

00567

RECIBO DE  
ACREDITACION  
2  
20/1



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA  
DEPARTAMENTO DE POSGRADO**

**IDENTIFICACION DE UNA BACTERIA  
CELULOLITICA Y PRODUCCION  
DE SUS CELULASAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

**OPCION: QUIMICA DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A :**

**MARIA DE LOS ANGELES PATRICIA OLVERA TREVINO**

México, D. F.

1990

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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

SUMMARY.....	3
RESUMEN.....	4
1.- Introducción.....	5
2.- Justificación y objetivos.....	8
3.- Generalidades.....	9
3.1.- Celulosa.....	9
3.1.1.- Estructura.....	9
3.1.2.- Constituyentes químicos de los materiales celulósicos.....	13
3.2.- Derivados de Celulosa.....	18
3.2.1.- Carboximetilcelulosa (C.M.C.).....	19
3.3.- Historia y origen de las Celulasas.....	21
3.4.- Microorganismos Celulolíticos.....	27
3.4.1.- Hongos.....	28
3.4.2.- Bacterias.....	33
4.- Materiales y Métodos.....	36
4.1.- Microorganismo.....	36
4.2.- Medios de cultivo para la identificación.....	37
4.3.- Identificación del Microorganismo.....	38
4.4.- Medios de cultivo para seleccionar el Medio de Crecimiento.....	38
4.5.- Optimización del medio de cultivo.....	40
4.6.- Inóculo.....	41
4.7.- Medio de cultivo usado en el fermentador de 1 litro.....	42
4.8.- Fermentaciones.....	42
4.8.1.- Fermentaciones para selección y optimización en el fermentador de 1 litro.....	42

4.8.2.- Fermentaciones en el fermentador de 1 litro.....	42
4.9.- Medición del crecimiento microbiano.....	43
4.10.- Actividad Enzimática.....	43
4.11.- Temperatura óptima de la reacción enzimática.....	46
4.12.- pH óptimo de la reacción enzimática.....	46
4.13.- Determinación de proteína.....	46
5.- Resultados y Discusión de resultados.....	49
5.1.- Identificación del microorganismo.....	49
5.2.- Caracterización de la Enzima.....	53
5.2.1.- Temperatura óptima de la actividad endoglucanasa.....	56
5.2.2.- pH óptimo de la actividad endoglucanasa.....	58
5.3.- Selección del medio de crecimiento.....	60
5.4.- Selección del medio de cultivo.....	62
5.4.1.- Efecto de la fuente de carbono.....	63
5.4.2.- Efecto de la fuente de nitrógeno.....	64
5.4.3.- Optimización por el método estadístico de Box-Wilson....	65
5.5.- Fermentación en las condiciones óptimas (En fermentador de 1 litro).....	70
5.6.- Recuperación de la enzima.....	75
6.- Conclusiones.....	77
7.- Bibliografía.....	78

## SUMMARY

A cellulolytic bacterium was isolated from a carboxymethylcellulose production plant, where it caused dramatic damage due to its high cellulolytic activity. Toothpastes in which this C.M.C. was being used as a thickening agent were liquefied and their containers became inflated. Eight bacterial strains were able to grow and decrease the viscosity of C.M.C. broths. One of these strains was selected for further investigation due to its high activity towards this polymer. It was identified as Bacillus circulans, and found to produce endo- $\beta$ -1,4-glucanase with pH and temperature optima of 7.8 and 50°C respectively. It also showed good activity towards native cellulose. Conditions for optimum endoglucanase production were a medium containing 8 g/l sugar cane bagasse, 5 g/l peptone, 2 g/l yeast extract and 5 g/l NaCl, at a pH of 7.6 and incubation temperature of 30°C. Diauxic growth and increase in endoglucanase activity throughout the fermentation were observed on this medium in a 1 l fermentor. The bacterium showed excellent endoglucanase activity, but would have to be used in conjunction with other enzymes to degrade cellulose completely.

