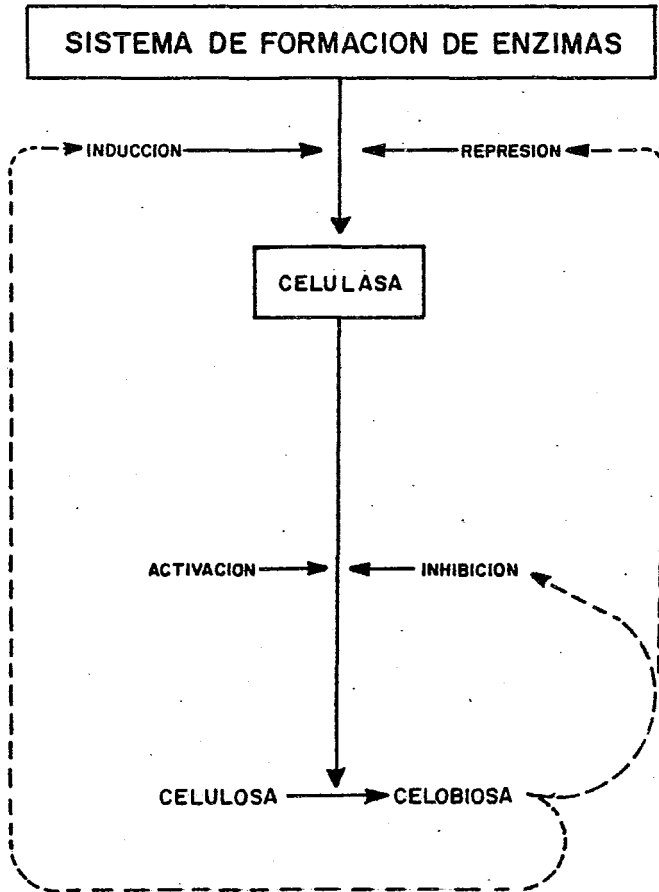
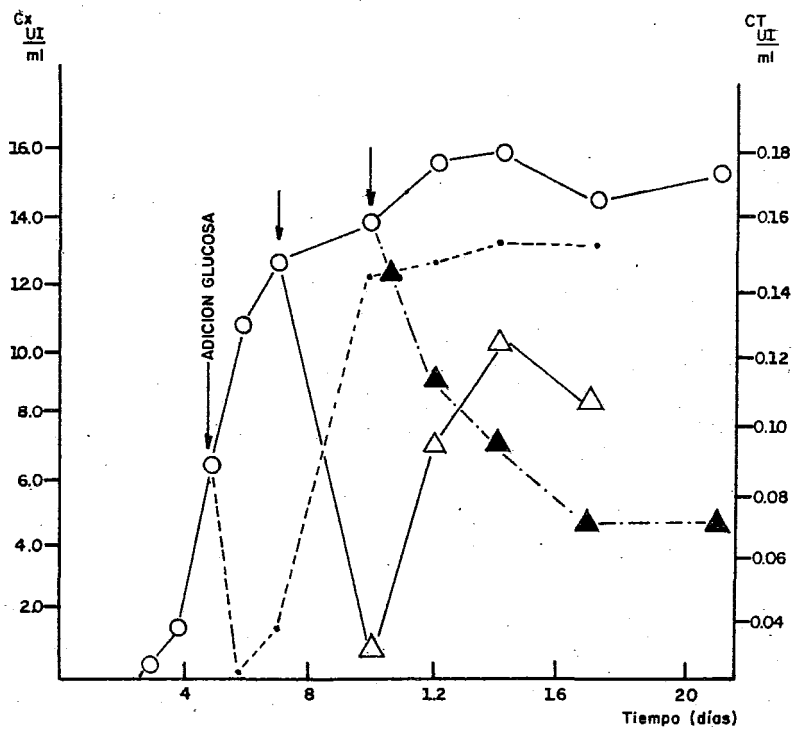


FIG. 7



○—○ CONTROL DEL CRECIMIENTO SOBRE SOLKA FLOC AL 1.0%

•-•-•-• ADICION DE GLUCOSA (0.5%) A LOS 5 DIAS

△—△ ADICION A LOS 7 DIAS

▲-▲-▲-▲ ADICION A LOS 10 DIAS

Sophorosa, B(1-2) glucósido, es un poderoso inductor de celulasa únicamente para T. viride. Estos dos azúcares son los únicos conocidos como inductores de celulasa que no presentan enlace B(1-4) glucosídico (25,37).

### IV.3 EFECTO DE ADITIVOS EN LA PRODUCCION DE CELULASA POR T. VIRIDE

Cuando T. viride crece sobre sólidos celulósicos, - es conveniente adicionar al medio de cultivo pequeñas cantidades de alguna fuente soluble de carbono, esto se hace con el fin de obtener rápidamente una alta producción de biomasa, alcanzándose así rendimientos de celulasa mayores en tiempos más cortos. La peptona, así como otros derivados protéicos proporcionan los resultados más satisfactorios (Tabla VII).

La concentración de celulosa va a depender del grado de susceptibilidad que presente el sustrato, así como de la concentración del aditivo en el medio.

La concentración óptima de peptona es de 0.05-0.2%, con concentraciones de 0.5% se inhibe fuertemente la producción de celulasa (Figura 8). La actividad máxima sobre Papel Filtro alcanzada es de  $0.374 \text{ UI} \cdot \text{ml}^{-1}$ , utilizando como sustrato celulósico Solka Floc al 1.0% y peptona al 0.2% como aditivo. La actividad máxima sobre CMC obtenida es de  $28.49 \text{ UI} \cdot \text{ml}^{-1}$ , empleando Solka Floc al 1.0% y Proflo (Harina de semilla de algodón) al 1.0% (Figura 9). El Tween 80 (Polioxi etilen sorbitan monooleato), también es un estimulador de la producción de celulasa, particularmente cuando la peptona se encuentra presente. Los valores de actividad que se obtienen al utilizar Solka Floc al 1.0% y como aditivo una mezcla de peptona-Tween 80 ambos al 0.1% son:  $0.344 \text{ (UI} \cdot \text{ml}^{-1}) \text{ PF}$  y  $21.83 \text{ (UI} \cdot \text{ml}^{-1}) \text{ Cx}$  - (6, 20, 22, 25, 37).

## T A B L A VII

Efecto de Aditivos en la Producción de Celulasa por T. vi  
ride

Aditivo (0.05%)	UI·mL <sup>-1</sup>	
	(C <sub>t</sub> )	(C <sub>x</sub> )
Sin Aditivo	0.094	8.51
Antiespumante Dow Corning	0.101	7.03
Glucosa	0.096	14.06
Glicerol	0.083	5.92
Peptona	0.176	11.84
Proflo	0.167	18.50
Extracto de levadura	0.152	15.54
Hidrolizado de caseína	0.155	13.69
Extracto de soya	0.102	11.10
Fitona	0.172	14.43

Los cultivos se mantuvieron en incubación durante 18 días a 29°C, el sustrato celulósico fue Solka Floc al 1.0%.



FIG. 8

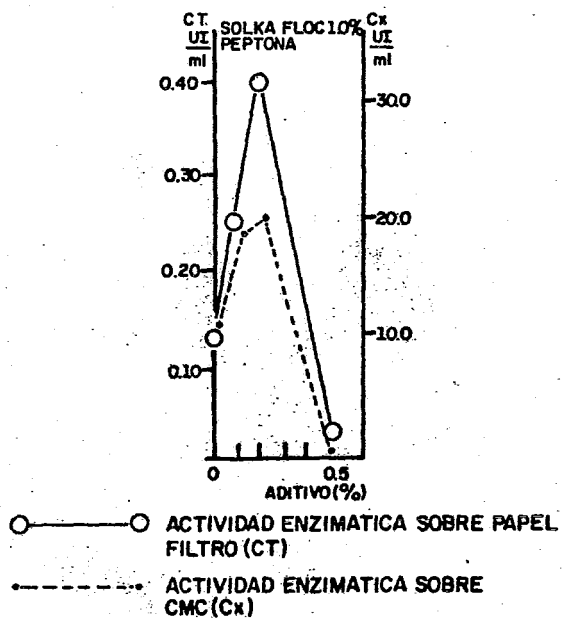
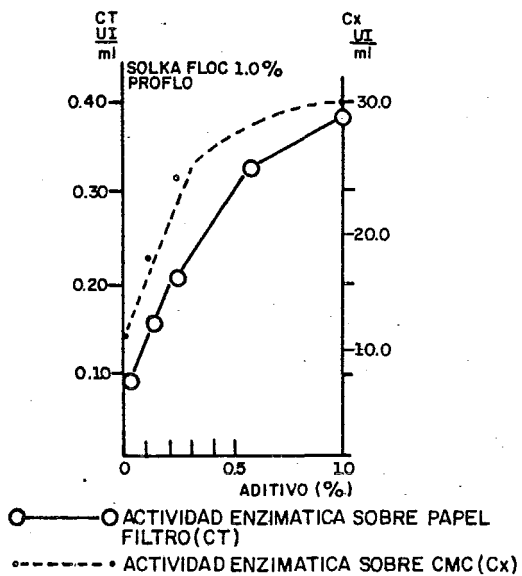


