

2ej
129



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**AISLAMIENTO Y SELECCION DE HONGOS QUE
DEGRADAN CELULOSA DE LA PAJA DEL MAIZ**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MA. GUADALUPE ESTELA TERAN LOPEZ

MEXICO, D. F.



1986

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



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 está 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.

INDICE.

	Pag.
1. INTRODUCCION.	1
2. OBJETIVO.	4
3. GENERALIDADES.	5
3.1 Sustratos.	5
3.2 Microorganismos celulolíticos.	9
3.3 Celulosa.	13
3.3.1 Características de la celulosa.	13
3.3.2 Hidrólisis de la celulosa.	14
3.3.2.1 Hidrólisis ácida.	15
3.3.2.2 Hidrólisis enzimática.	16
3.4 Celulasas.	20
3.5 Proteína unicelular.	24
4. MATERIAL Y METODOS.	30
4.1 Medios utilizados en el aislamiento y conservación de microorganismos - celulolíticos.	30
4.1.1 Aislamiento.	30
4.1.2 Conservación.	32
4.1.3 Medio de esporulación.	32
4.1.4 Medio de fermentación.	32
4.2 Aislamiento de microorganismos celu- líticos.	33
4.3 Selección de los microorganismos.	34
4.4 Identificación de los microorganismos celulolíticos.	34
4.5 Preparación del inóculo.	34
4.6 Fuente de obtención del sustrato.	35
4.7 Tratamientos del sustrato.	35
4.7.1 Tratamiento químico.	35
4.7.2 Tratamiento físico y químico.	35

	Pag.
4.8 Métodos analíticos.	35
4.8.1 Efecto de los tratamientos -- sobre el sustrato.	36
4.8.2 Efecto de la concentración -- del sustrato.	36
4.8.2.1 Determinación de azúcares - reductores totales.	36
4.8.2.2 Actividad en papel filtro.	38
4.8.2.3 Actividad en C.M.C.	38
4.8.3 Tiempo de máxima actividad ce- lulolítica.	38
4.8.4 Determinación de proteína ex- tracelular.	38
4.8.5 Determinación de sustrato re- sidual y variación de pH.	40
4.8.6 Efecto de aditivos.	40
4.8.7 Identificación de azúcares.	40
5. RESULTADOS.	42
5.1 Selección e identificación de los - microorganismos.	42
5.2 Métodos analíticos.	42
5.2.1 Efecto del tratamiento sobre_ el sustrato.	42
5.2.1.1 Tratamiento químico.	42
5.2.1.2 Tratamiento físico y químico	42
5.2.2 Efecto de la concentración -- del sustrato.	43
5.2.2.1 Azúcares reductores totales	43
5.2.2.2 Actividad en papel filtro	43
5.2.2.3 Actividad en C.M.C.	43
5.2.2.4 Tiempo de máxima actividad_ celulolítica.	43
5.2.3 Determinación de proteína ex- tracelular.	44

	Pag.
5.2.4 Determinación de sustrato - residual y variación de pH.	44
5.2.5 Efecto de aditivos.	44
5.2.5.1 Adición de Tween 80.	44
5.2.5.2 Adición de proteosa-pepto na.	44
5.2.6 Identificación de azúcares.	45
6. DISCUSION.	46
7. CONCLUSIONES.	52
8. RESUMEN.	54
9. BIBLIOGRAFIA.	57

1. INTRODUCCION.

En las últimas décadas y como consecuencia de la sobrepoblación mundial, surge la necesidad de satisfacer una mayor demanda de vivienda, empleo y alimentos principalmente, además de solucionar los problemas de contaminación ambiental que plantea la explosión demográfica.

Con base en esto, los científicos contribuyen a la solución de dichos conflictos buscando fuentes no convencionales de alimento, como los residuos celulósicos que son desperdiciados en parte actualmente y cuyo aprovechamiento representa una de las alternativas de mayor interés, pues son excelentes sustitutos de otras fuentes de carbono más comunmente empleadas para la producción de biomasa o proteína unicelular. Por otro lado, la utilización de estos residuos disminuye la contaminación ambiental originada por su acumulación.

Muchos de los materiales celulósicos son residuos que se clasifican de acuerdo a su origen en:

- a) Residuos agrícolas: bagazo, paja, olote, hojas, rastrojo, etc.
- b) Desperdicios del procesamiento de alimentos: cáscara de frutas, pedazos de vegetal, pulpa, etc.
- c) Desperdicios de madera: aserrín, astillas, corteza, etc.
- d) Residuos municipales: basura, papel. (45,55).

Este tipo de materiales presenta como constituyente principal a la celulosa, que es un compuesto orgánico abundante en

la naturaleza y ocupa una tercera parte de la materia vegetal de toda la Tierra. Su estructura es la de un polisacárido compuesto de unidades de d-glucosa polimerizadas mediante enlaces β -1,4-glucosídicos; sin embargo, esta forma estructural no es asimilable por organismos superiores a excepción de los rumiantes que poseen un complejo enzimático que efectúa su degradación. De la misma manera existe una gran variedad de microorganismos entre los cuales se destacan los hongos por ser capaces de liberar su enzima celulolítica al medio de cultivo sin necesidad de romper sus células, fenómeno que se requiere en bacterias y protozoarios con actividad celulolítica. (32)

En este sentido, una hidrólisis enzimática sobre la celulosa produce glucosa a partir de la cual, mediante distintos procesos fermentativos, se obtienen productos de gran valor industrial como alcoholes, ácidos orgánicos, antibióticos, etc., mientras que una hidrólisis ácida desprende azúcares de peso molecular heterogéneo, además de ser un proceso muy costoso. (31)

Por esta razón, se han realizado numerosos estudios para encontrar microorganismos con alta actividad celulolítica así como para purificar su enzima (celulasa).

Dada la relativa facilidad para obtener y manejar los cultivos fúngicos y su mayor capacidad celulolítica en relación con otros microorganismos, el presente estudio se enfo-

ca a la búsqueda de hongos con buena actividad degradativa - sobre las hojas de la mazorca de maíz ya que representan un residuo ampliamente disponible y que prácticamente no es - - aprovechado.

2. OBJETIVO.

El objetivo fundamental de este trabajo es medir la capacidad degradativa de las celulasas producidas por hongos aislados de diversas fuentes sobre la cubierta de la mazorca de maíz, proveniente del mercado de "La Merced", pues es un residuo agrícola abundante y poco aprovechado en nuestro país. -- Por su contenido de celulosa representa una fuente potencial de carbono, ya que mediante hidrólisis enzimática es factible obtener un azúcar simple como producto final y que resulte -- aprovechable en otras industrias de fermentación.

Por otro lado, se pretende detectar la actividad celulolítica de las enzimas producidas, pues actualmente, el aislamiento y purificación de sistemas enzimáticos altamente activos permiten aplicarlos en otros procesos de interés industrial.

3. GENERALIDADES.

3.1 Sustratos.

A fin de facilitar el aprovechamiento de los residuos celulósicos en la búsqueda de fuentes no convencionales de alimentos, para ayudar a resolver la crisis alimentaria mundial, se ha considerado una amplia variedad de sustratos que por su abundancia, carácter renovable y bajo costo, representan una fuente potencial de carbono, aprovechable en procesos industriales para producir compuestos químicos de gran interés, como son: proteína unicelular, azúcares reductores, celulasas y otros productos de fermentación. (6,52)

Entre dichos sustratos, los que representan mayor importancia industrial se encuentran aquellos que en base a su origen se pueden clasificar en: (45)

- Residuos agrícolas: bagazo, paja, hojas, etc.
- Residuos del procesamiento de alimentos: cáscaras de frutas, pedazos de vegetal, pulpa, etc.
- Desperdicios de madera: corteza, astillas, aserrín, etc.
- Basura municipal y papel.

En la tabla 1, se muestra la composición química de algunos residuos celulósicos.

Aún cuando las características mismas de los residuos celulósicos disponibles hacen que la selección de cualquiera

de ellos como sustrato de fermentación no sea simple y que -
deban de considerarse los aspectos siguientes: (22)

- Disponibilidad.
- Localización.
- Usos alternativos.
- Características físicas y químicas.

Las brácteas o cubiertas de la mazorca del maíz (sustra-
to utilizado en este trabajo) representan una alternativa de
uso como fuente de carbono aprovechable en diversos procesos
industriales, pues ofrecen algunas ventajas en función de su
bajo costo y amplia disponibilidad durante prácticamente todo
el año; sobre todo, considerando que su utilización actual es
únicamente de tipo doméstico.

TABLA 1. COMPOSICION QUIMICA DE ALGUNOS RESIDUOS CELULO-
SICOS (% EN PESO SECO).

COMPONENTE.	BAGAZO.	PAJA DE TRIGO.	MADERA.	PAPEL
Celulosa	46	34	44-50	75
Hemicelulosa	25	25	20-26	
Lignina	20	13	7-12	10
Sílice, grasa, ceras, cenizas	9	28	Balance	15

FUENTE: (45)

En México, el cultivo de maíz ocupa un lugar preponderan-
te dentro de las actividades agrícolas, ya que es producto bá-
sico en la alimentación. Además tiene un aprovechamiento inte-
gral en numerosas industrias pues ninguna de sus partes se --

desperdicia; el grano es rico en nutrimentos, la planta constituye un excelente forraje ya sea verde o ensilado, y aún -- el mismo olote ha probado ser útil en la engorda del ganado -- vacuno o como combustible y en materiales de construcción y -- fertilizantes. Por otro lado, el almidón y la harina se em--- plean en la fabricación de gomas, insecticidas y explosivos o como materia prima para fermentaciones. Así mismo, del em---- brión se extrae aceite comestible. (49)

La planta del maíz se compone de las siguientes partes:- la mazorca integrada por los granos, el olote (donde se im--- plantan los granos) y las brácteas o cubiertas de la mazorca (llamadas en México: Totomoxtle); el tallo o tronco, el pie -- de caña; raíces y la flor, cima o plumero. La proporción de -- estas diferentes partes en la planta seca es:

PARTES:	COMPOSICION (en 100 partes de planta - seca)	
Grano	30-35	
Olote	12-20	
Brácteas	6-10	
Tallo	30-45	
Pie y raíces	12-14	
Cima	2-15	FUENTE: (14)

Vemos que las brácteas constituyen la menor proporción -- de la planta, pues representan en promedio el 8% de la planta y su utilización es hasta ahora en forma doméstica para la -- elaboración de tamales y artículos de ornato ó, en el mejor -- de los casos, mezclada con rastrojo para emplearse como forra

je o paja en la alimentación del ganado. (49)

Sin embargo, considerando que la producción anual de -- maíz es elevada y que las brácteas se manejan como un residuo su utilización como un sustrato potencial para la transformación de celulosa (uno de los principales componentes) a sustancias de gran interés a nivel mundial resulta aceptable.

En las tablas 1a, 1b y 1c, se disponen datos sobre la -- producción de residuos agrícolas en México.

TABLA 1a. PRODUCCION ANUAL DE LOS PRINCIPALES RESIDUOS --
AGRICOLAS (Promedio de 1972-1976)

Residuo	Ton.	%
Maíz (rastroyo y olote)	103 623 675	80.28
Sorgo (rastroyo)	12 488 040	9.67
Caña de azúcar (bagazo)	8 396 646	6.50
Trigo (paja)	2 519 361	1.95
Frijol (paja)	617 819	0.48
Arroz pälal (cascarilla y paja)	506 527	0.39

FUENTE: (37,2)

TABLA 1b. COMPOSICION QUIMICA DE ALGUNOS DESPERDICIOS --
CELULOSICOS (% en peso seco)

Componente	Rastrojo de maíz.	Paja de trigo.	Madera.
Celulosa	29	34	44-50
Hemicelulosa	36	25	20-26
Lignina	14	13	7-12
Sflice, grasas, ceras, cenizas.	5	28	Balance

FUENTE : (45)

TABLA 1c. PRODUCCION NACIONAL DE ESQUILMOS AGRICOLAS -
EN 1978.

Producto.	Toneladas.
Rastrojo de maíz	16 618 532
Paja de sorgo	2 482 874
Paja de trigo	1 723 670
Paja de frijol	1 320 716
Punta de caña de azúcar	1 205 557
Cascarilla salvado de trigo	750 172
Paja de cebada	534 746
Paja de avena	131 321
Frutas y hortalizas no comerciales.	79 855
Cascarilla y arroz	58 309
Paja de cacahuete	43 379
Paja de garbanzo	25 134
	<hr/> 24 980 265

FUENTE: (37,44)

3.2 Microorganismos celulolíticos.

Por conveniencia, los microorganismos capaces de biodegradar a la celulosa se dividen en cuatro grupos, dependiendo de su temperatura de crecimiento, sus necesidades de oxígeno y de acuerdo al habitat que ocupen. Así, los mesofílicos aeróbios ó anaeróbios dominan a temperaturas moderadas (20 a 45°C), mientras que una flora termofílica ya sea aeróbia o anaeróbia se desarrolla por arriba de los 45°C.

Dentro de la microflora aeróbia se ha propuesto que los hongos son los agentes principales de la degradación en - -

suelos húmedos. Los basidiomicetos son especialmente activos en la destrucción de materia orgánica forestal, leña y tejidos leñosos, pero han recibido poca atención por crecer pobremente en medios de cultivo convencionales. Por otro lado, los actinomicetos celulolíticos han recibido poca atención ya que aunque tienen las enzimas necesarias para el desdoblamiento de la celulosa, son mucho más lentos para atacar el polisacárido que la mayoría de hongos y bacterias y no son buenos competidores por el sustrato. (1,12)

Por lo que respecta a la microflora mesofílica anaeróbica, la descomposición de la celulosa procede principalmente de la acción de bacterias, mientras que los hongos y actinomicetos, no son muy comunes. El microorganismo celulolítico anaeróbico más común en la "Naturaleza" es miembro del género Clostridium, bacteria que se ha encontrado en suelos, compostas, abonos, lodo de ríos, aguas negras. Ciertos hongos como Merilius y Fomes, pueden desarrollarse lentamente en ausencia de oxígeno, así como algunos actinomicetos que pueden crecer ocasionalmente.

En relación a la descomposición termofílica, a pesar de la amplia distribución de este tipo de microorganismos, es probable que su participación en la transformación de celulosa sea menor, aún cuando los termófilos aeróbicos y anaeróbicos son agentes activos de la celulólisis, teniendo velocidades de biodegradación más altas que las correspondientes

a mesófilos. Un termófilo común es Clostridium thermocellum, anaeróbico formador de esporas que se ha utilizado para producir ácidos orgánicos, con una temperatura óptima de crecimiento de 55 a 65°C y pH cercano a la neutralidad.

Considerando los factores anteriores, existen diversas fuentes de aislamiento de microorganismos capaces de efectuar la biodegradación de la celulosa; entre ellas, destacan primordialmente las siguientes: suelo, rumen, composta, estiércol, paja, abono y vegetales en descomposición. (39)

Además, cada una de las variedades de organismos celolíticos es afectado en forma diferente por las condiciones del medio ambiente, como son: pH, humedad, presencia y concentración de oxígeno, tipo de sustrato, composición de la microflora presente, etc. (47)

Así, algunas de las especies que se pueden aislar de las fuentes mencionadas anteriormente, y que son capaces de utilizar celulosa, son bacterias mesofílicas aeróbicas o anaeróbicas, hongos filamentosos, basidiomicetos, bacterias termofílicas y actinomicetos. (30)

La tabla 2 muestra algunos de los géneros celolíticos más comunes, incluyendo hongos, bacterias y actinomicetos, tanto anaeróbicos como aeróbicos.

Aunque algunos de estos microorganismos han sido estudiados solo en cultivos puros, la acción natural es claramente el

resultado de una comunidad compleja. A lo mejor, es difícil_ comparar cultivos puros con las diversas poblaciones activas "in vivo", ya que existe una intensa competencia por los nutrientes y cambios esenciales en la composición de la microflora con el tiempo.