## RESUMEN

Fue detectada una contaminación microbiana en una carboximetilcelulosa, usada para espesar pasta de dientes. El microorganismo causaba daños dramáticos debido a su alta actividad carboximetilcelulolítica; el producto mostraba licuefacción y abombamiento en el recipiente que lo contenía. Fueron aisladas ocho cepas de la C.M.C. contaminada y se seleccionó aquella que mostró mayor actividad hacia el polímero. El microorganismo fue identificado como Bacillus circulans, y mostró actividad endo- $\beta$ -1,4-glucanasa y hacia celulosa nativa, a una temperatura y un pH óptimos de 50°C y 7.6 respectivamente. El medio de cultivo óptimo para el crecimiento del microorganismo con la mayor producción de las enzimas celulolíticas fue el siguiente: 8g/l de bagazo de azúcar de caña, 5 g/l de peptona, 2 g/l extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, y un pH=7.6 y temperatura de incubación de 30°C. Durante la fermentación en el fermentador de 1 l se observó un crecimiento diauxico con aumento en la actividad endoglucanasa. La bacteria mostró excelente actividad endoglucanasa, sin embargo, para degradar completamente la celulosa nativa es necesario usarla en conjunto con otras enzimas.

## 1.- INTRODUCCION.

Desde que se logró la fabricación de preparados a base de enzimas libres de células, hace aproximadamente cien años, numerosos centros de investigación e industrias se han interesado en desarrollar procesos enzimáticos, ya que el uso de enzimas ofrece ventajas no sólo económicas sino también de simplificación de procesos. Estos catalizadores biológicos catalizan reacciones químicamente difíciles, son altamente específicos, actúan en condiciones suaves de reacción y los productos de reacción se obtienen libres de subproductos.

Se han reportados más de tres mil enzimas aisladas; sin embargo, de ellas sólo cerca de veinticinco son utilizadas técnicamente y cinco compañías controlan el 80% del mercado de catalizadores biológicos.

De esto se desprende la necesidad de dedicar un estudio sobre la producción de una enzima que prometa su industrialización. Se piensa en el estudio de un sistema de producción de las enzimas "celulasas", por ser enzimas de interés económico y social, dadas sus múltiples aplicaciones.

El mayor impacto que resulta de la aplicación de estas enzimas es probablemente su empleo en el aprovechamiento de desperdicios. Un volumen considerable de residuos resultan de la cosecha o procesamiento de alimentos, principalmente de aquellos que pertenecen al ramo de los cereales y las leguminosas. La composición esencial de estos residuos son polímeros complejos de carbono, fundamentalmente celulosa y en menor cantidad hemicelulosa y lignina. Estos desperdicios pueden eventualmente aprovecharse como fuente de carbono en procesos fermentativos y con frecuencia es necesario hidrolizarlos a cadenas hidrocarbonadas pequeñas para ser utilizados por los microorganismos.

El uso de celulosa en la nutrición humana y animal ha sido deseado desde hace años, pero no se ha logrado una técnica económicamente viable para aprovecharla. Sin embargo, se han desarrollado nuevos procesos como el de la producción de carbohidratos de calidad alimenticia y concentrados de proteína a partir de celulosa, obteniéndose glucosa, -en forma sólida o como jarabe-, y proteína unicelular (SCP). (ref.Reese,E.1975).

La celulosa puede ser hidrolizada a glucosa por algunos métodos químicos y enzimáticos. También por otros métodos, poco convencionales, tales como el rompimiento físico, tratamientos con soluciones alcalinas o alta presión, y aplicación de partículas de alta energía atómica.

El proceso de hidrólisis enzimática tiene la ventaja de operar bajo condiciones físicas y químicas no drásticas; además, el producto final de reacción es solamente glucosa, con un alto rendimiento, lo que es una gran ventaja sobre la poca especificidad, bajos rendimientos y considerable formación de subproductos, característicos de la hidrólisis ácida.

Las celulasas son capaces de romper la pared celular de vegetales, facilitando así la extracción de componentes importantes tales como aceites, jugos, saborizantes de frutas y vegetales, proteínas, agar de algas marinas, azúcar de papa, almidón de maíz. Aunque la mayor parte de estas aplicaciones actualmente están restringidas por el alto costo que implica obtener el complejo enzimático.