FIG. 9



## V.0 PROTEINA UNICELULAR

Proteína unicelular es un término genérico que se aplica al concentrado proteínico obtenido de microorganismos unicelulares (hongos, levaduras, bacterias, algas), los cuales pueden cultivarse en una gran variedad de medios relativamente abundantes y baratos, tales como:

- (1) Melazas de la fabricación del azúcar o de la hidrólisis del almidón.
- (2) Aguas sulfitadas, subproducto del tratamiento con sulfito de la pulpa en la industria papelera.
- (3) Hidrolizado ácido de la madera.
- (4) Subproductos agrícolas (paja de cebada, de trigo, de avena, de maíz, etc.), hidrolizados de alimentos amiláceos (granos y patatas), subproductos de la industria frutera (hidrolizados de la corteza de los frutos cítricos).
- (5) Residuos del petróleo.
- (6) Aguas negras.

El poco tiempo que los microorganismos unicelulares necesitan para su reproducción, es una gran ventaja.

Debido a que la P.U. representa un nuevo tipo de alimento, los gobiernos aún tratan de regular su consumo. El grupo Asesor de Proteínas de la FAO ha establecido al respecto una serie de estrictos y complejos protocolos.

La P.U. contiene alrededor del 50% de aminoácidos, el porcentaje restante está constituido de ácidos nucleicos (RNA y DNA), carbohidratos, grasas, agua, fósforo, potasio y fibra. La proporción de estos componentes es variable, pues depende del microorganismo utilizado así como del sustrato seleccionado para su desarrollo. El tér-

mino proteína verdadera nos indica la proporción de amino ácidos que se encuentran en la P.U. La composición de algunas proteínas unicelulares típicas aparecen en la Tabla VIII.

## V.1 ELIMINACION DEL CONTENIDO DE ACIDOS NUCLEICOS

La P.U. destinada al consumo humano debe ofrecerse como un producto sumamente refinado, por lo cual es necesario eliminar su alto contenido en ácidos nucleicos. Los seres humanos pueden ingerir como máximo dos gramos diarios de ácidos nucleicos, pues éstos se convierten en ácido úrico cuando son asimilados por el organismo. Si la ingestión de ácidos nucleicos es muy elevada, pueden incrementarse peligrosamente los niveles de ácido úrico en el cuerpo y desarrollar cálculos biliares.

La P.U. destinada al consumo de animales no requiere la separación de los ácidos nucleicos.

La remoción de los ácidos nucleicos puede lograrse mediante la hidrólisis de la biomasa, la P.U. así obtenida por lo general se somete a tratamientos para elevar su concentración, mejorar su digestibilidad, así como para proporcionarle sabor y textura agradable.

T A B L A VIII

Composición de Proteínas Unicelulares Típicas

Organismo	Sustrato de crecimiento	Proteína bruta (%)	Proteína verdadera (%)	Lisina (%)	Metionina (%)	Grasa (%)
Bacterias	Metanol	80	65	5.8	2.2	8
	Metano	60	50	4.3-	3.0	10
Levaduras	Parafinas	60	53	7.4	1.8	9
	Kerosinas	69	60	7.8	1.6	2
	Etanol	54	45	6.7	1.5	6
Algas	CO <sub>2</sub>	45-60	45-50	4.6	1.4	5
Hongos	Carbohidratos	35-50	30-40	6.5	1.5	5

Fuentes convencionales de Proteínas

Harina de Pescado	60-65	50-60	7.0	2.6	7
Harina de Soya	45-50	40-45	6.5	1.4	1.5

## V.2 PROCESO GENERAL PARA PRODUCIR PROTEÍNA UNICELULAR

En general, la Proteína Unicelular se obtiene mediante un proceso en el que el fermentador es la clave (Fig. 10). La función del fermentador es proporcionar un ambiente óptimo para el proceso microbiológico. Su diseño debe incluir un sistema de agitación de la biomasa; además se suministra agua, sustrato, nutrientes, oxígeno y alguna fuente de nitrógeno. Todos los insumos deben ser esterilizados previamente para evitar la contaminación del cultivo.

Como la fermentación es exotérmica, debe contarse con un sistema de refrigeración que mantenga regulada la temperatura óptima de crecimiento.

El aire esterilizado mediante filtración pasa por una válvula que no permite el retroceso, penetrando al medio de cultivo por un inyector de aire situado en el fondo del fermentador. La velocidad con la que el oxígeno se transfiere a los organismos, es uno de los factores que limitan el crecimiento.

En la producción de Proteína Unicelular, se emplea generalmente un proceso que permite retirar en forma continua parte de la biomasa. Para separar los microorganismos del sustrato, se suelen utilizar centrifugas. En la Tabla IX, se muestran los procesos para producir Proteína Unicelular en estado avanzado de desarrollo (4).

## V.3 TRABAJOS REALIZADOS HASTA LA FECHA EN NUESTRO PAIS

Existen varios proyectos cuya finalidad es instalar plantas industriales de Proteína Unicelular para consumo humano y animal. La Comisión Nacional de la Industria Azucarera está por terminar la construcción de una planta piloto para producir levadura a partir de melazas. La em

presa Sosa Texcoco obtiene Proteína Unicelular a partir -  
del alga Spirulina.

Entre los proyectos que serán aplicables exclusiva-  
mente al consumo animal, dos son los que destacan, mismos  
que serán capaces de producir 200,000 toneladas anuales -  
de levadura a partir del metanol. Dichos proyectos se -  
realizan en el Centro de Investigación y de Estudios Avan-  
zados del I.P.N., y en el Instituto Mexicano del Petróleo.

Cabe mencionar un tercer programa de investigación  
destinado en este caso al consumo humano, el cual está -  
planeado para producir de 8,000 a 20,000 toneladas anua--  
les de levadura a partir de melazas. Este proyecto se -  
lleva a cabo en la Universidad Autónoma Metropolitana.

## T A B L A IX

Procesos para Producir Proteína Unicelular en estado avanzado de desarrollo

Sustrato de crecimiento	Organismo	Compañía (país)
Metanol y anteriormente parafinas	Levaduras (o bacterias)	British Petroleum (Italia)
		Daiippon Ink (Japón)
		Kanegasuchi (Japón)
		Liquichimica (Italia)
Kerosinas	Levaduras (o bacterias)	URSS
		British Petroleum (Francia)
		Chinese Petroleum (Taiwan)
Metanol	Bacterias	ICI (Reino Unido)
	Levaduras	Hoechst y Unde (Alemania Federal)
Metanol	Levaduras	Mitsubichi Gas Chemical (Japón)
		Mitsui Toatsu (Japón)
		Roniprot (Rumania)
		Amoco (Estados Unidos)
Etanol	Levaduras	Kojetin (Checoslovaquia)
		Mitsubichi Petrochemical (Japón)
		Exxon/Nestlé (Suiza)
Etanol	Bacterias (o levaduras)	
	Bacterias	Shell (Holanda)
Azúcares	Hongos	Tate & Lyle (Reino Unido)
Almidones y carbohidratos	Hongos	Rank, Hovis, McDougal/Du Pont (Reino Unido-Estados Unidos)
Celulosa	Bacterias (o levaduras)	Finnish Paper and Pulp (Finlandia)
		General Electric (Estados Unidos)
		LSU/Bechtel (Estados Unidos)
CO <sub>2</sub>	Algas	IFP (Francia)
		Sosa Texcoco (México)



## VI.0 SELECCION DEL MATERIAL CELULOSICO

El costo y disponibilidad de la materia prima son de suma importancia. Una materia prima barata no tendrá utilidad, si su disponibilidad es limitada.