TABLA 2. ALGUNOS MICROORGANISMOS CAPACES DE UTILIZAR --
CELULOSA.

HONGOS	BACTERIAS	ACTINOMICETOS
Alternaria	Bacillus	Micromonospora
Aspergillus	Cellulomonas	Nocardia
Chaetomium	Clostridium	Streptomyces
Coprinus	Corynebacterium	Streptosporangium
Fomes	Cytophaga	
Fusarium	Polyangium	
Myrothecium	Pseudomonas	
Penicillium	Sporocytophaga	
Polyporus	Vibrio	
Rhizoctonia		
Rhizopus		
Trichoderma*		
Trichothecium		

* Actualmente se reconoce como el microorganismo con mayor actividad celulólfica.

FUENTE: (1)

Independientemente del género del microorganismo que -- efectúe la descomposición de la celulosa, se pueden apreciar_ ciertas diferencias en los mecanismos aeróbico y anaeróbico. Así, en la celulólfisis aeróbica, los microorganismos convierten la celulosa a dos productos: CO₂ y sustancias celulares,--

no hay acumulación de intermediarios carbonáceos y la concentración de ácidos orgánicos raramente es apreciable; mientras que en anaerobiósis, los microorganismos liberan como productos finales varias sustancias orgánicas. Las principales sustancias que se acumulan en ausencia de oxígeno son: CO_2 , H_2 , etanol y ácidos orgánicos como acético, fórmico, succínico, butírico y láctico. (47,51)

Por otro lado, la celulólisis sin oxígeno es lenta, independientemente del grupo de que se trate y, a diferencia de los microorganismos aeróbios, los anaeróbios no son tan sensibles a la acidez y han sido encontrados en suelos de pH de 4.3

3.3 Celulosa.

3.3.1 Características de la celulosa.

La celulosa es el más abundante de los compuestos orgánicos y representa un recurso renovable, producido por la mayoría de las plantas verdes, pues es el polisacárido estructural y constituyente de la pared celular. (1,19)

Es un polímero formado por unidades de d-glucosa con enlaces β -1,4-glucosídicos, a diferencia del almidón (también integrado por unidades de d-glucosa) que presenta enlaces α -1,4-glucosídicos. (9)

Se ha calculado que el peso molecular máximo de la celulosa de diversas procedencias varia de 50 000 a 2 500 000 que es el equivalente de 300 a 15 000 restos de glucosa. Por

otro lado, a pesar de su abundancia en la naturaleza, no se encuentra en forma pura, ya que usualmente se presenta en combinación con otros polímeros como lignina, pectina, hemicelulosa, etc. Sobre la base de una producción mundial, se ha calculado que las plantas de la Tierra producen 24 Ton/persona/año, y aunque posee una elevada afinidad por el agua, es completamente insoluble en ella. (4,23)

La celulosa se encuentra en las semillas germinadas de las plantas, en algas, en muchos hongos, en quistes de algunos protozoarios y en la materia orgánica del suelo. Dentro de la pared celular, la celulosa se encuentra en agrupaciones submicroscópicas conocidas como micelas que integran el microfibrillo. Asimismo, probablemente es organizada en unidades discretas separadas por un espacio a menudo llenado por lignina. El contenido de celulosa de las plantas superiores nunca es fijo, ya que su concentración aumenta conforme a la edad y tipo de planta. Así, el carbohidrato es especialmente abundante en sustancias leñosas, en la paja, rastrojo y hojas. Los tejidos tiernos, son comúnmente pobres en celulosa, pero su concentración aumenta conforme la planta madura. De esta manera, una concentración promedio de 15 a 45% incluye a la mayoría de las especies cosechadas ordinariamente, siendo el límite inferior típico de las plantas más jóvenes. (1)

3.3.2 Hidrólisis de la celulosa.

A pesar de que la celulosa es el carbohidrato más abundante en la naturaleza, no es digerible para los monogás-

tricos y sólo lo es parcialmente para los rumiantes (especie más estudiada con respecto a tratamientos tendientes a hacer a la celulosa una fuente de carbono aprovechable), y para -- ello han considerado dos rutas: 1) Hidrólisis de la celulosa produciendo azúcar y su posterior fermentación, y 2) la fermentación directa de los residuos celulósicos. (9,45)

Aunque hay una gran cantidad de métodos para hidrolizar los residuos celulósicos, de acuerdo al catalizador que se use se pueden clasificar en dos vías: Hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática.

3.3.2.1 Hidrólisis ácida.

Este proceso consiste en tratar material celulósico a altas presiones y temperaturas en un medio acuoso con una baja concentración de ácido; de esta forma, se obtienen azúcares reductores que se emplean para la producción de proteína unicelular, etanol y algunos otros productos.

La hidrólisis ácida presenta ventajas en el aspecto económico con respecto a la hidrólisis enzimática, pero todavía debe demostrarse que los problemas tecnológicos del reactor de hidrólisis pueden ser resueltos, principalmente por -- que al operarse a alta temperatura es necesario aumentar la presión del sistema para que éste continúe líquido, lo que repercute en una mayor inversión económica.

En la tabla 3, se muestran datos referentes a este proceso.

TABLA 3. PRINCIPALES CARACTERISTICAS ECONOMICAS DEL PROCESO DE PRODUCCION DE AZUCARES POR HIDROLISIS ACIDA DE PAPEL. (Año de estimación: 1969)

PROCESO	POR LOTE			
	80	80	300	1000
Tamaño de la planta (Ton/día)	80	80	300	1000
Producto (Ton/día)	30.75	31.25	117.2	390.62
Inversión total (\$x10 ⁶)	1.09	1.58	3.49	9.26
Costo (\$/lb azúcar)	0.051	0.055	0.043	0.037

FUENTE: (45)

3.3.2.2 Hidrólisis enzimática.

Este proceso se basa en la utilización de enzimas para que efectuen la hidrólisis de la celulosa. Consiste en la producción de celulasas, su purificación y su aplicación al desperdicio celulósico, y consta de dos fases:

- a) La producción de la celulasa y su purificación.
- b) Su utilización como agente sacarificante.

En la primera fase se recurre a los microorganismos celulóliticos de los que hablamos anteriormente. Actualmente el hongo Trichoderma viride es reconocido como el mejor organismo -- celulólitico (20) le siguen en orden de importancia, M. verrucaria y otros organismos. Estos microorganismos crecen en un medio cuya única fuente de carbono es la celulosa, ya que la celulasas es una enzima inducida (40). El sistema se maneja en las condiciones óptimas para la producción de la enzima y finalmente se procede a su purificación. Sin embargo, esta etapa presenta algunos problemas y por ello en muchas ocasiones se utiliza

directamente el caldo de fermentación sobre el desperdicio -
celulósico. (Figura 1).

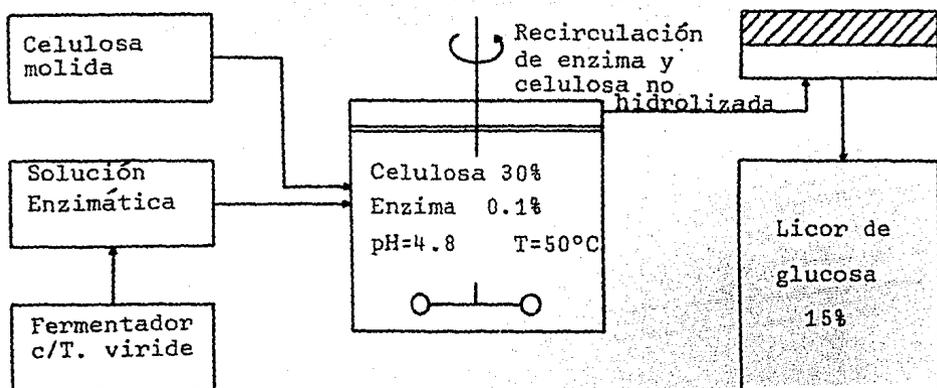


Fig. No. 1

En la figura 1, se observa que es necesario emplear un sistema de recuperación de la enzima para establecer su recirculación, así como también de la celulosa no hidrolizada.

El proceso de sacarificación por hidrólisis enzimática presenta ventajas tecnológicas y de operación en cuanto a la temperatura y pH de operación, que son de bajo orden, pero el costo parece aún no ser competitivo. Producir azúcares por este medio y después fermentarlos para crear biomasa es probable que no se realice, aunque la producción de glucosa con otros fines puede ser atractiva comercialmente (23,26). Se han realizado varios estudios económicos para evaluar la potencialidad de este proceso. En la tabla 4, se incluyen estos

datos.

TABLA 4. PRINCIPALES CARACTERISTICAS ECONOMICAS DEL PROCESO DE SACARIFICACION POR HIDROLISIS ENZIMATICA.
(Periodo de estimación: 1971-1974).

PROCESO:							
MATERIAL:	PAPEL			BAGAZO			
Tamaño de la planta (ton/día)	10	100	218	10	100	250	886
Producto (Ton/día)	9.15	91.5	100	5.45	54.5	136.2	429
Inversión total (\$x10 ⁶)	1.97	14.0	6.05	1.79	6.94	10.76	10.13
Costo (\$/lb azúcar)	0.133	0.071	0.045	0.156	0.078	0.064	0.013

FUENTE: (45)

La otra alternativa de uso para los residuos celulósicos - consiste en fermentarlos directamente con un microorganismo que tenga actividad celulolítica. Este proceso tiene la particularidad de requerir un tratamiento previo a la fermentación, en forma similar al de la hidrólisis enzimática.

Los materiales celulósicos naturales o procesados presentan muchos problemas en relación a su susceptibilidad a la hidrólisis enzimática debido a las diferencias estructurales que condicionan su degradación que incluyen: el tamaño y difusibilidad de las moléculas de la enzima en relación al tamaño y propiedades estructurales del microfibrillo y las moléculas de celulosa, así como la naturaleza de las sustancias con las que se asocian.

Para superar las dificultades anteriores y debido a la amplia utilización de fibras celulósicas en las fermentaciones, se ha recurrido a diversos tipos de tratamientos previos que facilitan su digestión enzimática, y son: (18,38,54)

- a) Molienda mecánica o por ultrasonido para obtener una reducción del tamaño molecular.
- b) Tratamiento químico alcalino para remover la lignina y facilitar el ataque enzimático a la estructura.
- c) Oxidación por diferentes métodos para modificar la resistencia de los residuos celulósicos.
- d) Combinaciones de los anteriores.

Por el momento, el tratamiento alcalino parece ser el que ofrece los mejores resultados; sin embargo, otro tratamiento previo que podría incrementar la susceptibilidad y su superficie de la hidrólisis enzimática para materiales celulósicos, comprende una molienda seguida del tratamiento alcalino con vapor. (27)

Por otro lado, Krupnova y colaboradores (citado en 15), encontraron que un tratamiento con calor y una molienda reduce la cristalinidad de los materiales celulósicos y los hace más susceptibles a hidrólisis ácida.

No obstante, se ha encontrado que la celulosa tratada con calor, debido a alteraciones en su molécula, da rendimientos menores de celulasas y que los efectos inhibidores pueden deberse a los factores siguientes:

- a) Secado excesivo de las fibras.
- b) Oxidación de una parte de la celulosa.
- c) Reorientación de moléculas de celulosa en las fibras.
- d) Aparición de sustancias tóxicas durante el tratamiento y que inhiben la síntesis de celulasas.

Finalmente, los sistemas $H_2O_2 + Fe^{2+}$ parecen ser significativamente importantes como tratamiento potencial de materiales celulósicos debido a las condiciones moderadas de pH y temperatura a las que se efectúa y a que los productos finales no son tóxicos. (15)

3.4 Celulasas.

Son las enzimas encargadas de la hidrólisis de la celulosa.

Desafortunadamente, el hombre y otros animales no pueden digerir la celulosa. Para usarla como alimento, primero debe ser hidrolizada. Cuando la hidrólisis se realiza por vía enzimática, se necesita la presencia de un complejo multienzimático denominado "celulasa" que consta de tres diferentes componentes: C_1 , C_x y β -glucosidasa. (50,59)

C_1 : Pertenece al grupo de las exo- β -1,4 glucanasas -- pues remueve sucesivamente unidades de glucosa a partir de -- terminales no reductoras de la cadena de celulosa. Se le conoce también como celobiohidrolasa, ya que las exoglucanasas -- empiezan la degradación por los extremos de la cadena por eli

minación hidrolítica de unidades de celobiosa (34). Su actividad se manifiesta sobre sustancias celulósicas altamente ordenadas, sólidas y naturales como el algodón. Prácticamente, C_1 prepara la celulosa para ser atacada por los componentes C_x y β -glucosidasa, ya que por sí misma no es hidrolítica.

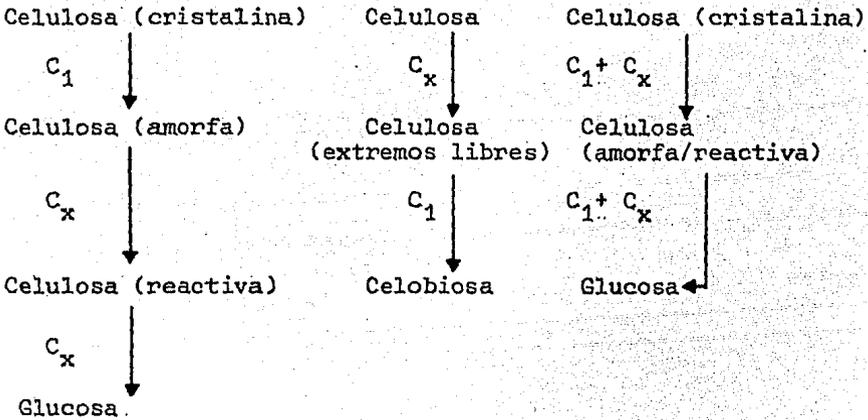
C_x : Pertenece al grupo de las endo- β -1,4 glucan--sas, ésta hidroliza cadenas de celulosa fortuitamente a --unidades de glucosa a partir de finales no reductores de --la cadena de celulosa. Es la enzima hidrolítica; actúa sobre derivados de celulosa solubles, usualmente carboxime--tilcelulosa (C.M.C.).

β -glucosidasa: Se le conoce también como β -gluco--dimerasa por tener habilidad sobre todos los β -dímeros --de glucosa, incluyendo a celobiosa que se transforma en --dos unidades de glucosa.

Petterson (citado en 6) propuso un esquema de la de--gradación secuencial de celulosa natural a glucosa. Supone que existe un factor de iniciación, responsable de la con--versión de la celulosa natural a un estado activo que puede ser atacado por las exo y endo glucanasas para producir --azúcares. Posteriormente las regiones de baja cristalinidad en las fibras de celulosa son atacadas por las endo-glucana--sas liberando extremos de la cadena. Estos extremos son de--gradados por las exo-glucanasas formando unidades de celo--

biosa. Finalmente, la celobiosa es hidrolizada a glucosa por la acción de las β -glucosidasas. (33,34,20)

DIFERENTES POSTULADOS ACERCA DEL MECANISMO DE ACCION DE LAS CELULASAS.