Estas enzimas no solamente tienen aplicación en la industria alimentaria sino también en industrias como la farmacéutica y textil. Como ejemplo de cada una, puede mencionarse su utilidad en la extracción de aceites con carácter farmacéutico o de fragancias, y su actividad sobre papel, la que permite modificar características tales como la resistencia física y la absorbencia.



Las enzimas celulolíticas también pueden ayudar a disminuir la contaminación, actuando en la digestión de residuos de excreción en fosas sépticas y drenaje, y sobre desechos sólidos.

Con todo, la utilización intensiva de las celulasas presenta problemas, siendo las limitaciones fundamentales las siguientes:

a).- El alto costo que implica obtener la enzima libre. Esto obedece a procesos poco eficientes de producción, que en parte se debe a los tiempos largos de fermentación que se requieren y a los bajos rendimientos de producción. Aunque existen mohos, bacterias y levaduras que producen enzimas celulolíticas, en la mayor parte de los estudios se reporta a los mohos como los mayores productores, a pesar de que los mohos son microorganismos que requieren un tiempo largo de fermentación.

b).- Baja estabilidad en condiciones de reacción.

c).- Dificultades para la recuperación de la enzima después de la hidrólisis, problema que podría solucionarse, para sustratos de bajo peso molecular, inmovilizando la enzima en un soporte adecuado, y reducir así, el costo del proceso de hidrólisis. La heterogeneidad del medio dificulta esta operación.

d) Dificil ataque a ciertas formas estructurales de la celulosa, problema que ha sido parcialmente subsanado con las técnicas de pretratamiento, ya que proporcionan alta reactividad y accesibilidad de la enzima, aumentando así la eficiencia del proceso de hidrólisis.

e) Necesidad de contar con actividades adicionales que permitan degradar compuestos a los que la celulosa está comúnmente asociada (hemicelulosas y ligninasas.)

f) Necesidad de contar con complejos celulolíticos completos, es decir, que contengan las actividades que aseguran la transformación de celulosa nativa en glucosa.

## 2.- JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

El presente trabajo se originó cuando se detectó una contaminación microbiana en una planta productora de carboximetilcelulosa, donde causaba daños dramáticos debido a su alta actividad carboximetilcelulolítica. Esta carboximetilcelulosa se utilizaba como agente espesante en pastas de dientes, las cuáles mostraban una reducción de viscosidad drástica y abombamiento de los tubos en que se encontraban.

Se aislaron 8 cepas bacterianas a partir de carboximetilcelulosa contaminada por bacterias capaces de crecer y disminuir la viscosidad de caldos que contenían carboximetilcelulosa como única fuente de carbono. Se seleccionó la cepa que mostraba la mayor actividad hacia este polímero.

Considerando entonces la elevada actividad del microorganismo aislado, aunado al hecho de que los procesos fermentativos bacterianos son en general más productivos que los fungales, dado los menores tiempos de fermentación, y considerando también la mayor atención que han recibido las celulasas fungales con respecto a las bacterianas, y finalmente, la posibilidad de efectuar en el largo plazo, con mayor facilidad, modificaciones genéticas (ingeniería genética o mutaciones clásicas), se concibió el presente proyecto cuyos objetivos son los siguientes:

- 1.- Identificar la bacteria celulolítica.
- 2.- Optimizar el medio de cultivo y las condiciones de crecimiento para la mayor producción de la enzima.
- 3.- Estudiar la cinética de la producción de la enzima, en un fermentador de 1 litro, con el fin de definir un proceso para la producción de las enzimas.

### 3.-GENERALIDADES

#### 3.1 CELULOSA

La susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis enzimática está controlada en buena medida por el tipo de sustrato y por la accesibilidad de la enzima al sustrato, ya sea ésta extracelular o que esté unida a la superficie del microorganismo celulolítico. El contacto directo entre estas enzimas y las moléculas de sustrato es un requisito esencial de toda reacción, dificultado considerablemente en este caso, ya que la celulosa es un sustrato complejo e insoluble. Además, este contacto sólo puede llevarse a cabo por difusión de la enzima o del organismo dentro de la matriz de la estructura compleja de la celulosa.