Para incrementar la velocidad de la degradación enzimática del material celulósico, es necesario aplicarle un tratamiento previo con el fin de eliminar la estructura del complejo celulosa-lignina. Por lo que un producto agrícola de desecho abundante tampoco servirá, si el tratamiento que se emplea en su deslignificación es costoso.

Entre los residuos agrícolas que presentan en su composición gran cantidad de material celulósico y que pueden ser utilizados como materia prima en fermentaciones celolíticas, se encuentran:

1. Fibra de peciolo del plátano.
2. Fibra de piña.
3. Maguey de tequila.
4. Rastrojo de maíz.
5. Paja de garbanzo.
6. Paja del arroz.
7. Paja de la avena.
8. Paja del trigo.
9. Paja del centeno.
10. Paja de la cebada.
11. Henequén.
12. Bagazo de caña de azúcar.

Los mejores rendimientos en el crecimiento de microorganismos celolíticos han sido obtenidos con la utilización de la paja de cebada, por lo que centraremos principalmente nuestro estudio en ella.

## VI.1 COMPOSICION Y VALOR DE LA PAJA DE CEBADA

Conforme van madurando los cereales menores, una gran parte de los principios nutritivos de mayor valor emigra de las hojas y tallos y se acumula como reserva en las semillas que están madurando. En consecuencia, la paja que está formada por los tallos y hojas, sin semillas, es pobre en proteínas, almidón y grasa, mientras que su contenido en celulosa y lignina es elevado.

La paja tiene mucho menor valor nutritivo que el heno preparado con las mismas plantas antes de que maduren. Además, la paja es mucho menos apetecida por los animales que un buen heno.

La paja de cebada es muy pobre en proteínas digeribles, ésta es la causa por lo que no es incluida en las raciones alimenticias del ganado.

## VI.2 CARACTERISTICAS GENERALES DE LA PAJA DE CEBADA

La cebada, que ocupa el quinto lugar en importancia entre las cosechas de grano en México, es el cereal que más se cultiva en el mundo. En nuestro país se siembran anualmente alrededor de 300 mil hectáreas. Para su cultivo, las tierras arcilloarenosas son las más adecuadas, sobre todo las mediocompactas, tendiendo a ligeras, drenadas y calientes; los terrenos fríos y demasiado húmedos son menos apropiados. La cosecha se adapta especialmente a aquellas regiones de verano fresco donde el suelo no es demasiado arenoso, pero está bien drenado.

La cebada es una gramínea que se siembra fundamentalmente para la producción de grano; enormes volúmenes del mismo alimentan las muchas fábricas de cerveza, otros volúmenes fuertes lo absorben las fábricas de alimentos balanceados para los animales.

La composición química de la paja de cebada es la siguiente: Celulosa (40%), Pentosa (31%), Lignina (17%), Proteínas (3%), Cenizas (4%), Otros (5%).

### VI.3 DESLIGNIFICACION DEL MATERIAL CELULOSICO

Para incrementar la velocidad de la degradación enzimática, es necesaria la deslignificación previa del material celulósico mediante el empleo de tratamientos mecánicos, físicos o químicos.

Entre los tratamientos mecánicos la molienda es la más importante. El efecto de ésta se ha investigado en la hidrólisis enzimática sobre Solka Floc (10, 27), la molienda también ha sido utilizada por Updergraff en su trabajo con Myrothecium verrucaria creciendo sobre papel periódico (48). Los métodos físicos incluyen calentamiento alrededor de 200°C, así como tratamientos fotoquímicos con  $\text{NaNO}_2$  y luz ultravioleta.

Sin embargo, los tratamientos químicos son los más comúnmente usados. Entre los tratamientos que han tenido mayor relevancia podemos citar a los siguientes:

- a) En los procesos Beckman la paja es tratada con una solución de  $\text{NaOH}$  al 1.4%.
- b) Callihan y Dunlap (citado por Peitersen, 36), utilizan una solución de  $\text{NaOH}$  caliente en el tratamiento del material celulósico en su proceso de producción de proteína unicelular.
- c) Han y Callihan (14), describen el efecto del tratamiento de la paja de arroz con  $\text{NH}_3$  al 5.2% y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 50% en el crecimiento de diversas especies de Cellulomonas.

- d) Toyama y Ogawa (47), efectúan la deslignificación - tratando primeramente al material celulósico con - una solución de NaOH al 1.0% y posteriormente es la vado y secado.

En la mayoría de estos pretratamientos se utilizan enormes volúmenes de agua para el lavado del material, es to puede causar tanto pérdidas en la materia seca, así co mo, contaminación del agua utilizada. Además, el secado del material implica un grave incremento en el costo fi nal del proceso. Estas desventajas son anuladas en la mo dificación realizada por Peitersen del tratamiento que em plea el método FHI para sus procesos en seco (36, 37). Es te método fue elaborado originalmente con el fin de mejo rar la digestibilidad de la paja de cereales para su uti lización como forraje. El método FHI, consiste prima ramente en rociar a la paja con una solución de NaOH al 40% (5-6 Kg de NaOH/100 Kg de paja) y posteriormente es pre nsada en bloques bajo presión elevada. La modificación - propuesta por N. Peitersen (método Peitersen) utilizando paja de cebada, consiste en el tratamiento de ésta con -- NaOH al 5.7% y posterior molienda hasta pasar a través de una malla No. 40. Finalmente, el producto se seca a 105° C durante 24 horas.

## VII.0 ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA APLICABILIDAD DE LA PAJA DE CEBADA DESLIGNIFICADA MEDIANTE EL METODO PEITERTSEN, EN EL DESARROLLO DE MICROORGANISMOS CELULOLITICOS

Se realizaron una serie de investigaciones en relación al pretratamiento de deslignificación de la paja de cebada propuesto por Peitersen, para probar la aplicabilidad de la paja así tratada en el crecimiento de microorganismos celulolíticos. Todas ellas concuerdan en sus resultados, encontrando un marcado efecto positivo en la producción de enzima en comparación con lo obtenido al utilizar paja sin tratar. También logró probarse que no es necesaria la eliminación de la NaOH, pues no provoca ningún efecto inhibitorio en la producción de enzima ni en el crecimiento del microorganismo.

Los estudios se llevaron a cabo con el hongo Trichoderma viride QM6a y QM9123 (una mutante de la QM6a). Para la comparación del pretratamiento se probaron tres preparaciones, las cuales son:

- a) Paja sin tratar.
- b) Paja tratada con NaOH al 5.7% (método Peitersen), - descrita como paja NaOH.
- c) Paja tratada con NaOH al 5.7% y posterior extracción de la NaOH con agua a 115°C durante 15 minutos. A continuación se deshumedece al vacío a 40°C. Esta preparación se mencionará como paja lavada.

Las preparaciones antes de su empleo se someten a molienda hasta pasar a través de una malla No. 40 y por último se secan a 105°C durante 24 horas.

El medio necesario para que T. viride produzca altos niveles de celulasa en cultivo agitado deberá estar compuesto de sales minerales, alguna fuente de carbono soluble (como aditivo), así como de una adecuada concentra-

ción del sólido celulósico. El medio salino que cumple con todo lo anteriormente mencionado y que a través de los años ha aportado los mejores resultados es el descrito por Reese (37), cuya composición es la siguiente:

S a l e s		Solución de elementos traza	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.0 g	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.56 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.00 g
Urea	0.3 g	$\text{ZnCl}_2$	1.67 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.3 g	$\text{CoCl}_2$	2.00 g
$\text{CaCl}_2$	0.3 g	Agua destilada	
		aforar a	1 litro

#### Solución de elementos

traza	1.0 ml
Agua destilada	
aforar a	1 litro

El medio salino descrito, está preparado para ser utilizado a una concentración de sustrato celulósico al 1.0%.

El medio salino se suplementa mediante la adición de pequeñas cantidades de peptona y glucosa.

Los experimentos se efectuaron en frascos para cultivo agitado de 500 ml de capacidad, el volumen de trabajo fue de 100 ml, las preparaciones fueron inoculadas con una suspensión de esporas (5 ml) de 4-6 días de crecimiento en cultivo agitado con el medio salino y paja lavada al 1%. La incubación de las preparaciones fue a una temperatura de 27°C, a un pH de 4-4.5 y una agitación de 200 rpm.

Para la comparación de la eficiencia de las preparaciones se determinó la actividad celulolítica sobre PF. En la Tabla X, se dan las condiciones experimentales, así como los rendimientos máximos de enzima para las dos cepas (Figura 11).