FUENTE: (13)

La actividad celulolítica es de gran importancia biológica siendo la mayor reacción hidrolítica natural, pues contribuye anualmente con 95 000 millones de toneladas de carbono a la atmósfera. Desde el punto de vista práctico, dicha actividad tiene un gran potencial de ser utilizada. (46)

De hecho, las celulasas ya son empleadas en la industria textil y farmacéutica así como en la transformación de alimentos; la hidrólisis de desechos agrícolas, éstos resultan un sustituto excelente del petróleo, siempre y cuando, sean adecuadamente reciclados para recuperar la bioenergía contenida en ellos; sin embargo, el principal interés de la

utilización de las celulasas es la conversión de la celulosa de materiales celulósicos de desecho en azúcares solubles de importancia industrial. (16)

Las celulasas son producidas por una gran variedad de hongos y bacterias. En general, los hongos son los que producen filtrados suficientemente activos para llevar a cabo in vitro una sacarificación de la celulosa. Entre los mejores hongos productores de celulasas se encuentran: Trichoderma viride, Chrysosporium lignorum, Trichoderma koningii y Aspergillus niger. (5,41)

A pesar de los intentos que se han realizado por utilizar a las celulasas para la sacarificación de la celulosa y la amplia información acerca de los hongos mencionados, no existe en la actualidad ningún proceso industrial de sacarificación enzimática de la celulosa, por las razones mencionadas anteriormente. (43)

Para lograr la conversión de la celulosa a azúcares se requiere, además de una enzima suficientemente activa, un pretratamiento de la celulosa para eliminar lignina y otras sustancias interferentes con el propósito de aumentar su susceptibilidad. Si la proporción y extensión de la hidrólisis es alta, la concentración del azúcar también debe serlo, dependiendo de su facilidad de recuperación. Si la recuperación del azúcar no es práctica, el digerido crudo se podría usar directamente para obtener otro producto de fermentación

o bien, un producto de gran importancia actualmente debido a la escasez de proteína y alimentos en general: La proteína unicelular. (21)

3.5 Proteína Unicelular.

La escasez de proteína en los países pobres, la reducción en la captura de algunas especies pesqueras, la alta tasa de crecimiento demográfico y los incrementos de los precios de las fuentes tradicionales de proteínas para consumo humano y animal han hecho que investigadores y gobierno de varios países estén considerando la producción a gran escala de proteína unicelular como una solución al problema de la alimentación. (24)

La proteína unicelular es el término genérico que se aplica al concentrado proteínico obtenido de microorganismos unicelulares (levadura, hongos, bacterias y algas), los cuales pueden cultivarse en una gran variedad de medios relativamente abundantes y baratos tales como residuos del petróleo y derivados, gas natural, aguas negras, melazas, etanol, metanol y residuos celulósicos entre otros (5). La producción de proteínas en forma de proteína unicelular, por medios no convencionales, tiene características que la hacen particularmente atractiva, siendo su alto contenido proteico y su rapidez de duplicación de masa de las más importantes.

El poco tiempo que los microorganismos unicelulares necesitan para reproducirse significa una gran ventaja, ya que mien-

tras un becerro de 450 kg produce $\frac{1}{2}$ kg de proteína cada 24 horas
450 kg de planta de soya producen 40 kg en un período de 150 --
días y 450 kg de microorganismos producen 450 kg de proteína en
sólo 2 horas. (5)

Por otro lado, la velocidad con que se reproducen estos mi-
croorganismos ofrece ventajas para la experimentación genética,
pues se obtienen generaciones completas en períodos de 3 a 5 --
días. Además, se requiere de poco personal especializado.

Proceso de elaboración: Los altos precios de la proteína -
han propiciado la creación de diversos procesos de interés eco-
nómico , incluyendo: (23)

- a) Hidrólisis ácida, seguida por fermentación con levadura
- b) Fermentación por actinomicetes termofílicos.
- c) Crecimiento de bacterias celulolíticas mesofílicas a --
partir de materiales celulósicos pretratados:

Como vemos, una de las posibles fuentes de proteína unice-
lular la representan los recursos celulósicos (10), sin embar--
go, deben considerarse algunos aspectos para su elección (45), -
como son:

1. Disponibilidad en cantidad y en tiempo (con base en - -
ello se determina el tamaño de la planta).
2. Localización (pues si es necesario recolectarlo y trans-
portarlo, el costo aumenta considerablemente).
3. Usos alternativos: como combustible, alimento directo -
al ganado, papel, etc.

4. Características físicas y químicas, como su densidad, composición química, tamaño de partícula, etc.

En general, la proteína unicelular se obtiene mediante un proceso en el que el fermentador es la clave. La ruta más estudiada es la de cultivo sumergido aeróbico. Su diseño incluye un sistema de agitación de la biomasa, suministro de agua, sustrato, nutrimentos, oxígeno y fuente de nitrógeno (7,45). Todos los insumos son esterilizados previamente para evitar la contaminación del cultivo. Como la fermentación es exotérmica, debe contarse con un sistema de refrigeración para mantener la temperatura óptima de crecimiento. La velocidad con la que el oxígeno se transfiere a los organismos se acelera con sistemas de oxigenación que rompen las burbujas de aire. Para separar los microorganismos del sustrato, se suelen utilizar centrifugas.

La proteína unicelular generalmente contiene más del 50% de proteína de gran calidad. Otras sustancias presentes en ella son los ácidos nucleicos (ARN y ADN), azúcares, grasas, agua, fósforo, potasio y fibra. La proporción de estos componentes varía en función del organismo específico y del sustrato en el que ha crecido.

La proteína unicelular destinada al consumo humano debe ser refinada para eliminar su elevado contenido de ácidos nucleicos, pues su ingestión elevada incrementa el desarrollo de cálculos biliares ó puede provocar "gota".

Mediante la hidrólisis de la biomasa, el contenido de ácidos nucleicos se reduce a menos del 5%. Los ácidos nucleicos - obtenidos se utilizan como saborizantes en diversos productos. La proteína unicelular destinada para los animales no requiere la separación de los ácidos nucleicos.

Una vez removidos los ácidos nucleicos, la proteína unicelular se somete a tratamientos para elevar su concentración y mejorar su digestibilidad. Los concentrados de proteína unicelular pueden ser hilados para fabricarse fibras y tejidos que imitan a la textura de la carne de la misma manera que se han utilizado las proteínas de soya.

En la tabla 5, se observa la composición de proteínas unicelulares típicas, crecidas en diversos sustratos comparadas - con dos fuentes convencionales de proteínas como son la harina de pescado y la harina de soya, observándose las diferencias - en el contenido de lisina, metionina y grasa.

En la producción de proteína unicelular, tanto microorganismos mesofílicos y termofílicos utilizan la celulosa en una concentración razonable, aunque la biodegradación de lignina y complejos lignina-celulosa constituye el mayor obstáculo para la utilización comercial de los residuos celulósicos (10). Actinomicetes termofílicos parecen ser los organismos más efectivos para la producción de proteína unicelular a partir de residuos celulósicos, además de ser un proceso económicamente viable. (48)

TABLA 5. COMPOSICION DE PROTEINAS UNICELULARES TIPICAS.

ORGANISMO	SUSTRATO	PROTEINA CRUDA (%)	PROTEINA 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 ₂	45-60	40-50	4.6	1.4	5
HONGOS	Carbohidra tos.	35-50	30-40	6.5	1.5	5
<u>FUENTES CONVENCIONALES DE PROTEINAS.</u>						
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

FUENTE: (5)

Finalmente, podemos afirmar que la producción de proteína unicelular y de otros productos de fermentación obtenidos a partir de la degradación de la celulosa dependerán de la facilidad para disponer de una celulasa altamente activa. En la actualidad, Trichoderma viride es la mejor fuente de celulasa activa, sin embargo, la composición del medio y las condiciones de cultivo afectan la producción enzimática (13). -- La obtención de enzimas en gran escala se puede ver favorecida por una adecuada selección y mejoramiento de los microorganismos capaces de llevar a cabo esa producción y del desarrollo de métodos de fermentación accesibles económicos y tecnológicos.

4. MATERIAL Y METODOS.

4.1 Medios utilizados en el aislamiento y conservación de microorganismos celulolíticos.

4.1.1 Aislamiento.

Se empleó el medio de ROSA DE BENGALA (56).

KH_2PO_4	0.50g
K_2HPO_4	0.50g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.50g
PEPTONA	0.50g
DEXTROSA	10.00g
ROSA DE BENGALA.	0.05g
ESTREPTOMICINA	0.03g
AGAR	17.00g

Aforado a 1 litro con agua destilada.

La adición de estreptomicina se realizó justo antes de que el agar solidificara, por ser termolábil.

MEDIO DE DUBOS (11)

K_2HPO_4	1.00g
NaNO_3	0.50g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.50g
KCl	0.50g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01g

Aforar a un litro con agua destilada y ajustar el pH a 5.

Se introdujeron tiras de papel filtro (1x9cm) en cada tubo de cultivo quedando una porción de papel fuera de la superficie

del medio líquido. Se esterilizó en autoclave a 15 libras por 15 minutos y se incubaron a 29°C durante 30 días.

PLACAS DE SILICA GEL (Método de Winogradsky). (17)

Se mezclaron en partes iguales: Una solución de silicato de sodio diluído a 7° Baumé (solución comercial diluída a 1/4 aproximadamente) y una solución de HCl a 13° Baumé (solución comercial diluída a 1/3 aproximadamente), vaciando el silicato sobre el ácido con agitación.

Inmediatamente se colocaron 30 ml. en cajas de Petri, dejándolas abiertas sobre una mesa hasta solidificar (aproximadamente 30 horas).

Dentro de un recipiente grande se procedió al lavado de las cajas en agua corriente hasta la eliminación del exceso de ácido y se controló el pH con papel indicador. El lavado se realizó en 20 horas aproximadamente.

Impregnación de las placas: Antes de su utilización, se sumergieron las placas durante 5 minutos en agua hirviente (con el fin de esterilizarlas). Una vez hecho esto, se adicionó un disco de papel filtro estéril en cada placa y aproximadamente 3 ml. de la solución nutritiva estéril. (11)

Inoculación de las placas: Sobre el papel filtro se distribuye uniformemente una suspensión de esporas de cada cepa fúngica, incubando a 29°C durante 3 meses; se rehidrataron las placas con solución nutritiva de Dubos una vez por semana.

4.1.2 Conservación.

Se utilizó el medio de SABOURAUD (56)

PROTEOSA/PEPTONA. 10.0g
DEXTROSA. 40.0g
AGAR. 15.0g

Aforado a 1 litro con agua destilada.

Una vez obtenido el desarrollo del hongo, el medio se cubrió con vaselina estéril para evitar desecación.

4.1.3 Medio de esporulación.

El medio empleado para favorecer la esporulación fué: AGAR-V/8. (56)

Jugo V/8 180 ml.
CaCO₃ 2 g.
AGAR 20 g.

Aforado a 1 litro con agua destilada.

4.1.4 Medio de fermentación. (42)

Se preparó el medio mineral de Reese (47), adicionado del sustrato (cubierta de la mazorca del maíz).

KH₂PO₄ 2.0g
(NH₄)₂SO₄ 1.4g
UREA 0.3g
MgSO₄.7H₂O 0.3g
CaCl₂ (anhidro). 0.3g

Solución elementos traza: 1.0 ml.

Aforado con agua destilada a 1 litro.

La solución de elementos traza presenta la siguiente composición:

MnSO ₄ ·H ₂ O	1.56g
FeSO ₄ ·7H ₂ O.	5.00g
ZnCl ₂ ó ZnSO ₄	1,67 ó 1.4g respectivamente.
CoCl ₂	2.00g
HCl al 19%.	1.00ml.
Aforado con agua destilada a 1 litro.	

Se esterilizó durante 15 minutos a 121°C. En el momento de usarlo se colocaron 50 ml. en matraces Erlenmeyer de 300 ml.

4.2 Aislamiento de microorganismos celulolíticos.

Las cepas de hongos aislados se obtuvieron a partir de materiales como estiércol de diversos animales estabulados en la Facultad de Veterinaria, UNAM, de líquido del rumen, conseguido en el Rastro Municipal de Naucalpan de Juárez, Estado de México, de composta elaborada en la Planta de Desechos Sólidos de la Ciudad de México, ubicada en San Juan de Aragón, D.F., y suelo de las zonas verdes de Ciudad Universitaria, D.F. De las muestras recolectadas en frascos estériles y diluidas con una solución isotónica estéril se tomó una alícuota de 1 ml. Con ella se hicieron diluciones progresivas y se inocularon en cajas de Petri estériles, añadiéndoles el medio de cultivo de Rosa de Bengala. De aquí, se aislaron varias cepas de hongos. Una vez aisladas las cepas, se conservaron en el medio de Sabouraud recubierto con vaselina para su selección posterior.

4.3 Selección de los microorganismos.

Inicialmente, se ensayó la actividad celulolítica de cada cepa en un medio líquido (Dubos) y en un medio sólido -- (placas de sílica gel), aquéllas que presentaron una mayor aptitud degradativa del papel filtro en ambos medios, se inocularon en el medio de fermentación, para observar su capacidad de degradación hacia el sustrato específico.

Ya en este medio de cultivo, se determinó la concentración de azúcares reductores totales sólo a las cepas que visualmente mostraron un mayor ataque hidrolítico sobre la celulosa del sustrato. Para la determinación de azúcares reductores totales se empleó el método del ácido dinitrosalicílico - (D.N.S.). (36)

4.4 Identificación de los microorganismos celulolíticos.

Los hongos seleccionados se identificaron en base a las características morfológicas de las estructuras reproductivas que desarrollaron en los microcultivos. (3)

4.5 Preparación del inóculo.

La suspensión de esporas de las cepas más activas, desarrolladas en agar-V/8, se obtuvo por agitación en un agitador Vortex. Se ajustó el número de esporas a 54×10^8 esporas/ml. aproximadamente, desarrollando con anterioridad una curva turbidimétrica.

4.6 Fuente de obtención del sustrato.

Como fuente de celulosa se empleó la cubierta de la mazorca del maíz de diferentes lugares de la República Mexicana.

4.7 Tratamientos del sustrato.

Inicialmente las cubiertas de la mazorca del maíz fueron secadas en estufa, ya secas, se molieron en un molino tipo Wiley a fin de someterlas a los siguientes tratamientos:

4.7.1 Tratamiento químico.

El sustrato se mezcló con una solución de NaOH al 1.5% en proporción 1:8 (sustrato-sosa) durante 20 horas a 29°C. El exceso de álcali se retiró con agua destilada hasta lograr un pH de 7 y el agua residual se eliminó por filtración al vacío. El secado se efectuó a 120°C durante 10 minutos.

4.7.2 Tratamiento físico y químico.

El sustrato se trató de la misma forma que en el tratamiento anterior, modificando el tiempo (1 hora) a 120°C y a una presión de 1.5 kg/cm² en el autoclave. (25)

4.8 Métodos analíticos.

Una vez inoculado el medio de fermentación con un número conocido de esporas, se realizaron las siguientes determinaciones:

4.8.1 Efecto de los tratamientos sobre el sustrato.

En matraces Erlenmeyer de 300 ml. y por duplicado, se adicionó al medio de fermentación una concentración de 1% de sustrato sometido al tratamiento químico. Se incubaron a 29°C y 120 rpm en una máquina agitadora modelo New Brunswick durante 10 días. Diariamente se determinó la concentración de azúcares reductores totales por el método del D.N.S.

De igual forma se procedió para el sustrato con tratamiento físico y químico, que reportó los mejores resultados.

4.8.2 Efecto de la concentración del sustrato.

Para ambas cepas, se probaron concentraciones de 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0% de sustrato con tratamiento físico y químico. Durante 10 días se les determinó: concentración de azúcares reductores totales, actividad en papel filtro y actividad en C.M.C.

4.8.2.1 Determinación de azúcares reductores totales.

Se recurrió al método del D.N.S. (29,36), que consta de los siguientes reactivos:

Reactivo A:

Na_2SO_3 0.05 g

Aforando a 100 ml con agua destilada.

Reactivo B:

NaOH 1.0 g

Fenol 0.2 g

D.N.S. 1.0 g

Aforando a 100 ml. con agua destilada.

El D.N.S. se agregó minutos antes de su uso, sólo a la cantidad de solución necesaria para trabajar diariamente.

Reactivo C:

Sal Rochelle (tartrato doble de sodio y potasio). 20g

Aforando a 100 ml con agua destilada.

Solución patrón de glucosa:

Glucosa anhidra. 1.0 g

Acido benzoico 0.25g

Aforando a 100 ml con agua destilada. De esta solución se hicieron diluciones para desarrollar la curva patrón.