Se observa claramente que la cepa QM 9123 es la que mejor actúa sobre todas las preparaciones, también es claro el efecto producido por el tratamiento con NaOH en la producción de enzima. Aparentemente el lavado de la paja disminuye el rendimiento de producción de enzima.

Este tipo de estudios dieron la pauta a nuevas investigaciones que tratan de dilucidar las condiciones óptimas de cultivo para la producción de altos niveles de enzima para su posterior utilización en la obtención de P.U. de gran calidad.

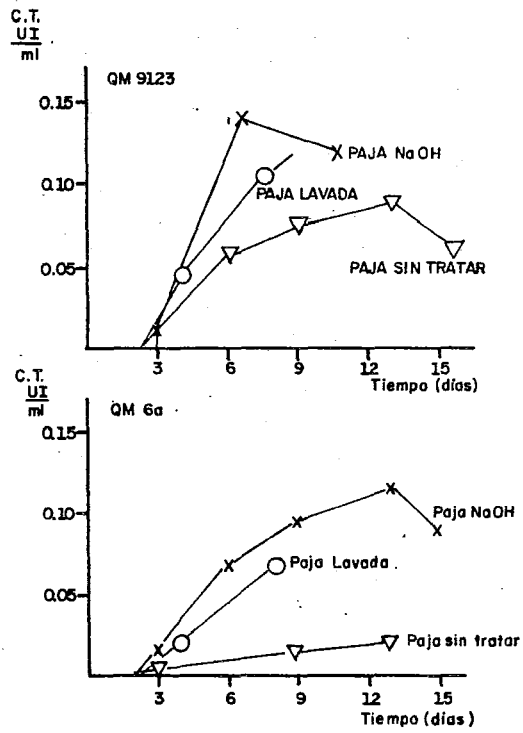
## T A B L A X

Actividad Celulolítica presente en Trichoderma viride al crecer sobre paja al 1%

Tipo de Paja	Cepa QM	Peptona (%)	Rendimiento má- ximo de enzima (U.I. ml <sup>-1</sup> )PF	Día de máximo rendimiento
Sin tratar	6a	0.050	0.035	13
NaOH	6a	0.050	0.113	12
Lavada	6a	0.10	0.046	10
Sin tratar	9123	0.050	0.074	13
NaOH	9123	0.050	0.130	6
Lavada	9123	0.10	0.120	9



FIG. 11



## VIII.0 ESTUDIOS FERMENTATIVOS PARA LA PRODUCCION DE ALTOS NIVELES DE ENZIMA

Los siguientes estudios fueron realizados con el fin de dilucidar las concentraciones óptimas de paja y de glucosa/peptona, necesarias para incrementar el rendimiento en la producción de celulasa.

Para poder seguir detalladamente el curso de las fermentaciones celulolíticas, es necesario contar con las técnicas analíticas adecuadas que nos proporcionen resultados rápidos y altamente confiables. Las determinaciones analíticas más empleadas son:

- a) Medición de la Actividad Celulolítica sobre papel - filtro según el método descrito por Mandels y Weber.
- b) Medición de Azúcares Reductores como glucosa por el método DNS.
- c) Examen Cualitativo de la composición de azúcares en el mosto. Se efectúa mediante cromatografía en papel. El sistema de solventes es n-butanol: piridina: agua 6:4:3 v/v, los azúcares reductores se detectan mediante inmersión de la cromatoplaca en  $\text{AgNO}_3$ .
- d) El nitrógeno se determina por el método de Kjeldahl y la proteína se calcula multiplicando el N x 6.25.
- e) La producción de  $\text{CO}_2$  durante la fermentación se mide volumétricamente. El análisis consiste en recolectar en un matraz que contenga 10 ml de una solución saturada de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , dos litros del aire consumido por la fermentación, a una velocidad de un litro por minuto. El matraz se agita periódicamente hasta que todo el  $\text{CO}_2$  haya sido absorbido (2 hr) - por el  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , formándose  $\text{BaCO}_3$  que precipita. El  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  no combinado se titula con  $\text{HCl}$  0.025 N, utilizando fenolftaleína como indicador. Una titula-

ción en blanco de 10 ml de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  proporciona el valor de referencia del cual el  $\text{CO}_2$  puede calcularse:

Volumen gastado de HCl en la titulación de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  - Volumen gastado de HCl para titular el  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  residual = Volumen de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  convertido en  $\text{BaCO}_3$ .

$$22/2 = \frac{\text{mg de } \text{CO}_2}{\text{min} \cdot \text{l}}$$

Para conocer la verdadera producción de  $\text{CO}_2$  durante la fermentación, es necesario restarle a los mg de  $\text{CO}_2/\text{min} \cdot \text{l}$  contenidos en el aire saliente (consumido) los mg de  $\text{CO}_2/\text{min} \cdot \text{l}$  contenidos en el aire entrante.

Los estudios se llevaron a cabo únicamente con la cepa de *T. viride* QM 9123, y como sustratos paja NaOH y paja NaOH lavada. Los cultivos se mantienen en dextrosa agar a  $4^\circ\text{C}$  y se resiembran cada dos meses. Se emplearon fermentadores de 5 litros de capacidad, el volumen de trabajo es de 3.5 litros. El aire estéril se introduce por debajo del agitador. El fermentador cuenta con control automático de temperatura, así como de electrodos para el registro del pH, el cual debe mantenerse entre 4-4.5. Las variaciones fuera de este rango se corrigen mediante la adición de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4N o NaOH 4N según sea el caso. El medio salino descrito por Reese es suplementado con pequeñas cantidades de glucosa y peptona. Las preparaciones se inocularon con una suspensión de esporas de 4-6 días de crecimiento en cultivo agitado con el medio salino y paja lavada al 1%. Las condiciones de cultivo para 4 grupos de fermentaciones que nos ejemplifican satisfactoriamente este estudio se muestran en la Tabla XI.

Los valores máximos de enzima y proteína unicelular alcanzados por los 4 grupos se dan en la Tabla XII y en las Figuras 12, 13, 14 y 15 los resultados se muestran gráficamente.

T A B L A      X I

Estudios Fermentativos con Trichoderma viride creciendo sobre paja

Exp. No.	Tipo de paja	Concentración (%)	Glucosa/peptona (%)	Agitación (rpm)	Aereación (v/v/min)
1	Lavada	1	0.10/0.05	200	0.7
2	Lavada	1	0.05/0.01	350	0.7
3	NaOH	1	0.05/0.01	300	0.7
4	NaOH	2	0.05/0.01	300	0.7

T A B L A      X I I

Producción de Celulasa y Proteína Unicelular por Trichoderma viride  
al crecer sobre paja

Exp. No.	Rendimiento máximo de enzima (U.I. ml <sup>-1</sup> ) PF	Día de máximo rendimiento	Rendimiento máximo de proteína (mg/ml)	Día de máximo rendimiento
1	0.092	9	1.44	3
2	0.130	4.5	1.84	2
3	0.232	9	0.90	3.5
4	0.278	9.5	2.66	6

FIG. 12

Fermentación de Paja Lavada al 1% por T. viride.  
Agitación 200rpm.

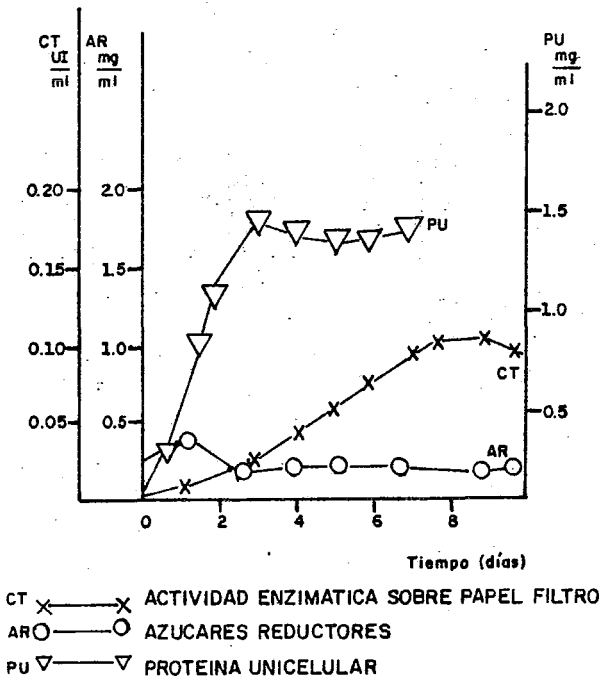


FIG. 13

Fermentación de Paja Lavada al 1% T. viride.  
Agitación 350 rpm.

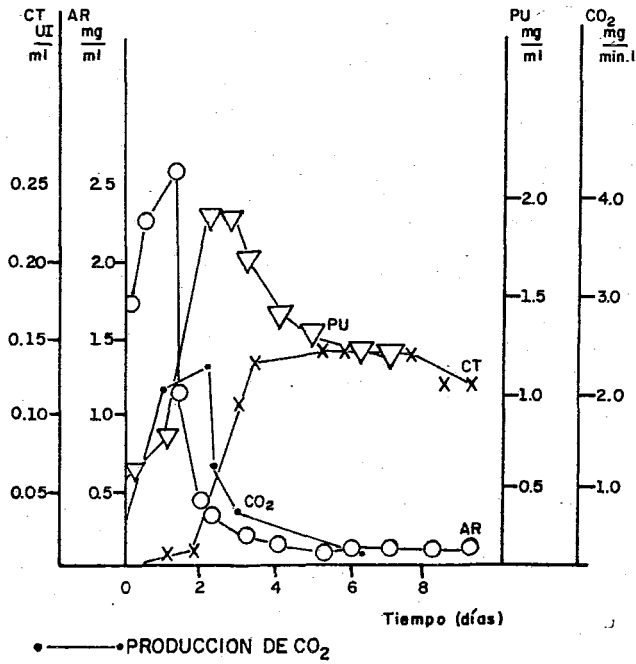


FIG. 14

Fermentación de Paja NaOH al 1% por T. viride.  
 Agitación 300rpm.

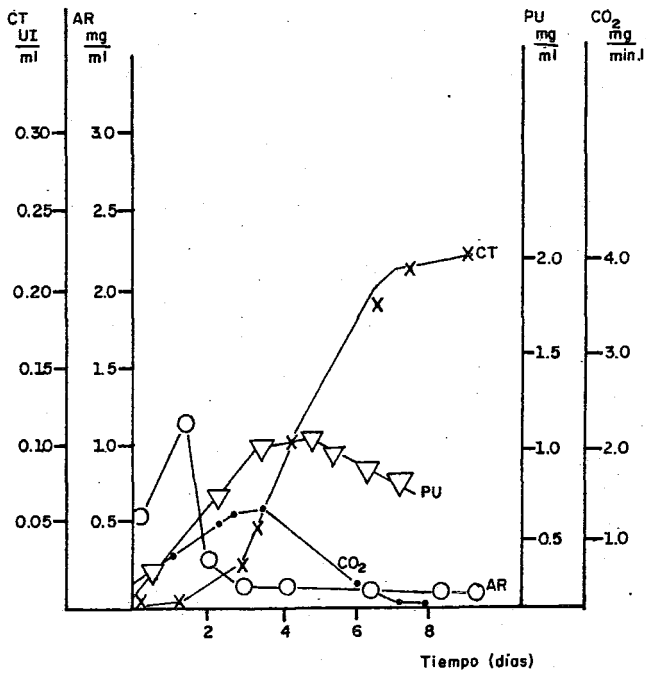
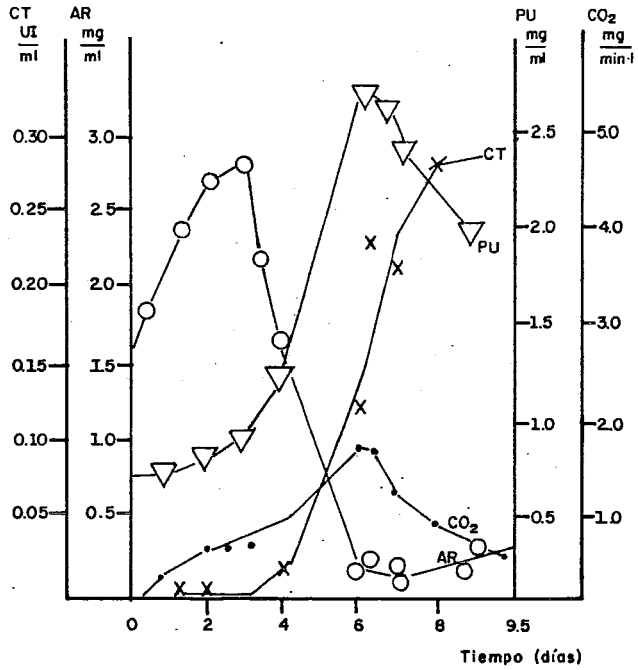




FIG. 15

Fermentación de Paja NaOH al 2% por T. viride  
Agitación 300 rpm.



Comparando los experimentos Nos. 1 y 2, observamos que el hecho de aumentar la agitación de 200 a 350 rpm, - provoca considerables incrementos en los rendimientos. Es to es explicable en parte por un acrecentamiento en la -- eficacia de la aereación, ya que al aumentar la potencia de la agitación se provoca una disminución en el tamaño - de las burbujas de aire y con ello un aumento en el área de la interfase gas-líquido, acelerándose la disolución - del oxígeno. Y por otro lado impide la formación de bol- sas de medio de cultivo estancado.

Los experimentos Nos. 3 y 4 se efectúan bajo la mis- ma agitación (300 rpm), pero a diferentes concentraciones de paja tratada con NaOH. Los rendimientos en la produc- ción de enzima son mucho mayores, siendo más alto en el - experimento No. 4, el cual posee una concentración doble de paja.

Una característica común es la gran cantidad de azú- cares reductores (1-3 mg/ml) que se liberan dentro de los primeros días. El examen de éstos por cromatografía en - papel indican la presencia de glucosa, xilosa, arabinosa y únicamente pequeñas cantidades de celobiosa.

El porcentaje de proteína unicelular contenido en - la materia seca va del 21 al 25%, que comparado con los - valores obtenidos por otros investigadores (que utilizan diferentes microorganismos y sustratos celulósicos), apa- rentemente es bajo. Sin embargo, hay que hacer notar el bajo contenido en lignina de los sustratos celulósicos - que emplean, lo que los convierte en sustratos casi com- pletamente degradables. Tal es el caso de los estudios - efectuados por Crawford (5), en los que obtiene un porcen- taje de proteína unicelular del 30%, utilizando para ello un actinomiceto termofílico creciendo sobre pulpas de ce- lulosa purificadas. Estas pulpas son utilizadas en la in- dustria papelera y contienen únicamente alrededor del 10% de lignina, lo cual explica el porcentaje tan alto degra- dable (88.6%) que presenta dicho sustrato. Otro ejemplo podemos encontrarlo en la fermentación celulolítica que -

utiliza Cellulomonas y bagazo (citado por Peitersen, 36), aquí el producto contiene 46% de proteína unicelular. Sin embargo, las fibras de celulosa no susceptibles al pretratamiento utilizado en este proceso son separadas previamente a la fermentación.

## IX.0 PRODUCCION DE CELULOSA Y PROTEINA UNICELULAR A PARTIR DE LA MEZCLA DE CULTIVOS DE T. VIRIDE Y UNA LEVADURA

El impedimento más importante para la aplicación industrial de las fermentaciones celulolíticas para la producción de proteína unicelular, ha sido el tiempo tan largo necesario para su ejecución. Sin embargo, este problema puede ser superado mediante el conocimiento extenso de los parámetros de fermentación junto con un pretratamiento adecuado de la paja.

Muchos experimentos han sido efectuados mediante la utilización de monocultivos sin lograr ninguna reducción considerable en los tiempos de fermentación. El uso de cultivos mixtos abrió el camino para mejorar las fermentaciones celulolíticas. Esta posibilidad fue tomada en cuenta a partir de los procesos Swedish Symba (35, 36), que tienen como principio el crecimiento simbiótico. En estos procesos, la fuente de carbono es el almidón y los dos microorganismos son Endomycopsis fibuliger y Candida utilis. El primero produce las amilasas necesarias para hidrolizar el almidón a glucosa, la cual es utilizada para el rápido crecimiento de C. utilis.

La primera fermentación celulolítica donde se aplicó el crecimiento simbiótico, fue en la fermentación de bagazo con Cellulomonas, incrementándose considerablemente la producción de proteína unicelular cuando se incorpora un segundo microorganismo a la fermentación. Las Cellulomonas degradan la celulosa a celobiosa, la cual es utilizada por un Alcaligenes sp., de esta manera se evita la inhibición de la producción de celulasa por celobiosa (15,45).