Solución amortiguadora de citratos (pH=4.8). (57)

Citrato de sodio. 3.3 g en 50 ml de agua

Acido cítrico 1.8 g

Acido fenilmercurico. . . 0.04% en 5 ml de agua

Aforar a 100 ml con agua destilada.

Ajustar pH a 4.8, guardar en frasco de polietileno.

Procedimiento:

Cada 24 horas, en tubos de ensaye, se colocaron 3 ml del filtrado del medio de fermentación inoculado con el hongo, 1 ml de reactivo A y 1 ml de reactivo B. Se mantuvieron en ebullición durante 15 minutos, después se enfriaron al chorro del agua. En ese momento se adicionó 1 ml de reactivo C y se aforó a 10 ml. Se leyó en un espectrofotómetro Zeiss modelo PM2A a 575 nm. Los datos se reportan en mg de glucosa/ml.

La actividad celulolítica de cada cepa se ensayó mediante la determinación en papel filtro y carboximetilcelulosa.

4.8.2.2 Actividad en papel filtro (C_1). (35)

En tubos de ensaye se introdujeron tiras de papel Whatman No. 1 de 50 mg (1x6 cm) y se les agregó 1 ml de solución amortiguadora de citratos de pH=4.8 y 1 ml de filtrado del cultivo del hongo. Se incubaron por una hora a 50°C en agitación de 120 rpm. Inmediatamente se les determinó azúcares reductores totales por el método del D.N.S.

4.8.2.3 Actividad en carboximetilcelulosa (C_x). (35)

En tubos de ensaye, se mezclaron: 1 ml de solución de C.M.C. al 1%, 1 ml de solución amortiguadora de citratos de pH=4.8 y 1 ml del filtrado del cultivo del hongo calentando a 50°C por 30 minutos sin agitación e inmediatamente se procedió a determinar azúcares reductores por el método del D.N.S.

4.8.3 Tiempo de máxima actividad celulolítica.

Se determinó mediante la preparación de una gráfica donde se anota la concentración de azúcares reductores por actividad en papel filtro en la ordenada contra tiempo en la abcisa (gráfica 5.2.f).

4.8.4 Determinación de proteína extracelular.

Durante 10 días se determinó la concentración de --

proteína extracelular en el medio de fermentación mediante el método de Lowry (28), en el que se emplean los siguientes reactivos:

Reactivo A:

Na_2CO_3 20 g

NaOH 4 g

Aforando a 1 litro con agua destilada.

Reactivo B:

$\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 g

Tartrato de sodio y potasio. 10 g

Aforando a 1 litro con agua destilada.

Reactivo C:

Mezclar 1 ml de reactivo A con 1 ml de reactivo B. Dejar reposar por un día.

Reactivo D:

Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido a una concentración de 1 N. La cantidad de este reactivo a diluir se determinó por titulación con NaOH y fenolftaleína.

Reactivo E:

Solución patrón de albúmina bovina cristalina. De esta solución se hicieron diluciones para desarrollar la curva patrón de proteína extracelular.

Procedimiento:

Por cada muestra de filtrado del cultivo del hongo, se mezcló 1 ml del mismo con 1 ml de reactivo C. Se mantuvo la

mezcla en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente después se adicionó 0.1 ml de reactivo D, mezclándolo por 1 ó 2 segundos. Al transcurrir 30 minutos se realizaron lecturas en el espectrofotómetro a 500 nm. Los valores obtenidos se reportaron en mg/ml.

4.8.5 Determinación de sustrato residual y variación de pH.

Diariamente y durante un lapso de 10 días, se filtró y se llevó a peso constante la cantidad de sustrato no hidrolizado por cada cepa. El porcentaje de peso seco se obtuvo junto con el micelio del hongo dada su difícil separación del residuo celulósico. Al mismo tiempo se determinó la variación de pH en el medio de fermentación con un potenciómetro modelo Digi-Sence.

4.8.6 Efecto de aditivos.

Al medio de fermentación con 1% de sustrato se adicionó 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4% de Tween 80 y durante 6 días se determinó su efecto en: a) Actividad en papel filtro; b) Actividad en C.M.C., asimismo, se probó el efecto de la adición de la proteosa-peptona al 0.1% y 0.2%.

4.8.7 Identificación de azúcares.

El filtrado del medio de fermentación se sometió a una hidrólisis consistente en macerar dentro de una ampolla

lleta, volúmenes iguales del filtrado y HCl 8M. Se introdujo la ampollita bien sellada en una estufa a 100°C durante 4 horas. Posteriormente se abrió la ampollita y se colocó en un desecador a vacío (matraz Kitazato con KOH para neutralizar el HCl) con objeto de concentrar la muestra. Con el concentrado se realizó una cromatografía ascendente en papel, utilizando como eluyente una mezcla de isopropanol-ácido acético-agua, en proporción 3:1:1, y como revelador 0.9 g de ácido oxálico, 1.8 ml de anilina en 200 ml de agua destilada. - (8,58)

5. RESULTADOS.

5.1 Selección e identificación de los microorganismos.

De las 45 cepas de hongos aislados, resultaron seleccionadas dos de ellas:

Cepa 1: aislada de suelo de las zonas verdes de C.U.

Cepa 2: aislada de composta de la Planta de Desechos Sólidos de la Ciudad de México, ubicada en San Juan de Aragón, D.F.

Los microcultivos mostraron las características morfológicas descritas para los géneros:

Cepa 1: Mucor sp.

Cepa 2: Aspergillus sp.

5.2 Métodos analíticos.

5.2.1 Efecto del tratamiento sobre el sustrato.

5.2.1.1 Tratamiento químico.

En las gráficas 5.2.b y 5.2.c se exponen los resultados de la concentración de azúcares reductores obtenidos a partir de sustratos sometidos a tratamientos químico y físico y químico e inoculados con las dos cepas.

5.2.1.2 Tratamiento físico y químico.

En las gráficas anteriores se observa -- que la concentración de azúcares reductores totales es mayor con este tratamiento; razón por la cual fué utilizado en las determinaciones posteriores.

5.2.2 Efecto de la concentración del sustrato.

5.2.2.1 Azúcares reductores totales.

En las gráficas 5.2.d y 5.2.e se muestran los resultados para las 4 concentraciones de sustrato ensayadas para cada cepa. Observándose que con la concentración de 2% de sustrato se obtuvieron los mayores valores en ambos casos.

5.2.2.2 Actividad en papel filtro (C_1).

Los datos referentes a esta determinación aparecen en las gráficas anteriores. Con la concentración de sustrato al 1% se obtuvieron los valores más altos en ambos casos.

5.2.2.3 Actividad en carboximetilcelulosa.

Para la cepa 1, la mayor actividad corresponde a la concentración de sustrato al 1% mientras que, para la cepa 2, la concentración de mayor actividad es de 2%. Ver gráficas 5.2.d y 5.2.e.

5.2.2.4 Tiempo de máxima actividad celulolítica.

Como la actividad en papel filtro indica la acción de la fracción C_1 , la gráfica 5.2.f revela que la concentración de sustrato al 1% arroja los valores máximos - al 3/er. día para ambas cepas. Sin embargo, la cepa 2 no manifestó actividad en papel filtro en las concentraciones restantes.

5.2.3 Determinación de proteína extracelular.

La mayor concentración de proteína extracelular se obtuvo al 60. día de incubación, tanto para la cepa 1 como para la cepa 2, ver gráfica 5.2.g.

5.2.4 Determinación de sustrato residual y variación de pH.

Se nota una franca disminución del porcentaje en peso seco conforme transcurre la degradación del sustrato, ver gráfica 5.2.h. Con respecto a la variación de pH, los datos se encuentran en la gráfica 5.2.i, observándose un comportamiento más o menos constante entre el 30. y 60. días de incubación.

5.2.5 Efecto de aditivos.

5.2.5.1 Adición de Tween 80.

Pueden observarse los resultados para esta determinación en las gráficas 5.2.(j,k,j',k') referentes a la actividad en papel filtro y C.M.C para la cepa 1 y 5.2.(l,m,l',m') para la cepa 2.

5.2.5.2 Adición de proteosa-peptona.

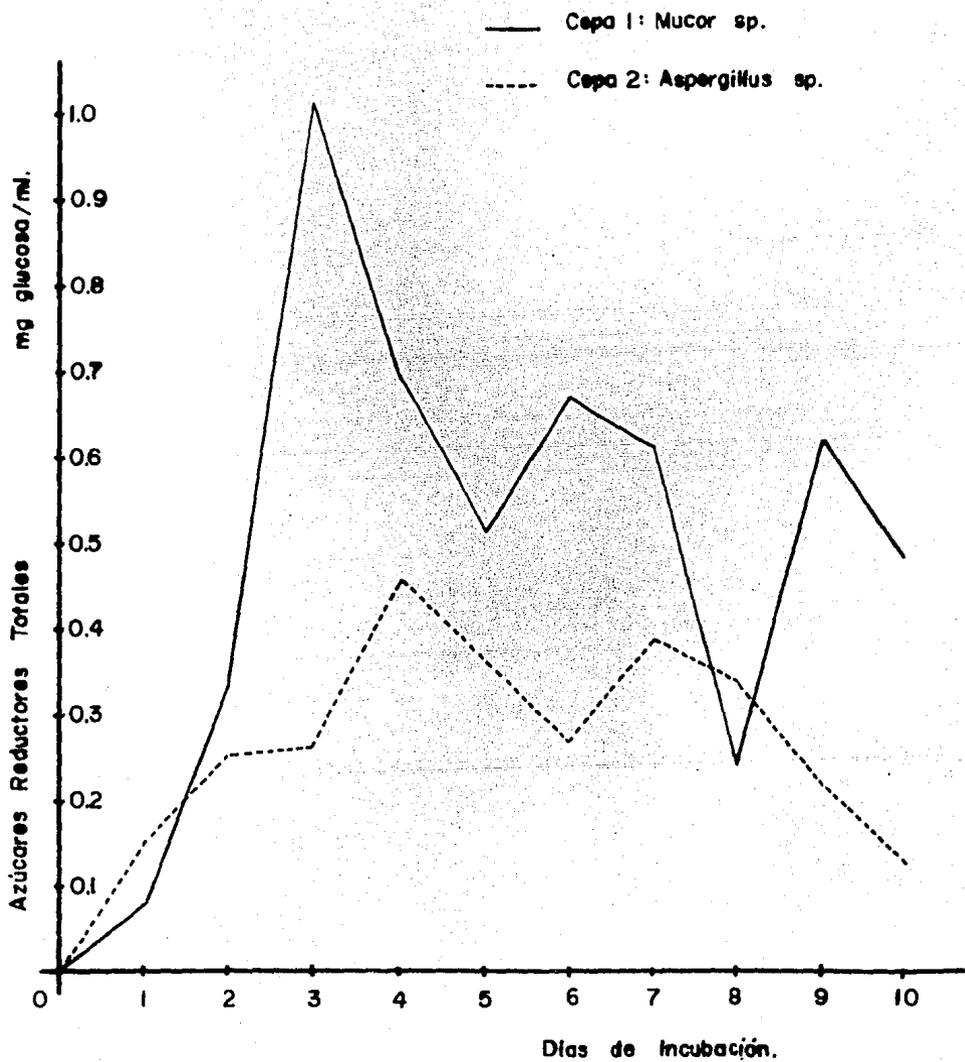
Las gráficas 5.2.n y ñ muestran los resultados obtenidos para esta determinación en la cepa 1. Para la cepa 2, ver gráficas 5.2.o y 5.2.p.

En general, tanto la adición de Tween 80 como de proteosa-peptona tienden a reducir la actividad celulolítica, que

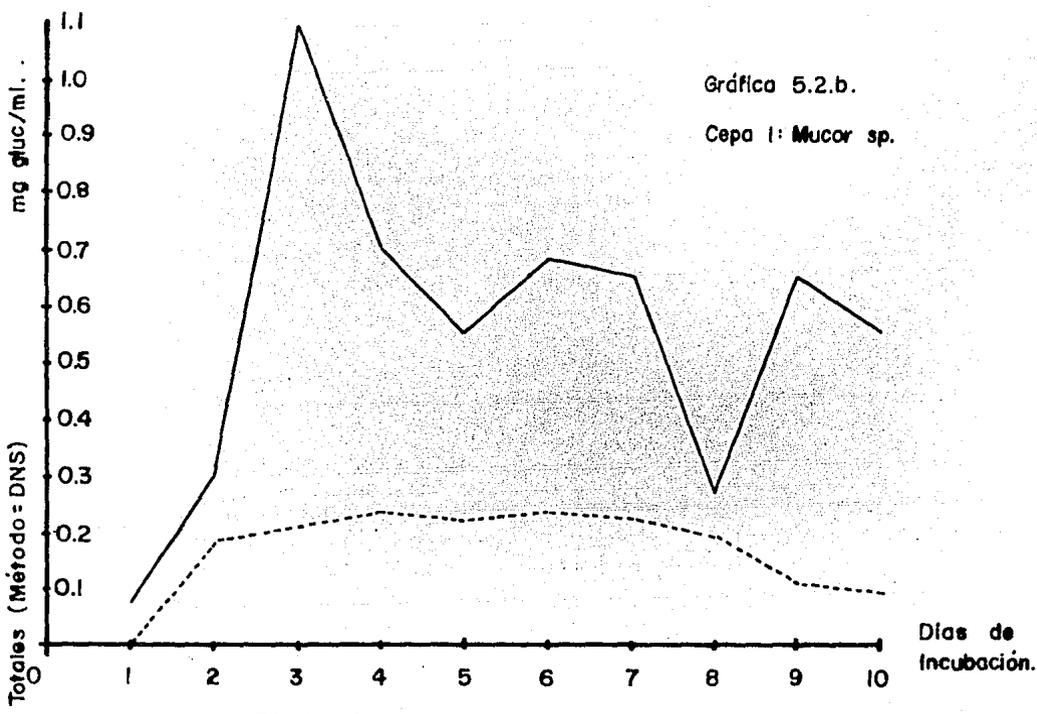
sólo se incrementó con proteosa-peptona al 0.2% para la actividad en C.M.C. y no para la actividad en papel filtro. De modo que podemos considerar que no resultó favorable su utilización.

5.2.6 Identificación de azúcares.

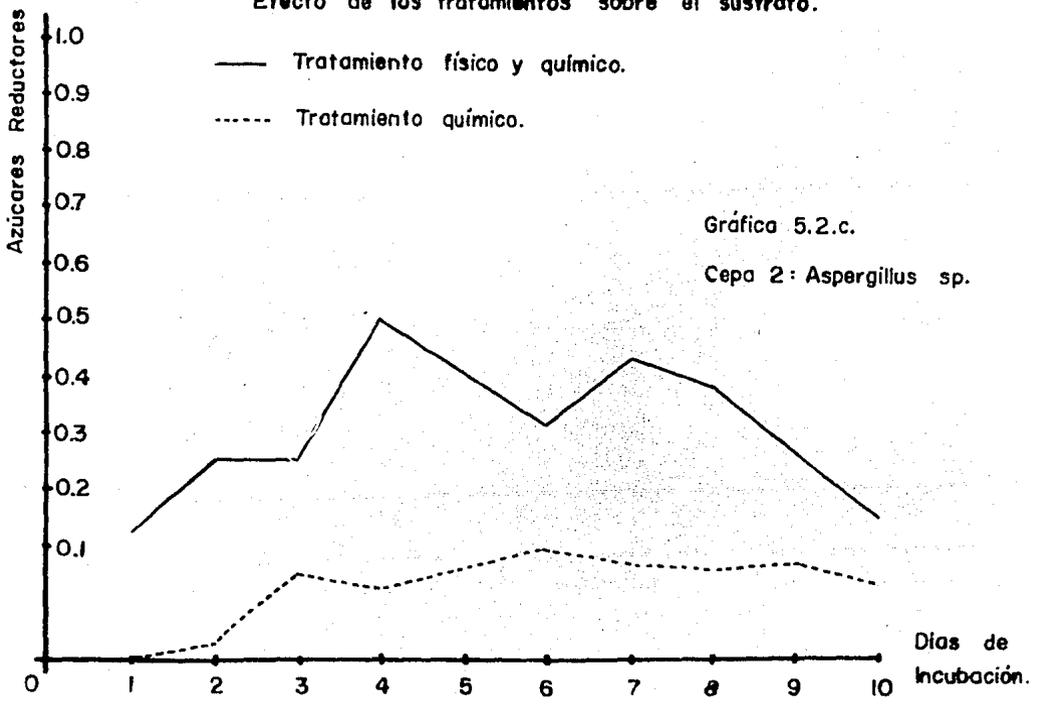
La cromatografía reveló que el azúcar reductor liberado fué xilosa, tal como se observa en la figura 2.