T. viride por sí solo es un magnífico productor de Proteína Unicelular. Sin embargo, su excelente capacidad celulolítica puede ser mejor aprovechada si se incorpora otro microorganismo a la fermentación con el fin de aumentar la producción de Proteína Unicelular. T. viride pro-

ducirá las celulasas necesarias para hidrolizar la celulosa a glucosa, la cual será utilizada para el crecimiento del microorganismo altamente productor de Proteína Unicelular de gran calidad.

Los resultados de las fermentaciones experimentales en las que se ha incorporado la levadura Candida utilis, nos indican que los rendimientos en la producción de celulosa y Proteína Unicelular se ven incrementados considerablemente en un menor tiempo, resultados muy similares se obtienen con la levadura Saccharomyces cerevisiae.

Los siguientes estudios se emprendieron con el fin de examinar la producción de celulasa y proteína unicelular en la fermentación de paja de cebada tratada con NaOH, conteniendo T. viride y una levadura.

Las levaduras seleccionadas fueron Candida utilis y Saccharomyces cerevisiae. Su elevado contenido proteico, digestibilidad (80%), riqueza en aminoácidos esenciales, lecitinas, diastasas, vitaminas (especialmente las del complejo B) y ácido fosfórico, las convierte en un alimento de extraordinarias cualidades. Ambas, han venido siendo incorporadas como complemento proteínico en la alimentación del ganado con muy buenos efectos.

Los experimentos se efectuaron en fermentadores similares a los empleados en las fermentaciones que utilizan únicamente T. viride.

Debido a que en estudios anteriores se observó que a concentraciones de paja NaOH mayores al 1%, se obtenían mejores resultados, se optó por probar concentraciones al 2 y al 4%. Este aumento en la concentración del sustrato, provoca que el medio salino tenga que ser modificado, incrementándose de la siguiente manera:

- 1) Para concentraciones de paja al 2%, se utiliza doble cantidad.
- 2) Para concentraciones de paja al 4%, se utiliza cuádruple cantidad (la mitad se añade al comienzo de la fermentación, la otra mitad se divide en 3, añadiéndose una parte al segundo, tercero y cuarto día de la fermentación).

Las condiciones óptimas de cultivo seleccionadas de investigaciones anteriores son: temperatura de 27°C, agitación de 300 rpm, aereación de 0.65 v/v/min, pH de 4.0, concentración de glucosa/peptona de 0.05/0.01%.

El inóculo de T. viride deberá tener de 4 a 6 días

de crecimiento en cultivo agitado con 100 ml del medio salino y 1% de paja sin tratar. El inóculo de la levadura deberá ser de 24 horas de crecimiento en cultivo agitado con 100 ml del medio salino, 1% de glucosa y 0.2% de paja sin tratar. Además, deberá acompañarse de una solución de vitaminas del complejo B compuesta en mg/l de: niacina 25; tiamina 5; pantotenato de Ca 5; riboflavina 2.5; piridoxina 2.5; y biotina 0.020. Esta solución también deberá añadirse al momento de inocular la levadura.

El fermentador primeramente se inocula con T. viride y 24-32 horas más tarde con la levadura.

Para las determinaciones de actividad enzimática total, azúcares reductores, examen cualitativo de la composición de azúcares en el líquido fermentado, nitrógeno y proteína, los métodos analíticos son los mismos que se emplearon anteriormente.

La medición de la producción del  $\text{CO}_2$  durante la fermentación, se siguió con un analizador infrarrojo para gases URAS 2T (Hartman/Braun).

Los análisis de la composición de aminoácidos presentes en la proteína unicelular producida, se ejecutaron (después de la hidrólisis ácida de la proteína) en un autoanalizador de aminoácidos Technicon NC-2.

Los valores máximos de celulasa y proteína unicelular alcanzados por las tres fermentaciones de los cultivos mixtos en prueba, se dan en la Tabla XIII, así como los valores correspondientes para T. viride creciendo solo. En las Figuras 16, 17 y 18, se sigue gráficamente el curso de las fermentaciones de los cultivos mixtos. La proteína unicelular obtenida en estos casos, será la suma de los dos microorganismos.

T A B L A      XIII

Producción de Celulasa y Proteína Unicelular por T. viride y una levadura al crecer sobre paja NaOH

Exp. No.	Concen- tración de la - paja (%)	Levadura incor- porada	Día de ago- tamiento - de azúca- res reduc- tores	Rendimien- to máximo de protei- na (mg/ml)	Día de máximo rendi- miento	Rendimien- to máximo de enzima $\frac{UI}{ml}$ PF (C <sub>x</sub> )	Día de máximo rendi- miento
1	2.0	<u>S. cerevisiae</u>	3.5	2.60	5	0.269	7
2	2.0	<u>C. utilis</u>	3	2.10	4	0.306	8
3	4.0	<u>S. cerevisiae</u>	5	4.60	7	0.296	10
4	2.0		5.5	2.66	6	0.278	9.5
5	4.0		10	3.70	12	0.009	13



FIG. 16

T. viride + S. cerevisiae

Fermentación de Paja NaOH al 2%.