Gráfica 5.2.a. Determinación de Azúcares Reductores Totales.
(Método : DNS)

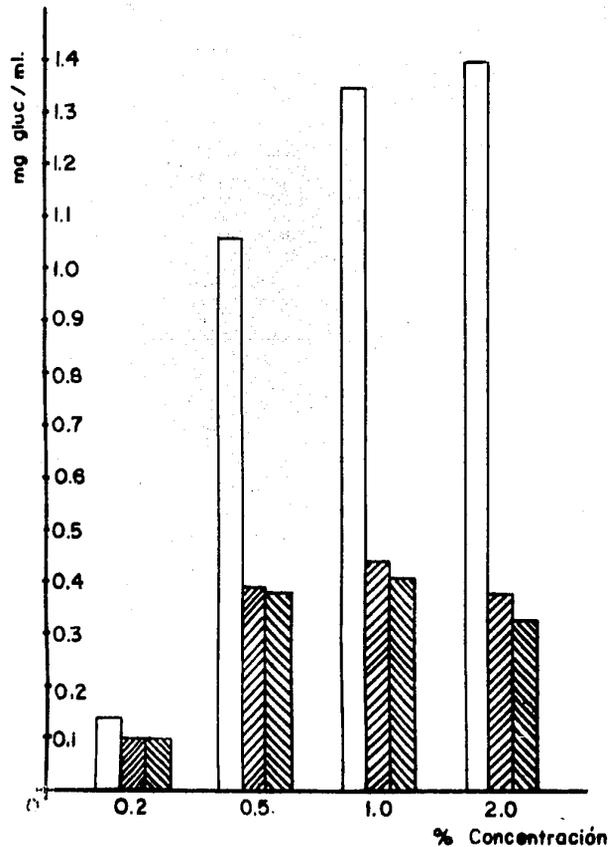


Efecto de los tratamientos sobre el sustrato.



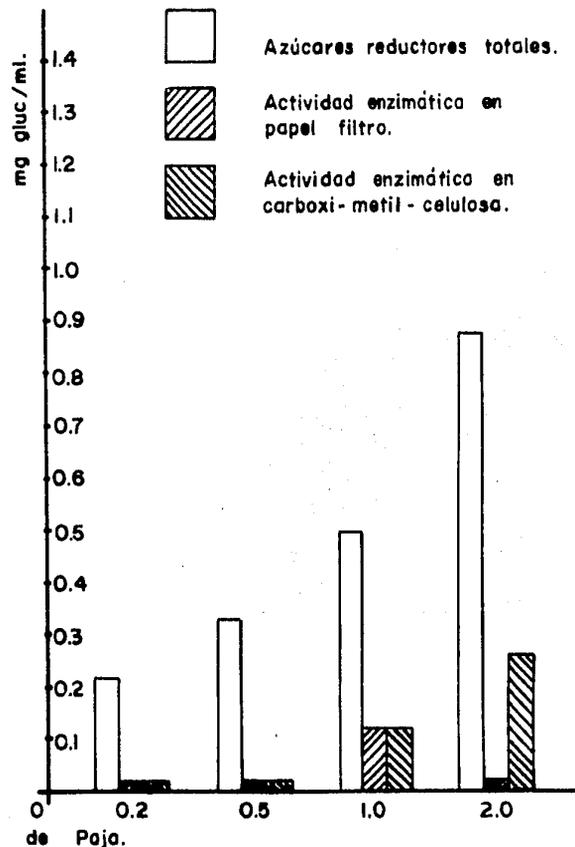
Gráfica 5.2.d.

Cepa 1: *Mucor* sp.



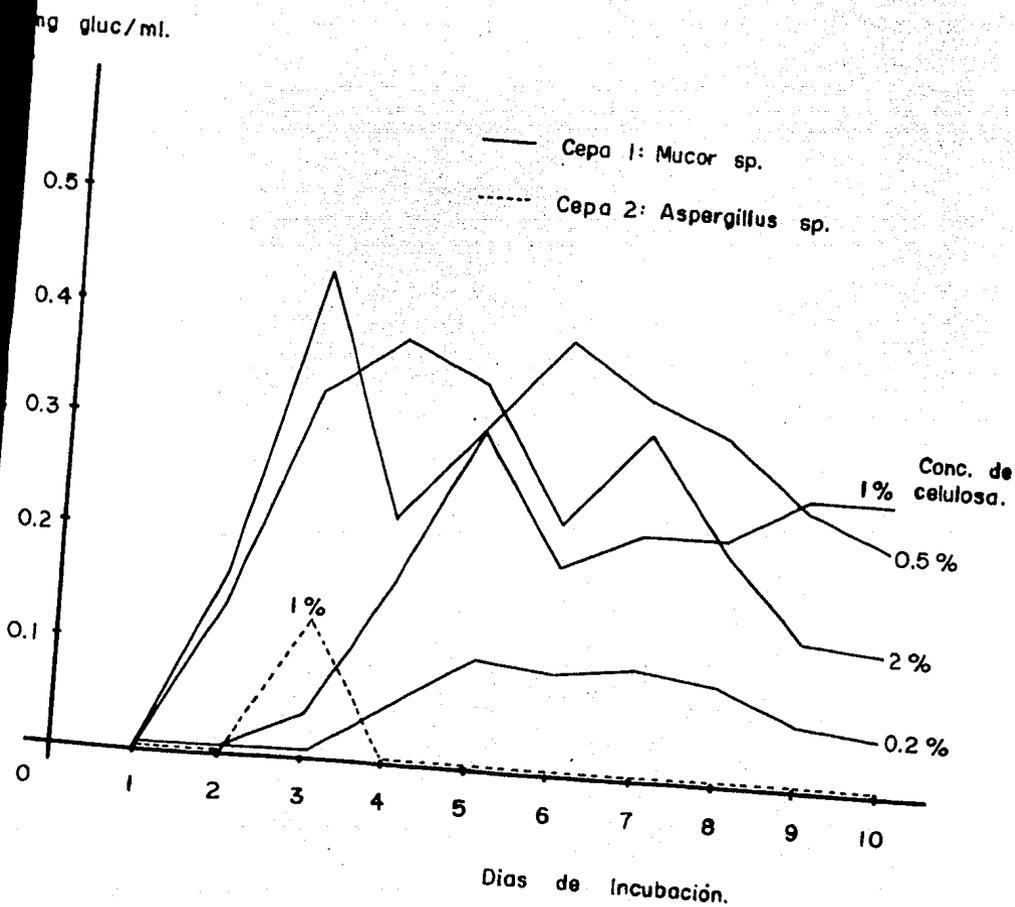
Gráfica 5.2.e.

Cepa 2: *Aspergillus* sp.



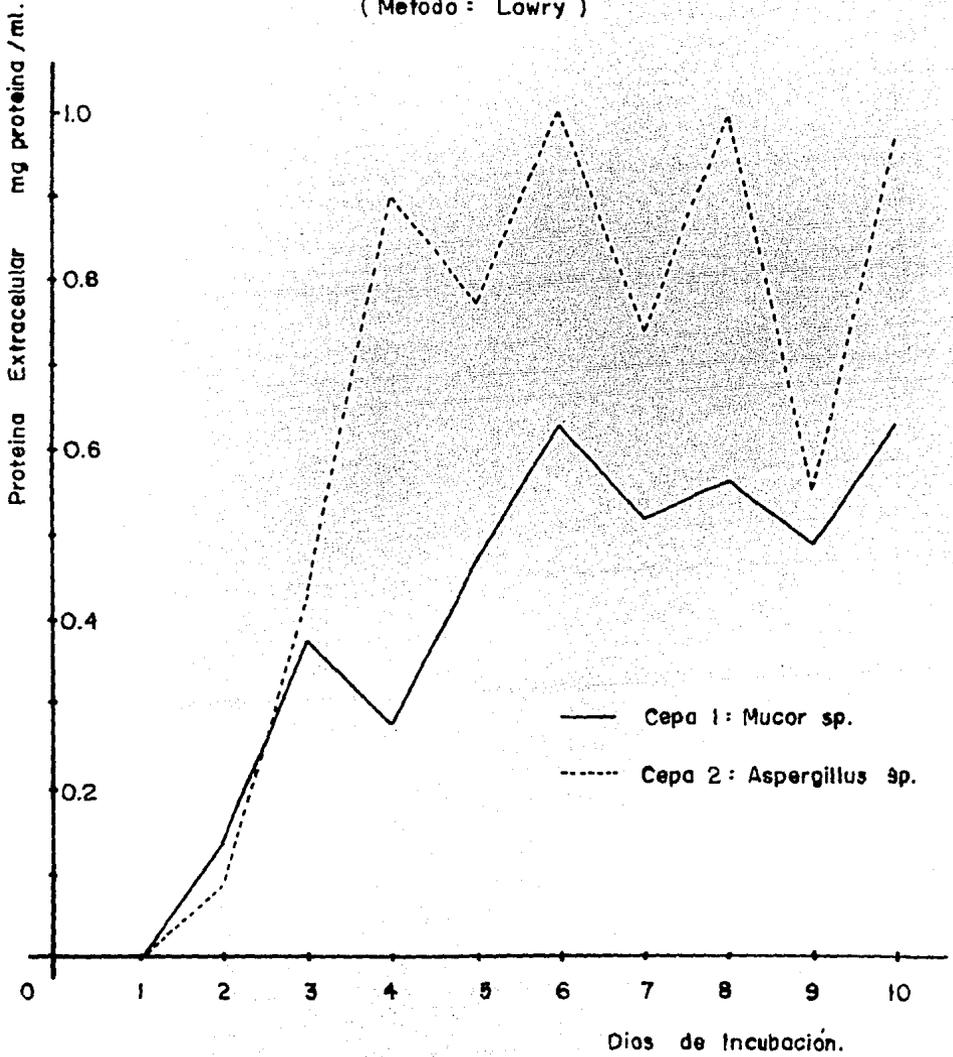
Gráfica 5.2.f

Tiempo de Máxima Actividad Celulolítica.
(en papel filtro)



Gráfica 5.2.g. Determinación de Proteína Extracelular.

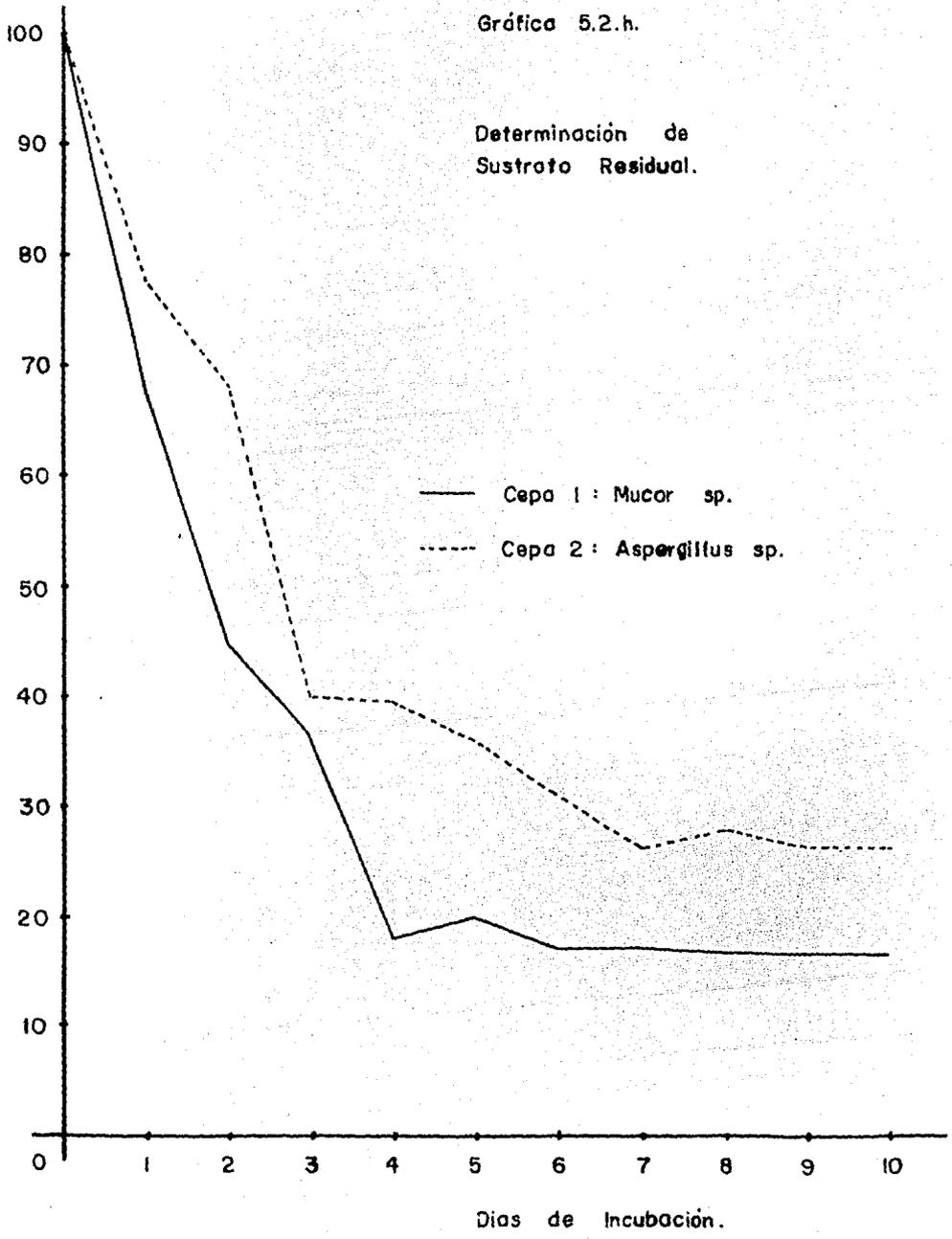
(Método: Lowry)



% Peso seco en
Sustrato Residual.

Gráfica 5.2.h.

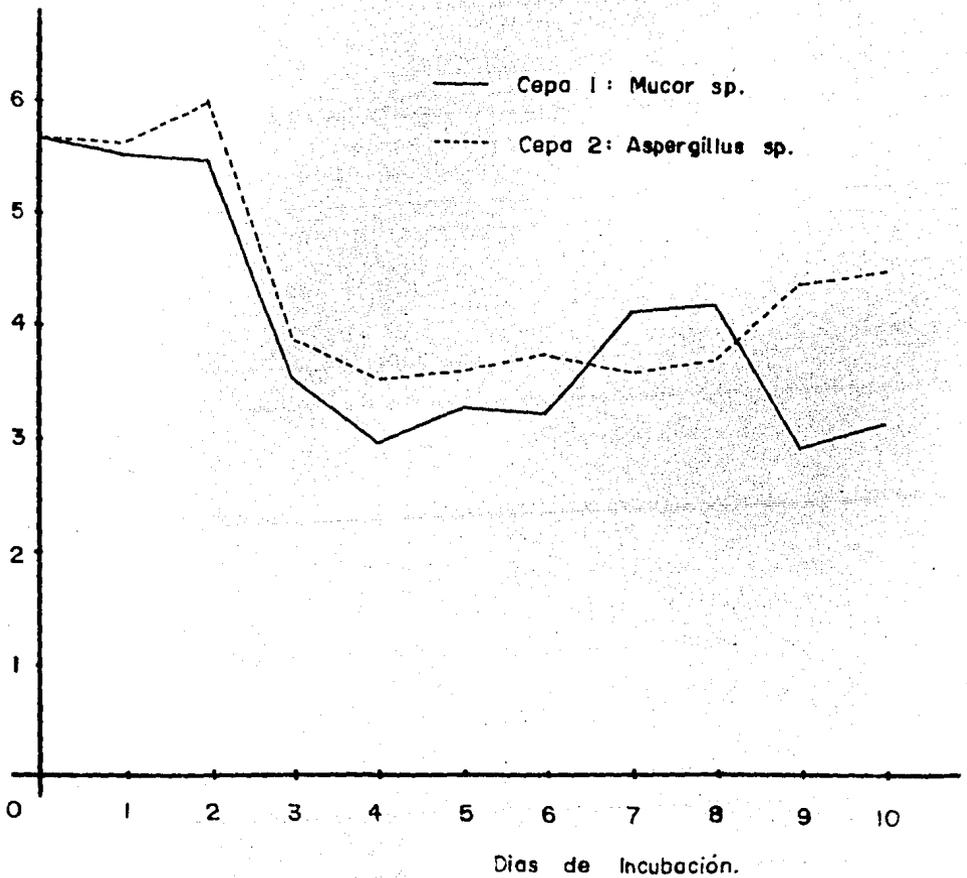
Determinación de
Sustrato Residual.



Gráfica 5.2.1.

Variación de pH.

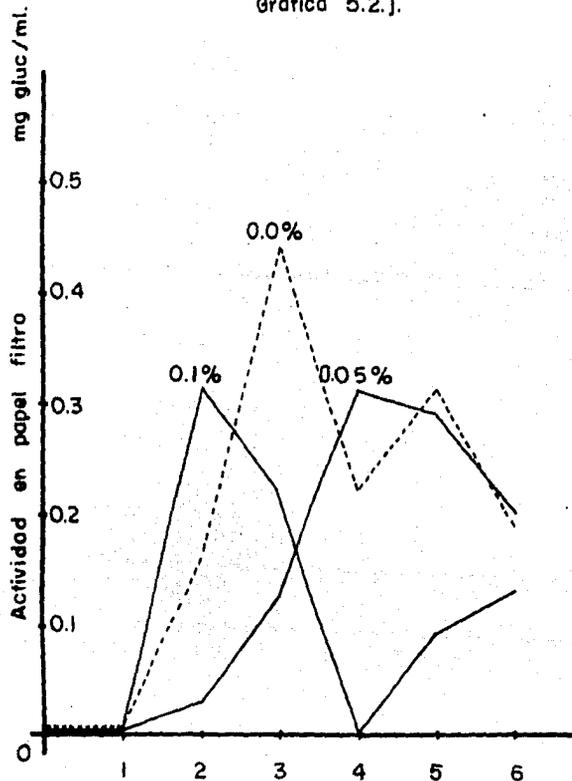
Unidades de pH.



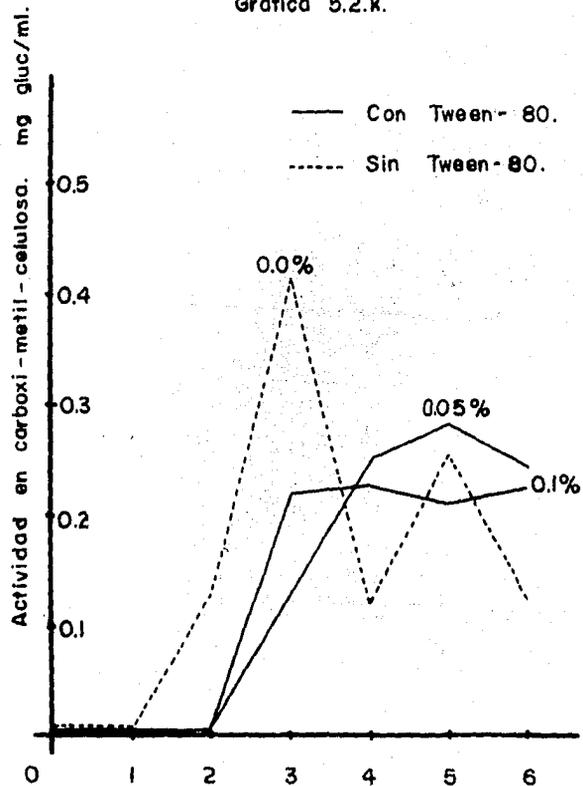
Efecto de la adición de Tween-80.

Cepa 1: Mucor sp.

Gráfica 5.2.j.



Gráfica 5.2.k.

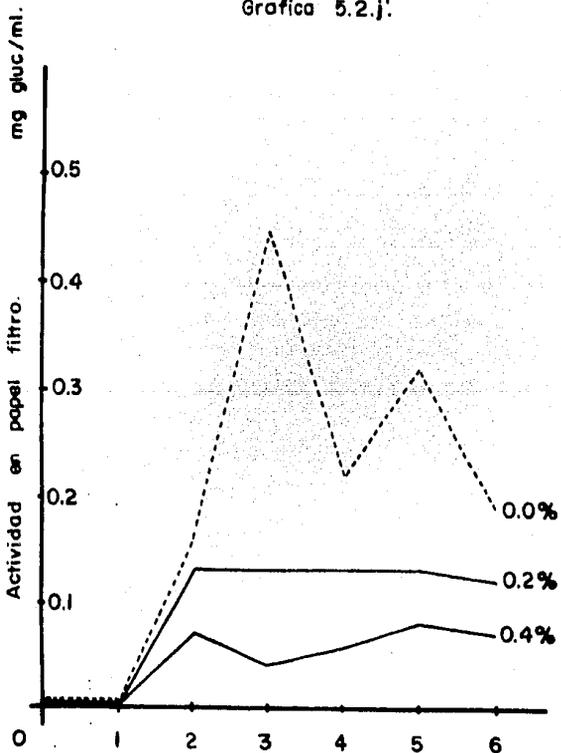


Días de incubación.

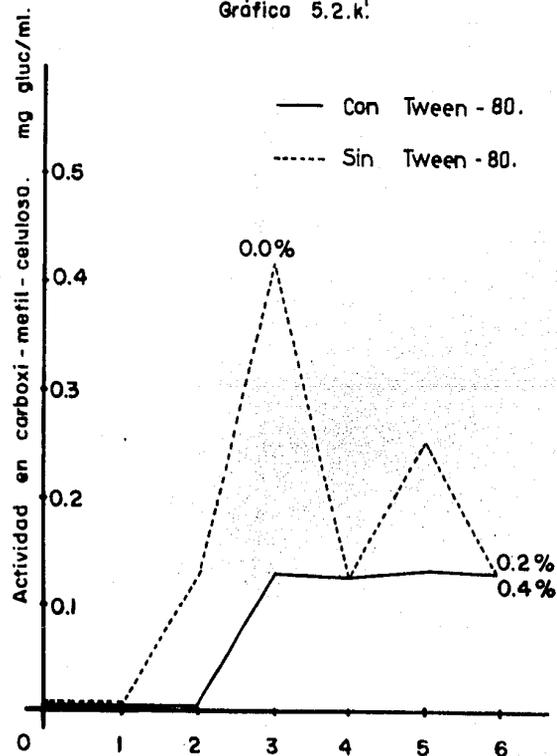
Efecto de la adición de Tween-80.

Cepa I: Mucor sp.

Gráfica 5.2.j'



Gráfica 5.2.k'

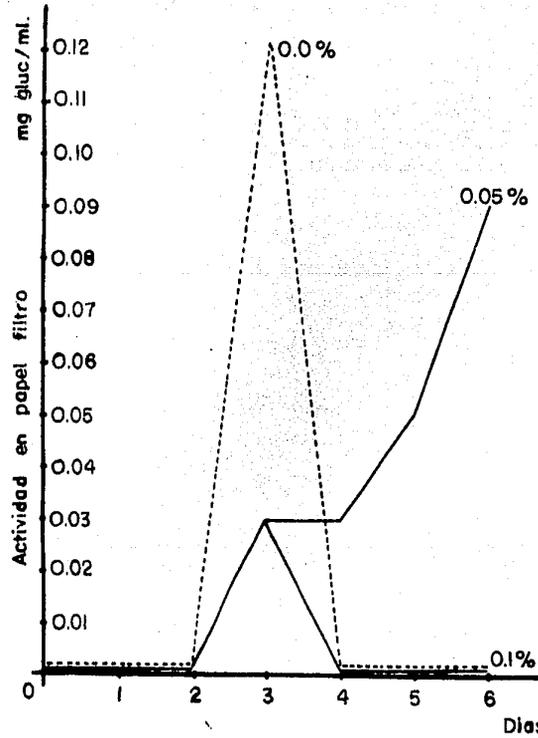


Días de incubación.

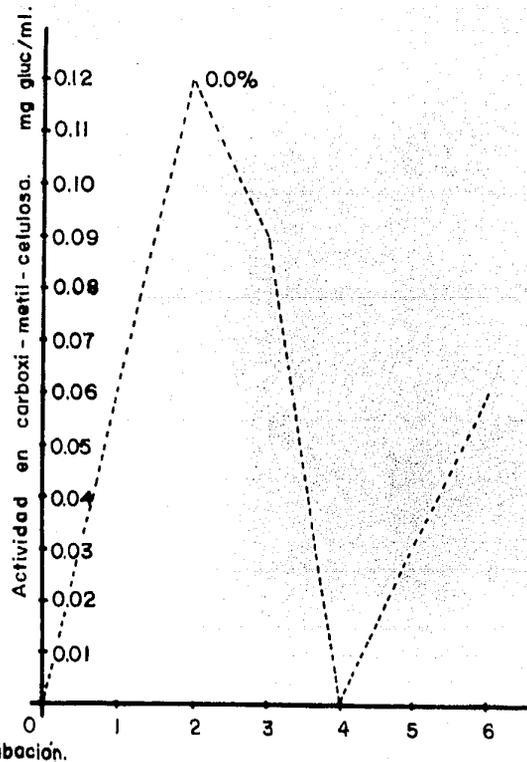
Efecto de la adición de Tween-80.

Cepa 2: *Aspergillus* sp.

Gráfica 5.2.1.



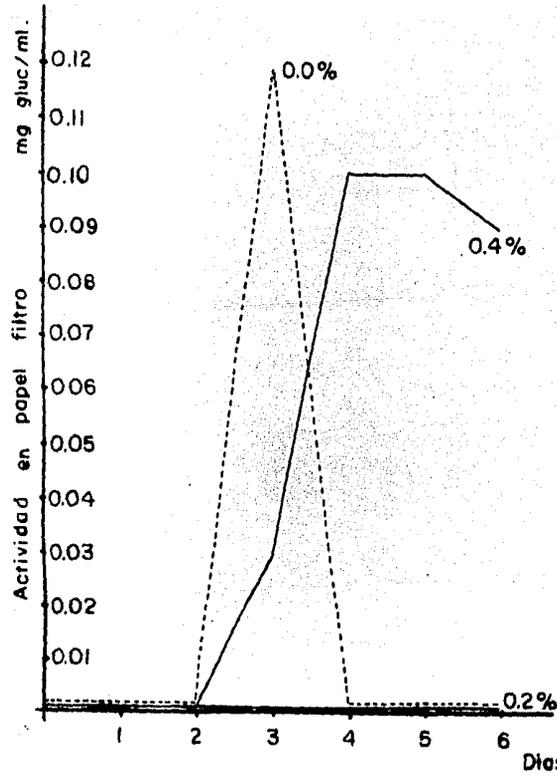
Gráfica 5.2.m.



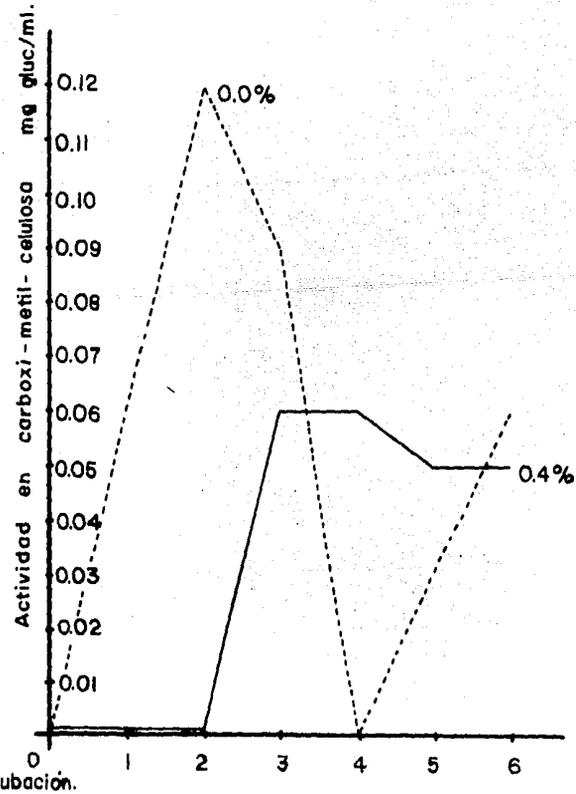
Efecto de la adición de Tween - 80.

Cepa 2: *Aspergillus* sp.

Gráfica 5.2.1.



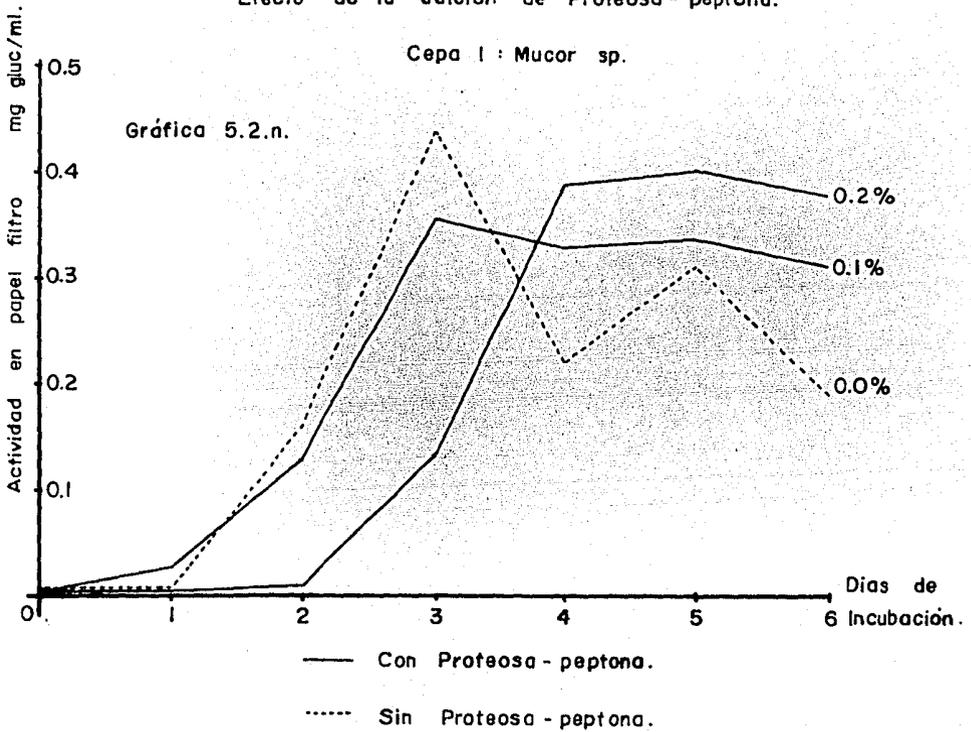
Gráfica 5.2.m.