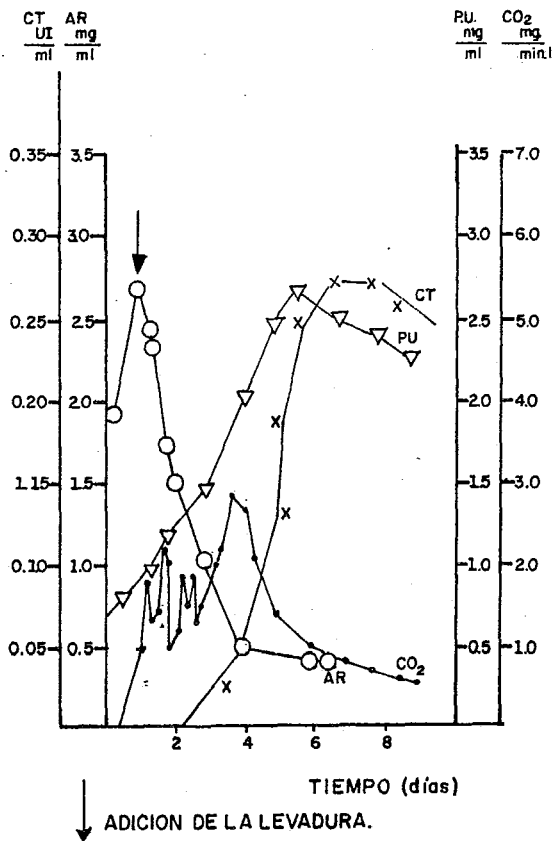


FIG. 17

T. viride. + C. utilis.  
Fermentación de Paja NaOH al 2%.

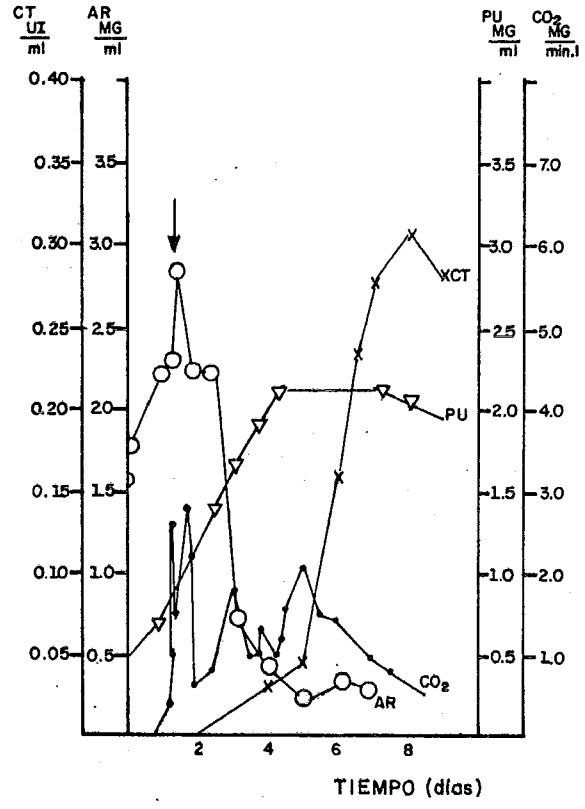
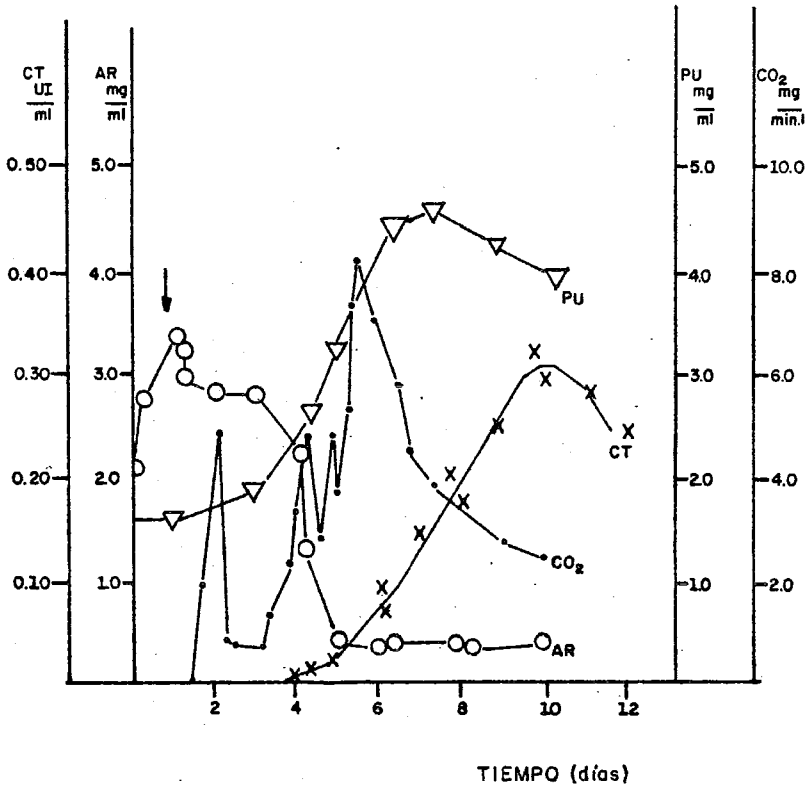


FIG. 18

T. viride + S. cerevisiae  
 Fermentación de Paja NaOH al 4%



Después de la inoculación de *T. viride*, los polisacáridos más susceptibles de la paja son hidrolizados, elevándose bastante los niveles de azúcares reductores, principalmente glucosa y xilosa. La glucosa reprime la producción de celulasa, y no aparecerá en el medio, hasta que la glucosa sea agotada. En las fermentaciones en las que se utiliza únicamente *T. viride*, el agotamiento ocurre entre los días 5-10. En cambio, en los cultivos en que se adiciona la levadura al fermentador, se obtiene una rápida utilización de la glucosa, y la celulasa se produce en un tiempo mucho menor.

Del examen cualitativo de la composición de azúcares en el líquido en fermentación, se aprecia en las cromatoplasmas, que la glucosa es utilizada primeramente. El día de la desaparición de su mancha, coincide con el del abatimiento de los valores de azúcares reductores.

La levadura comienza a crecer pocas horas después de su inoculación. Esto puede verse por el aumento de la producción de  $\text{CO}_2$ , por el incremento en la proteína unicelular, y por el abatimiento de los valores de azúcares reductores. Las variaciones en las curvas de  $\text{CO}_2$ , reflejan marcados cambios en la actividad de la célula, probablemente debido a la utilización de diferentes componentes del sustrato.

El crecimiento de los organismos puede seguirse en el microscopio. La levadura crece aceleradamente dentro de las primeras 24 horas seguidas a su inoculación, y después de tres o cuatro días, el micelio del hongo y las células de levadura alcanzan su máximo crecimiento. Al final de la fermentación el número de células de levadura decrece, debido a la lisis, y únicamente el micelio continúa creciendo. *T. viride* es reportado (47), como productor de enzimas líticas de la pared celular; sin embargo, en este tipo de fermentaciones, estas enzimas no se presentan en cantidades suficientes como para afectar el crecimiento de las levaduras, pero sí aceleran la lisis de las células muertas. La levadura después de su lisis, -

sirve como fuente de compuestos fácilmente metabolizables.

La comparación de la composición de aminoácidos presentes en la proteína unicelular producida por T. viride creciendo individualmente, y creciendo simultáneamente con una levadura (Tabla XIV), nos indica que la presencia de la levadura provoca una mejoría en la concentración de la mayoría de los aminoácidos. No se observa ninguna gran diferencia entre las fermentaciones con C. utilis y S. cerevisiae.

El porcentaje de proteína unicelular contenido en la materia seca va del 21 al 22%, y se estima que del 52 al 67% de paja es metabolizada.

Church y Nash (35), han efectuado investigaciones similares con T. viride creciendo sobre paja de maíz, obteniendo resultados concordantes a los anteriormente señalados. La composición de aminoácidos permanece constante, no obstante las diferentes fuentes de carbono utilizadas.

## T A B L A      XIV

Composición de Aminoácidos presentes en la Proteína Unice-  
lular producida ( g aminoácidos/16 g nitrógeno )

Aminoácido	<u>T. Viride</u> <u>+ C. utilis</u>	<u>T. Viride</u> <u>+ S. cerevisiae</u>	<u>T. Viride</u>
Alanina	5.8	5.7	4.8
Arginina	4.3	3.9	4.0
Ac. aspártico	8.7	8.0	7.8
Ac. glutámico	9.5	9.0	8.0
Glicina	4.7	4.9	4.5
Histidina	1.6	1.8	1.9
Prolina	4.3	4.3	3.8
Serina	4.4	4.6	4.2
Cistina	1.38	1.22	1.45
Metionina	1.68	1.47	1.35
Isoleucina	3.6	3.5	3.5
Leucina	6.1	6.0	5.8
Lisina	4.9	4.6	4.4
Fenilalanina	3.8	3.5	8.7
Tirosina	3.1	2.8	3.3
Treonina	4.8	4.9	4.9
Valina	7.4	6.9	4.4



## CONCLUSIONES

- 1.- La paja de cereales menores, al ser poco aprovechada por su pobre contenido alimenticio, se presenta por su bajo costo y fácil disponibilidad como el tipo de sustrato ideal para el crecimiento de microorganismos celulolíticos.
- 2.- El hongo celulolítico Trichoderma viride, ha demostrado ser el mejor productor del complejo celulósico, al producir filtrados de alta capacidad enzimática, sobre una extensa variedad de fuentes de celulosa.
- 3.- Es necesario el tratamiento previo del material celulósico para eliminar el complejo de celulosa-lignina, incrementándose así la velocidad de la degradación enzimática.
- 4.- El método de deslignificación propuesto por Peitersen en paja de cebada, es aprovechado en el desarrollo de T. viride, pues no provoca ningún efecto inhibitorio en la producción de la enzima ni en el crecimiento del hongo.
- 5.- T. viride por sí solo es un magnífico productor de proteína unicelular; sin embargo, su excelente capacidad celulolítica es aún mejor aprovechada al incorporar un segundo microorganismo a la fermentación, obteniéndose una proteína unicelular de mayor calidad.
- 6.- El proceso biosintético consiste en la utilización del azúcar previamente formado por T. viride, como

sustrato para el crecimiento de levaduras altamente productoras de proteína unicelular de gran calidad.

- 7.- La incorporación de la levadura, genera una rápida utilización de la glucosa (inhibitoria para la producción de la enzima), continuándose la producción de celulasa en un tiempo mucho menor.
- 8.- Mediante el extenso conocimiento de los parámetros óptimos de fermentación, y la inclusión de la levadura, se alcanza una reducción notable en el tiempo de la fermentación.
- 9.- La proteína unicelular obtenida puede emplearse como suplemento en las raciones alimentarias del ganado, o bien, previa eliminación de los ácidos nucleicos, destinarse al consumo humano en el enriquecimiento de alimentos básicos.
- 10.- Los resultados obtenidos a pequeña escala, nos indican que la fermentación puede ser explotada a nivel industrial.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bartolomé, R.C. Técnica de Reacción para la Producción de Celulosa y Lignina. *Ciencia y Desarrollo*. Núm. 33, pp. 235-246. (1980)
- 2.- Bellamy, W.D. Single Cell Proteins from Cellulosic Wastes. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 16, pp. 869-880. (1974)
- 3.- Bonner, J., Varner, J.E. *Plant Biochemistry*. Academic Press. N.Y. (1975)
- 4.- Bourges, H., Luiselli, C. Proteína unicelular: ¿una respuesta al problema de la alimentación? *Información Científica y Tecnológica*. Vol. 1, núm. 3, pp. 5-7. (1978)
- 5.- Crawford, D.L., Kirk, T.K., Harken, J.M. and McCoy E. Protein Production by growing a Thermophile Actinomicete on pulping fines. *Applied Microbiology*. Vol. 25, pp. 322-348. (1973)
- 6.- Enari, T.M., Marckanen, P. Production of Cellulolytic Enzymes by Fungi. *Advances in Biochemical Engineering*. Vol. 1, pp. 1-24. (1977)
- 7.- Ericksson, K.E. New Methods for the investigation of Cellulases. *Advances in Chemistry Series*. Vol. 25, pp. 83-104. (1969)
- 8.- Frazier, W.C. *Microbiología de los Alimentos*. Ed. Acribia Zaragoza. España. (1975)
- 9.- Florez, M.A. *Bromatología Animal*. Ed. Limusa. México. (1975)

- 10.- Ghose, T.K. Effect of ball milling on the enzymatic hidrolisis of Solka Floc. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 11, pp. 239-247. [1966]
- 11.- Gupta, J.K., Dos, N.B., Gupta, Y.P. Effect of Cultural Conditions on Cellulase Formation by *Trichoderma viride*. *Agricultural Biol. Chem.* Vol. 13, pp. 1961-1967. (1972)
- 12.- Greulach, V.A., Adams, J.E. *Las Plantas. Introducción a la Botánica Moderna.* Ed. Limusa-Wiley, S.A. N.Y. pp. 111-114. (1970)
- 13.- Halliwell, G. Solubilization of Native and Derived Forms of Cellulose by Cell Free Microbial Enzymes. *Biochemistry Journal*. Vol. 100, pp. 315-320. -- (1966)
- 14.- Han, Y.W., Callihan, C.D. Production of Cellulase utilizing Bacterium. *Applied Microbiology*. Vol. 27, pp. 159-172. (1974)
- 15.- Han, Y.W., Srinivasan, V.R. Isolation and Characterization of a Cellulose utilizing Bacterium. *Applied Microbiology*. Vol. 16, No. 8, pp. 1140-1145. -- (1968)
- 16.- Huang, A. Enzymatic Hidrolisis of Cellulose to Sugar. *Biotechnology and Bioengineering. Symposium 5.* pp. 245-252. (1975)
- 17.- Hungate, R.E. *La Celulosa en la Nutrición Animal.* Edit. Compañía Continental, S.A. (1975)
- 18.- Jorgensen, A., Hansen, A. *Microbiología de las Fermentaciones Industriales.* Ed. Acribia Zaragoza. España. 7ª Edición. (1980)

- 19.- Jurasek, L.J., Calvin, R. and Whitaker. Formation and Degradation of Cellulosic Fibers. Applied Microbiology. Vol. 9, pp. 131-168. (1962)
- 20.- Katz, M. and Reese, E.T. Production of Glucose by Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Applied Microbiology. Vol. 16, No. 2, pp. 419-420. (1968)
- 21.- Lehninger, A.L. Bioquímica. Edit. Omega, S.A. 1<sup>a</sup> Ed. (1972)
- 22.- Linko, M. An Evaluation of Enzymatic Hidrolysis of Cellulosic Materials. Advances in Biochemical Engineering. Vol. 1, pp. 25-48. (1977)
- 23.- Mandels, M. and Andreotti, R.E. Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. Process Biochem. Vol. 13, pp. 6-15. (1978)
- 24.- Mandels, M., Hontz, L. and Nystrom, J. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 16, pp. 1471-1493. (1974)
- 25.- Mandels, M., Parrish, F.W., and Reese, E.T. Sophorose as Inducer of Cellulase in *Trichoderma viride*. Journal Bacteriology, Vol. 83, pp. 400-408. (1962)
- 26.- Mandels, M., Reese, E.T. Fungal Cellulases and the Microbial decomposition of Cellulosic Fabrics. Applied Microbiology. Vol. 17, pp. 5-20. (1969)
- 27.- Mandels, M., and Weber, J. The Production of Cellulases. Advances Chem. Ser. Vol. 95, pp. 391-414. (1969)
- 28.- Marrow, B., Mazur, A. Bioquímica Básica. 9<sup>a</sup> Ed. - Ed. Internacional, S.A. (1967)

- 29.- Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing sugar. *Analytical Chemistry*. Vol. 31, pp. 426-428. [1959]
- 30.- Mitra, G., and Wilke, C.R. Continuous Cellulase Production. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 17, pp. 1-13. (1975)
- 31.- Montenecourt, B.S., and Eveleigh, D.E. Preparation of mutants of Trichoderma reesei with enhanced cellulase production. *Applied Environ. Microbiol.* Vol. 34, pp. 777-782. (1977)
- 32.- Morrison, F.B. *Alimentos y Alimentación del Ganado*. Ed. Hispano Americana. México. (1975)
- 33.- Nakayama, Tomita, Suzuki, Nisizawa. Partial Proteolysis of some Cellulase Components from Trichoderma viride and the substrate specificity of the modified products. *Journal Biochemistry*. Vol. 79, pp. 955-966. (1976)
- 34.- Novikoff, B.A., Holtzman, E. *Estructura y Dinámica Celular*. 1<sup>a</sup> Edición. Ed. Interamericana. (1972)
- 35.- Peitersen, N. Cellulase and Protein Production -- from Mixed Cultures of Trichoderma viride and a -- Yeast. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. -- XVII, pp. 1291-1299. (1975)
- 36.- Peitersen, N. Production of Cellulase and Protein from Barley Straw by Trichoderma viride. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. XVII, pp. 361-374. (1975)
- 37.- Reese, E.T., and Maguin, A. Surfactants as Estimulants of Enzyme Production for Microorganisms. --- *Applied Microbiology*. Vol. 17, pp. 242-245. (1969)

- 38.- Rhodes, A. y Fletcher, D.L. Principios de Microbiología Industrial. 1ª Edición. Ed. Acribia Zaragoza. España. (1969)
- 39.- Richter, G. Fisiología del Metabolismo de las Plantas. 1ª Edición. Ed. Continental. pp. 187-189. (1972)
- 40.- Sadana, J.C., Shewale, J.G. and Deshpande, M.V. Enhanced Cellulase Production by a Mutant of Sclerotium rolfsii. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 38, No. 4, pp. 730-733. (1979)
- 41.- Selby, K. Investigation of currently available cellulase preparations. Biochemistry Journal. Vol. 104, pp. 716-734. (1967)
- 42.- Shewale, J.G., and Sadana, J.C. Cellulase and B-glucosidase production by a basidiomycete species. Can. Journal Microbiology. Vol. 24, pp. 1204-1216. -- (1978)
- 43.- Shewale, J.G., and Sadana, J.C. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials by Sclerotium rolfsii - culture filtrate for sugar production. Can. J. Microbiol. Vol. 25, pp. 773-783. (1979)
- 44.- Smith, G. Introducción a la Micología Industrial. Ed. Acribia Zaragoza. España. (1963)
- 45.- Srinivanan, V.R., and Fleenor, M.B. Fermentative and Enzymatic Aspects of Cellulose Degradation. - Biotechnology and Bioengineering. Symposium 6. pp. 47-53. (1975)
- 46.- Sternberg, D. B-Glucosidase of Trichoderma: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose. Applied Environ. Microbiol. Vol. 31, pp. 648-654. (1976)

- 47.- Toyama, N., and Ogawa, K. Sugar Production from -  
Agricultural Woody Wastes by Saccharification with  
Trichoderma viride Cellulase. Biotechnology and -  
Bioengineering. Symposium No. 5. pp. 225-244. --  
(1975)
- 48.- Upergraff, D.M. Production of Cellulase by Myro--  
thecium verrucaria grown on newspaper. Biotechnolo  
gy and Bioengineering. Vol. 13, pp. 77-93. (1971)
- 49.- Whitaker, J.R. Principles of Enzymology for the -  
Food Sciences. Ed. Marcel Dekker, Inc., N.Y. --  
(1972)
- 50.- Wilke, C.R., Yang, R.D., and Stockar, V. Prelimina  
ry cost analysis for enzymatic hydrolysis of news--  
print. Biotechnology and Bioengineering. Sympo---  
sium. 6. pp. 155-176. (1975)