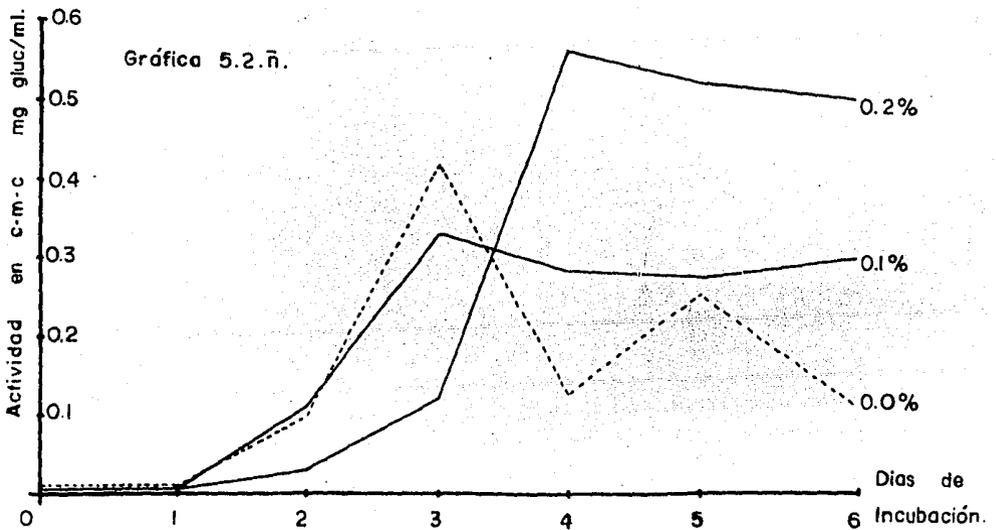
Efecto de la adición de Proteasa-peptona.

Cepa I : Mucor sp.

Gráfica 5.2.n.

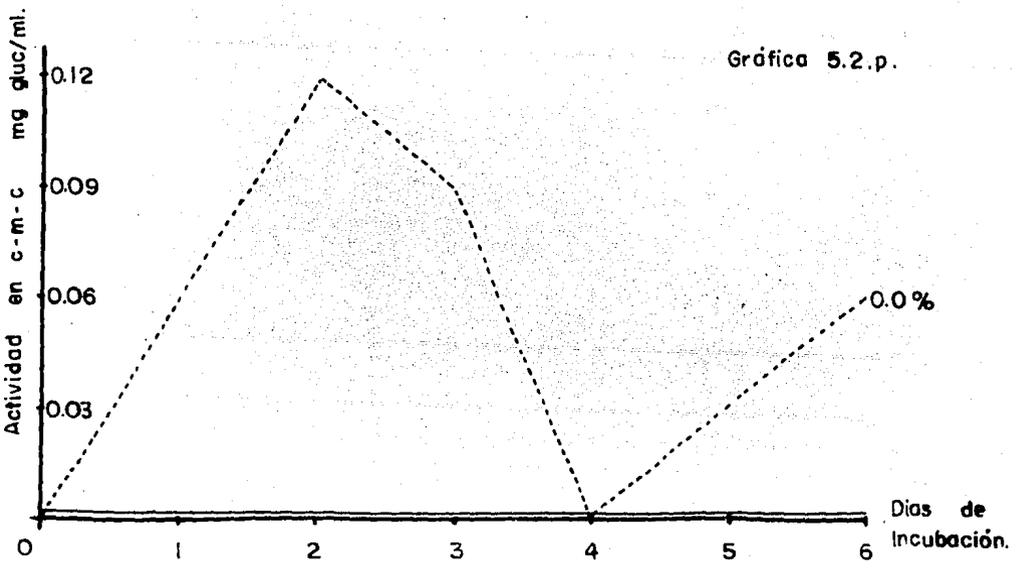
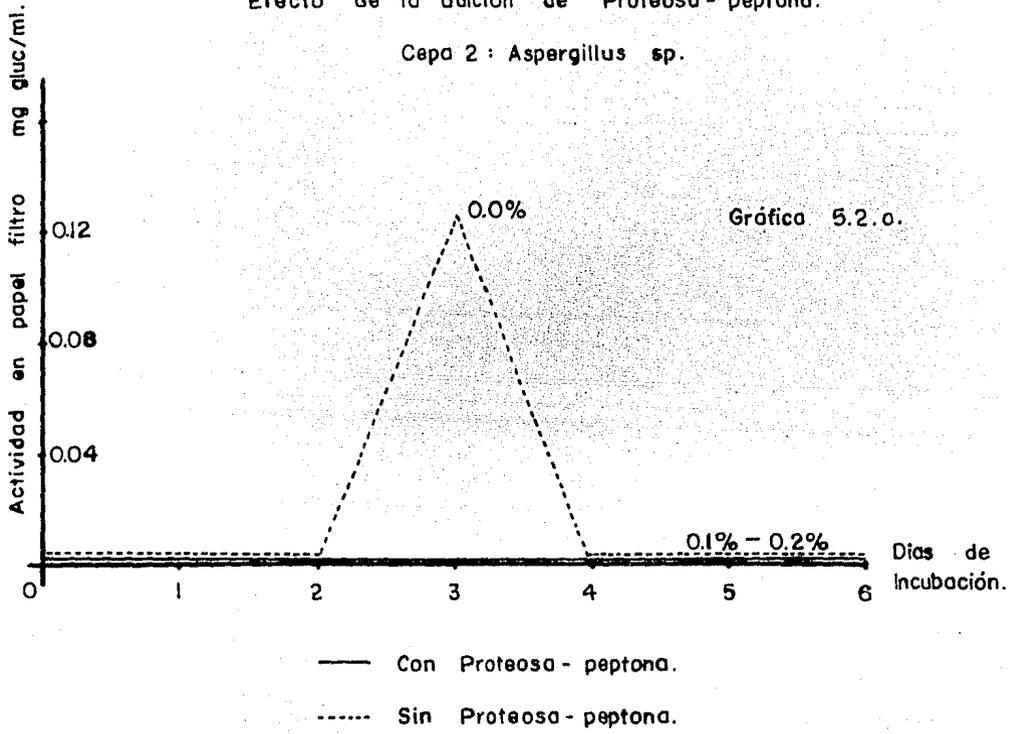


Gráfica 5.2.ñ.



Efecto de la adición de Proteosa - peptona.

Cepa 2 : *Aspergillus* sp.



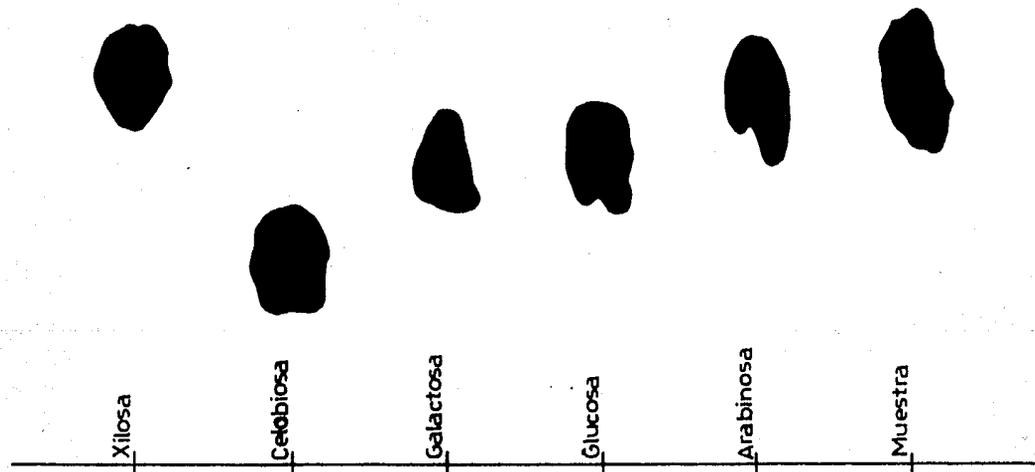


Fig. 2.- Cromatograma en papel Whatman No.1 ascendente desarrollado con isopropanol-ac.acético - agua (3:1:1) revelado con ac. oxálico - anilina.

6. DISCUSION.

Para este trabajo, se seleccionaron hongos y no otro tipo de microorganismos celulolíticos en razón de que crecen rápidamente en medios simples, no requieren de factores de crecimiento y la enzima que producen es de tipo extracelular. Así no es necesario lisar la célula para extraer las enzimas.

Inicialmente se aislaron 45 cepas, las cuales se fueron eliminando por su escaso desarrollo en el medio de cultivo - con papel filtro. Los hongos que desarrollaron en forma abundante se inocularon en el cultivo de paja de maíz. Se cuantificó la producción de azúcares reductores totales y con base en esto se escogieron finalmente las dos cepas reportadas en el trabajo.

Con referencia a los microorganismos seleccionados, la cepa 1 (Mucor sp.) no se reporta en la literatura como especie celulolítica, sin embargo en nuestro trabajo, se manifestó aún con mayor capacidad hidrolítica que la cepa 2 (Aspergillus sp.), género reportado como celulolítico (ver gráfica 5.2.a).

Por otro lado, la mayor actividad celulolítica de la cepa 1 puede explicarse debido a que la suspensión de esporas contiene una fracción micelial dadas las características morfológicas del hongo. Esto favorece un crecimiento rápido y producción de enzima mas temprana. (35)

Es recomendable para trabajos posteriores, determinar el inóculo óptimo de esporas, ya que las condiciones de cultivo fueron constantes durante la fermentación. Un número excesivo de esporas no aprovecharía eficientemente los nutrimentos y en consecuencia la hidrólisis sería deficiente. Probablemente ésto causó un bajo rendimiento de celulasas en nuestro trabajo.

La cubierta de la mazorca del maíz como sustrato celulósico se sometió a tratamientos para facilitar su ataque enzimático. Según Krupnova y colaboradores (15), el tratamiento de molienda seguido con calor, reduce la cristalinidad de los materiales celulósicos y los hace más susceptibles a la hidrólisis.

El tratamiento físico y químico que se utilizó en este trabajo contempla los aspectos anteriores y efectivamente, reporta los mejores resultados de los dos tratamientos efectuados (ver gráficas 5.2.b y 5.2.c). No obstante se presentaron algunos factores que inhibieron la acción de las celulasas, tales como: irregularidades en la superficie de contacto, pues la molienda no se realizó en el mismo molino. Krupnova menciona otros inconvenientes: secado excesivo de las fibras, reorientación de moléculas de celulosa, aparición de sustancias tóxicas producidas durante el tratamiento del residuo vegetal.

En su trabajo de investigación, Mandels y Weber (35) reportan una concentración óptima de sustrato (celulosa) de --

0.5 a 1% para la producción de celulasas. En nuestro trabajo, encontramos que una concentración de celulosa al 2% libera mayor cantidad de azúcares reductores totales (ver gráficas 5.2.d y 5.2.e); aunque cabe recalcar que nuestro interés se orienta hacia la obtención de mayor actividad de C_1 medida por la técnica de papel filtro. Y que con las dos cepas de hongos se observó que la concentración óptima de sustrato fue la misma (1%) para manifestarse la actividad de las enzimas C_1 y C_x medidas por las técnicas de papel filtro y de C.M.C., respectivamente (ver gráficas 5.2.d y 5.2.e).

En cuanto a la actividad en papel filtro, la cepa 1 produjo 0.44 mg/ml de azúcares reductores, mientras que la cepa 2 solamente produjo 0.12 mg/ml. Para la actividad en C.M.C. la cepa 1 produjo 0.41 mg/ml y la cepa 2 produjo 0.12 mg/ml (ver gráficas 5.2.d y 5.2.e)

En experimentos realizados por Mandels y Weber (35) con varias cepas de Trichoderma viride, la actividad en papel filtro mas alta fue de 2.82 mg/ml y la más baja fue de 0.22 mg/ml. De estos valores puede señalarse que la cepa 1 es más eficiente que la cepa 2 en la producción de enzimas C_1 y C_x . Al compararse con los valores reportados para T. viride, se observa que la enzima C_1 de Mucor sp (cepa 1) representa un valor de 16% del valor de la enzima C_1 de T. viride.

En estudios realizados (35) con celulasas de T. viride, el tiempo de máxima actividad celulolítica con diferentes con

centraciones de sustrato se observa que varía de 7 a 15 días de incubación. En nuestro trabajo, el tiempo de máxima actividad celulolítica se presentó al tercer día, esto indica una mayor capacidad de síntesis de celulasas por las cepas de Mucor sp. y Aspergillus sp. (ver gráfica 5.2.f) en comparación con la de T. viride.

En la producción de celulasas por T. viride se ha reportado como esencial la utilización de proteosa-peptona por el cultivo del hongo. Estudios hechos por Ghose y colaboradores (15) reportaron una concentración de proteína extracelular de 2 mg a los 9 días de incubación, en un medio de cultivo adicionado de 0.075% de proteosa-peptona y 0.2% de Tween 80. Sin embargo, para las cepas 1 y 2 no resultó favorable su utilización. Puede observarse que la presencia de ambos aditivos produce baja concentración de azúcares reductores ó la concentración es prácticamente nula. Solamente hay un incremento de azúcares reductores con 0.2% de proteosa-peptona en actividad en C.M.C., aunque nos interesaba más la actividad en papel filtro. Por ello no empleamos aditivos en nuestras determinaciones. Esto significaría una ventaja importante de nuestras cepas sobre T. viride (ver gráficas 5.2.j hasta p).

La máxima concentración de proteína extracelular que se determinó fué de 1.1 mg/ml al 60. día. Es de hacerse notar la aparición de la mayor cantidad antes del 90. día (ver gráfica 5.2.g). De acuerdo con estos resultados, la cepa 2 mostró la concentración más alta de proteína extracelular y en conse---

cuencia debió manifestar mayor actividad celulolítica, sin embargo, la concentración de azúcares reductores totales liberados al medio de cultivo fué más baja. Esto nos indica que su capacidad degradativa es menor en comparación con la cepa 1.

Los valores de pH fueron muy variables, igual cosa sucedió con la concentración de azúcares reductores totales. Posiblemente cada cepa consumió los azúcares liberados al medio y al agotarlos, no teniendo otra fuente de carbono asimilable, recurrió nuevamente a la celulosa. La liberación de azúcares reductores al medio de cultivo por hidrólisis de la celulosa causó un descenso en el pH y a medida que se consumieron dichos azúcares se elevó el pH del sistema. Cuando se presentó la máxima actividad celulolítica expresada por la máxima cantidad de azúcares liberados, el valor de pH fué de 3.55 para las 2 cepas (ver gráfica 5.2.i.). De acuerdo con la literatura consultada, para una hidrólisis amplia de celulosa, el valor óptimo de pH es de 4.8 (35), tal vez debido a este bajo valor de pH nuestras cepas presentaron baja actividad enzimática.

El porcentaje de sustrato residual se determinó cada 24 horas como filamento micelial dada la dificultad de la separación de la paja no hidrolizada. Para la cepa 1, la disminución del contenido de paja fué más notoria que para la cepa 2 (ver gráfica 5.2.h.). Justamente al día siguiente de la máxima

actividad enzimática.

Para la cepa 2, el porcentaje de sustrato residual fué -- mayor, lo cual indica una baja actividad celulolítica de esta cepa de Aspérgillus sp.

Finalmente, la cromatografía en papel reveló que el azúcar liberado al medio fué xilosa.

7. CONCLUSIONES.

Entre los hongos aislados y seleccionados, la cepa 1 (Mucor sp.) mostró mejor capacidad celulolítica que la cepa 2 (Aspergillus sp.).

La cepa 1 presentó mayor actividad hidrolítica en los sustratos de papel filtro y carboximetilcelulosa, aún cuando la concentración de su proteína extracelular haya sido más baja que para la otra cepa. Además se encontró, que el porcentaje de paja residual fué menor. En cambio, la cepa 2 actuó con mayor actividad hidrolítica sobre carboximetilcelulosa.

Al comparar la actividad celulolítica de las dos cepas de hongos seleccionados con la actividad de Trichoderma viride, se encontró que ésta es menor con respecto a T.viride.

Los posibles factores que pudieron haber influido en esto son:

- La naturaleza química del sustrato que pudo presentar obstáculos para el ataque enzimático.
- El tratamiento al que se sometió el sustrato no fué uniforme y esto pudo haber causado alteraciones al sustrato.
- Los aditivos empleados no mejoraron la actividad celulolítica de las cepas de hongos.
- En el trabajo no se controló el pH durante la biodegrada-

dación de la celulosa.

- La concentración del inóculo fúngico, tal vez, no fué adecuada.

Sin embargo, es posible que optimizando estas condiciones y experimentando otros aditivos podría incrementarse la actividad celulolítica sobre este sustrato.

Las aplicaciones que podría tener este trabajo son:

- La utilización de este residuo agrícola en la industria de fermentaciones para obtener azúcares simples, ya que su uso, actualmente es de tipo doméstico y alimenticio, como forraje.
- Como perspectiva en la producción de biomasa, ya que sólo de manera visual, se observó que la adición de proteosa-peptona y tween 80, incrementa notablemente el desarrollo fúngico.
- Finalmente, otra aplicación puede ser la obtención de xilosa, que actualmente se obtiene de las hojuelas de maíz y se emplea en el curtido y teñido, así como también en alimentos para diabéticos.

8. RESUMEN.

Se procedió al aislamiento de hongos con capacidad celulolítica de sustratos tales como estiércol de diversos animales, líquido ruminal, composta y suelo de jardín de Ciudad Universitaria, D.F., empleando el método de diluciones crecientes con inoculación en el medio de Rosa de Bengala-Estreptomocina-Agar. Al utilizar esta técnica, se aislaron 45 cepas de hongos pertenecientes a diferentes géneros.

La actividad celulolítica de las 45 cepas fué probada en el medio líquido de Dubos y en el medio sólido de sílica-gel, ambos conteniendo papel filtro como única fuente de carbono.- Con ésto, se logró hacer una primera selección de los hongos celulolíticos.

Los hongos escogidos fueron sometidos a una segunda selección al ser inoculados al medio de cultivo mineral de Reese, adicionando como sustrato celulósico la cubierta de la mazorca de maíz. La capacidad celulolítica de los hongos fué determinada mediante la cuantificación de los azúcares reductores liberados al medio, por el método D.N.S. De estos experimentos se seleccionaron dos cepas de hongos celulolíticos que de acuerdo con sus características morfológicas de microcultivo corresponden a los géneros Mucor sp y Aspergillus sp. El primero fué aislado de un suelo de jardín de la Ciudad Universitaria y el segundo de una composta procedente de la Planta de Desechos Sólidos de San Juan de Aragón, D.F.

En cuanto al sustrato celulósico (cubierta de la mazorca del maíz) fué sometida a un tratamiento químico y a uno físico y químico, encontrándose que en el segundo método hubo mayor liberación de azúcares reductores; motivo por el cual fué seleccionado y empleado en todos los experimentos siguientes.

Para determinar la concentración óptima de sustrato celulósico tratado se llevaron a cabo una serie de fermentaciones en matraces utilizando el medio mineral de Reese adicionado del sustrato celulósico en cantidades 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0%. Los matraces fueron inoculados con una suspensión de esporas de los hongos Mucor sp y Aspergillus sp respectivamente y después de ser incubados se determinó la actividad de celulasa mediante la técnica de papel filtro y carboximetilcelulosa, midiendo la cantidad de azúcares reductores liberados con el método del D.N.S. Se encontró que la concentración óptima de sustrato celulósico fué de 1% para las dos cepas de hongos y en especial para la prueba de papel filtro. La máxima actividad celulolítica aconteció al tercer día de incubación.

Para la determinación de la proteína extracelular se empleó el método de Lowry, encontrándose su mayor cantidad a los 6 días de crecimiento de los hongos Mucor sp y Aspergillus sp con valores de 0.63 mg/ml y 1.1 mg/ml de medio de cultivo, respectivamente.

En cuanto al porcentaje de sustrato residual (paja no atacada) la cepa de Mucor sp dejó sin atacar 16.5% de sustrato y la cepa de Aspergillus sp, 26.6%. Esto indica la presencia de un complejo enzimático más activo en la cepa de Mucor sp.

El pH fué medido durante todo el proceso fermentativo observándose que las variaciones más notables coincidieron con el tiempo de máxima actividad celulolítica (3/er.día) y mayor concentración de proteína extracelular (6/o.día).

Al adicionar al medio de Reese, proteosa-peptona o - - tween 80 a diferentes concentraciones, se encontró que dichas sustancias no incrementaron la actividad celulolítica.

El análisis de cromatografía en papel del medio de fermentación indicó que el azúcar reductor liberado por la hidrólisis enzimática de la paja corresponde a xilosa.

Debido a la baja capacidad celulolítica encontrada en las cepas de hongos aisladas, se supone que optimizando las condiciones de biosíntesis se podría aumentar la producción de celulasas.

Finalmente, las aplicaciones prácticas de este trabajo podrían ser en:

- La utilización de un residuo agrícola abundante.
- La obtención de xilosa para su empleo en diversos procesos industriales.

9. BIBLIOGRAFIA.

1. ALEXANDER, M., 1980, "Introducción a la Microbiología del suelo" E.G.T. Editor, 163-177, México, D.F.
2. Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos, - 1980, Secretaría de Programación y Presupuesto.
3. BARNETT, H.L., HUNTER, B.B., 1972, "Illustrated Genera of Imperfect Fungi", Burgess Pub. Co., U.S.A.
4. BELLAMY, D.W., 1974, "Single Cell Proteins for Cellulosic Wastes", Biotech. and Bioeng. Vol.XVI, - - pp. 869-879, U.S.A.
5. BOURGESS, H., LUISELLI, C., 1979, "Proteína Unicelular ¿Una respuesta al problema de la alimentación? Información Científica y Tecnológica, Vol. 1,- No.3, pp. 5-7, México.
6. BUNKER, J.J., 1968, "Source of Single-Cell Protein. -- Perspective and Prospect. Single Cell Protein" Mateles R.I. and Tamembaum, Ed., pp.67-78, USA.
7. CALLIKAN, C.D., DUNLAP, C.E., 1971, "Construction of a Chemical Microbial Pilot Plant for Production of Single Cell Protein from Cellulosic Wastes", U.S. Environmental Protection Agency - Rep. S W-24 C.
8. CLARK, J.M., SWITZER R., 1977, "Experimental Biochemistry", Freeman and Company, U.S.A. pp. 151-152.
9. CROWLING, E.B., KIRK, T.K., 1976, "Properties of Cellulose and Lignocellulosic materials as substrate for enzymatic conversion process", Biotech. and Bioeng. Symp., No. 6, pp. 95-123
10. DE LA TORRE, M.M., 1981, "Producción de Proteínas a partir de Residuos Lignocelulósicos", Ciencia y - Desarrollo, No.37, pp.111-116, México.

11. DUBOS, J., 1928, "The Descomposition of Cellulosic by Aerobic Bacteria", J.of Bacteriology, Vol.15, pp.223-224, U.S.A.
12. EDDY, B.P., 1969, "Microbial Spoilage", Biochemistry of Industrial Microorganism", Academic Press pp.491-493, Londres.
13. FAN, L.T., LEE, Y., BEARDMORE, D., 1983, "Mechanism of the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Effects of Major Structural Features of Cellulose on Enzymatic Hydrolysis", Biotech. and Bioeng., Vol.XXVII, Suppl. 1, pp.17.
14. FLORES, J.A.M., 1980, "Bromatología Animal", Limusa, pp. 320-322, México.
15. GHOSE, T.K., 1977, "Cellulase Biosynthesis and Hydrolysis of Cellulosic Substances", Adv.Biochem. Eng., Vol.6, pp.40-46, 50-58, 60, Alemania.
16. GILBON, A., LARIOS, G., HUITRON, C., 1981, "Aislamiento y Selección de hongos productores de celulasa que degradan celulosa cristalina". Tecnología Química Alimentos, Vol.XVI, No.3, pp.24-28 México.
17. GIRARD, H., ROUGIEUX, R., 1958, "Techniques de Microbiologic Agricole", pp.108-109,170, Dunod, Paris.
18. HALLIWELL, G., 1966, "Solubilization of Native and Derived Forms of Cellulose by Cell-Free Microbial Enzymes", Biochem. J. Vol. 100, pp.315-320
19. HAN, Y.W., 1979, "Microbiology of Cellulose Descomposition", Seminario de Biotecnología, pp. 81, - 90, 91, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., México.

20. HERR, D., 1980., "Conversion of Cellulose to Glucose - with Cellulase of Trichoderma viride ITCC-1433" Biotech, Bioeng. Vol. XXII, pp. 1601-1612.
21. HONEYMAN, J., 1959, "Recent Advances in the Chemistry of Cellulose and Starch Interscience Publishing, U.S.A.
22. HORTON, G.L., RIVERT, D.B., 1980, "Preparation of Cellulosic for Enzymatic Conversion" IND. Eng. - Chem. Prod. Res. Dev. 19, pp. 422-429.
23. HUMPREY, A.R., 1975, "Economical Factors in the Assessment of Various Cellulosic Substances as Chemical and Energy Resources", Biotech. Bioeng. -- Symp. No.5, 45-65, John Wiley and Sons Inc. N.Y
24. HUMPREY, A.E., MOREIRA, A., ARMIGER, W., ZABRISKIE, D., 1977, "Production of Single-Cell Protein for Cellulose Wastes", Biotech. Bioeng. Symp. No. 7 pp. 7, 45-64.
25. JACKSON, M.G., 1978, "Métodos de Tratamiento de la Paja para la alimentación animal", Evaluación de su viabilidad técnica y económica, Estudio FAO: -- Producción y Sanidad Animal, ONU para la agricultura y la alimentación, Roma.
26. KATZ, M., REESE, E.T., 1968, "Production of Glucose by Enzymatic Hydrolysis of Cellulose", Appl. Microbial, Vol.16, pp'419-420.
27. KNAPP, J.S., HOWELL, J.A., 1978, "Treatment of Primary Sewage Sludge with Enzymes", Biotech. Bioeng. - Vol.20, No.8, pp. 1221-1234.
28. LOWRY, H.O., ROSENBROUGH, N.J., FARR, L.A., RANDALL, R.J 1951, "Measurement with the Folin Phenol Reagent J. Biol. Chem. Vol. 193, pp. 265-275, U.S.A.

29. LYNCH, M.J., 1972, "Métodos de Laboratorio", Interamericana, S.A., pp. 106-107, 114, México.
30. MANDELS, M., 1976, "Microbial Sources of Cellulases", - Biotech. Bioeng. Symp. No. 6, pp.21-34.
31. MANDELS, M., ANDREOTTI, R., ROCHE, CH., 1976, "Measurement of Saccharifying Cellulase" Biotech. Bioeng. Symp. No. 6, pp.21-33.
32. MANDEL, M., HONTZ, L., NYSTROM, J., 1974, "Enzymatic - Hydrolysis of Waste Cellulase", Biotech. Bioeng. Vol.16, pp. 1471-1493.
33. MANDELS, M., REESE, E.T., 1957, "Induction of Cellulase in Trichoderma viride as influenced by Carbon Source and Metals", J. Bacteriol., Vol. 73 pp. 263-279.
34. MANDELS, M., REESE, E.T., 1960, "Induction of Cellulase in Fungi by Cellobiose", J. Bacteriology -- Vol. 79, pp. 816-826.
35. MANDELS, M., WEBER, J., 1969, "The production of Cellulases", Adv. Chem Serie 95-391, American Chemical Society, pp. 391-411, Washington, D.C.
36. MILLER, G.L., 1959, "Use of Dinitrosalicylic acid reagent for Determination of Reducing Sugar", Analytical Chemistry, Vol.31, pp. 426-428, U.S.A.
37. MONROY, O., VINIEGRA, G., 1981, "Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos" A.G.T. Editor, México.
38. MOO-YOUNG, M., CHAHAL, D.S., VLACH, D., 1978, "Single-Cell Protein from Various Chemically pretreated wood substrates using Chaetomium cellulolyticum", Biotech. and Bioeng., Vol. 20 (1), - - pp. 107-118.

39. MOO-YOUNG, M., MOREIRA, A.R., DAUGULIS, A.J., ROBINSON, C.W., 1979, "Bioconversion of agricultural wastes into animal food and fuel gas", Biotech and Bioeng. Symp. 8, pp.205-218.
40. NISIZAWA, T., SUSUKI, H., NISIZAWA, K., 1972, "Catabolite repression of cellulase formation in Trichoderma viride", J. Biochem., Vol.71, pp.999-1007.
41. PEITERSEN, N., 1975, "Cellulase and protein production from mixed cultures of Trichoderma viride and a yeast". Biotech. and Bioeng., Vol. 17, pp. - - 1291-1299.
42. PEITERSEN, N., 1975, "Production of cellulase and protein from barley straw by Trichoderma viride",- Biotech. and Bioeng., Vol.17, pp. 361-374.
43. PEITERSEN, N., 1977, "Continuous cultivation of Trichoderma viride on cellulose". Biotech. and Bioeng Vol. 19, pp.337-348.
44. PROGRAMA NACIONAL DE RESIDUOS FORRAJEROS, 1979, INIA.
45. QUINTERO, R.R., 1979, "Análisis de alternativas para la producción industrial de proteína a partir de - celulosa". Seminario de Biotecnología, Dpto. de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Bio médicas, U.N.A.M., pp.1-11.
46. REESE, E.T., SIU, R.G.H., LEVINSON, H.S., 1950, "The Biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationships to the mechanism of - cellulose hydrolysis", J. Bacteriology, Vol. 59 pp. 485.
47. REESE, E.T., LEVINSON, H.S., 1952, "A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganism" Physiol-Plantarum, Vol. 5, pp. 345-366.

48. REESE, E.T., MANDELS, M., 1978, "Stability of the cellulase of Trichoderma reesei under use conditions Biotech. and Bioeng., Vol.20, pp.1291-1293.
49. REVUELTAS, L.G., 1953, "Bromatología, Zootecnia y Alimentación animal", pp.485-486, Salvat Editores, España.
50. SELLEY, K., MAITTAND, D.C., 1967, "The cellulase of Trichoderma viride. Separation of the components - involved in the solubilization of cotton", Biochem. J., Vol. 104, pp. 716-724.
51. SRENIVASAN, M.C., RAO, M., 1978, "Utilization of cellulose for the production of glucose and single-cell protein", Hindustan antibiotics bulletin, Vol. 19-20, pp. 31-46, India.
52. SIU, R.G.H., 1951, "Microbial descomposition of cellulose", Reinhold Publ. Co., New York.
53. SUSUKI H., YAMANE, K., NISIZAWA, K., 1969, "Cellulases_ and their applications". Adv.Chem. Ser. 95, - - American Chemical Society, pp. 60, Washington, D.C
54. TASSINARI, T., MACY, CH., SPANO, L., 1980, "Energy requirements and process design considerations in compression-milling pretreatment of cellulosic wastes for enzymatic hydrolysis". Biotech. and Bioeng., Vol. 22, pp.1689-1705.
55. TOYAMA, N., OGAWA, K., 1975, "In cellulase as a chemical and energy resource", Biotechnol. and Bioeng. Symp. No.5, pp'225-375, John Wiley and - - Sons, New York.
56. ULLOA, M., HANLIN, R., 1978, "Atlas de micología básica" Edit. Concepto, S.A., pp.11-23, México.

57. WHITE, W.L., ERIKSON, M.M., STEVENS, S.C., 1976, "Chemistry for the clinical laboratory", The C.V.-Mosby Company, pp.697,706, U.S.A.
58. WILSON, C.M., 1959, "Quantitative determinations of sugar on paper chromatograms", Analytical Chemistry, Vol. 31, pp. 1199-1201, U.S.A.
59. WOOD, T.M., 1975, "Properties and mode of action of cellulases", Biotechnol. and Bioeng. Symp. No. 5 John Wiley and Sons, pp. 11-137, New York.