A continuación se discuten algunas características estructurales, basadas en evidencias experimentales con el fin de proporcionar una base más completa para entender el proceso enzimático por el cual la celulosa es degradada.

##### 3.1.1 Estructura.

Hace más de un siglo, en 1838, Payen. (Nickerson 1950) publicó los trabajos que realizó referentes a tejidos de plantas. En ellos concluyó que el esqueleto fibroso de las plantas jóvenes tenía una entidad química uniforme y que parecía ser un polisacárido derivado de residuos de glucosa, con una estructura semejante al almidón.

Sin embargo, este nuevo polisacárido se diferenciaba del almidón en su comportamiento frente a la reacción con iodo, ya que para que

generara el color azul característico que se obtiene con la amilosa del almidón era necesario tratar previamente el polisacárido con ácido sulfúrico. Payen purificó el polisacárido y le aplicó el nombre de celulosa, nombre que fue propuesto por el Comité Duma en su reporte a la Academia Francesa. Sin embargo, aunque las conclusiones de Payen no fueron aceptadas universalmente, sí se llegó a un concepto común, el cual especifica que los principales componentes estructurales de plantas nativas están formados de complejos homogéneos característicos de cada especie de planta.

Estudios microscópicos e investigaciones físicas de birrefringencia e hinchamiento de fibras de celulosa apoyaron las conclusiones de Payen.

Más tarde, Even Cross y Bevan (Nickerson, R. 1950) suscriben una idea diferente. Ellos proponen que la lignina, la celulosa, la pectina, la materia grasa y otros constituyentes de tejidos de plantas se encuentran homogéneamente en otro compuesto que quiso denominarse por los prefijos "ligno", "pecto" y "adipo" y con la terminación "celulosa", y se definió como mezcla homogénea de celulosa, lignina, hemicelulosa y otros constituyentes.

En 1920, estudios de difracción de rayos X en fibras celulósicas mostraron que las estructuras lignificadas y patrones idénticos dados por madera, algodón, jute y lino, presentaban una estructura cristalina, dando origen a la teoría de la celulosa como una estructura formada por regiones cristalinas y amorfas acompañadas de lignina y otras fibras no celulósicas.

Los estudios continuaron y, en la actualidad, se sabe que la estructura molecular básica de la celulosa es un polímero lineal de ocho mil a doce mil moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta(1-4)$ . Las moléculas de celulosa están arregladas en fibrillas que consisten de

cadena de glucosa paralelas y unidas por puentes de hidrógeno. La estructura de cada fibrilla depende de la fuente de celulosa, siendo el algodón y la madera las fuentes más estudiadas.

Las fibras de algodón y de madera tienen una pared primaria fina (llamada "cutícula" en el algodón, y "lamela" en la madera) que está rodeada de una pared secundaria gruesa. La pared secundaria consiste de tres capas llamadas S1, S2 y S3. Las capas S1 y S3 se encuentran en forma de hélice plana con respecto al eje de la fibra, y la S2 se encuentra paralela al mismo eje.

Dentro de cada capa, la celulosa y otros constituyentes de la pared celular se encuentran en forma de paquetes llamados "microfibrillas". En cada microfibrilla, las moléculas lineales de celulosa están unidas por enlaces de hidrógeno y están asociadas en varios grados de paralelismo con cierto orden; estas regiones se denominan "cristalinas" y, en el caso en que en algunas regiones el orden es menor, se denominan "amorfos" o "paracristalinas".

Las dimensiones específicas de las microfibrillas y la relación espacial entre las regiones cristalinas y amorfas no están esclarecidas. Sin embargo, existen tres modelos de los más aceptados.

El primer modelo, concebido por Preston y Cronshaw (Cowling 1969), consiste en un corazón cristalino rodeado por un estuche amorfo, que sólo contiene moléculas de celulosa para el caso del algodón, y que en la madera, además, también contiene moléculas de hemicelulosa y lignina.

El modelo ideado por Hess, Mahl y Gütter (Hess 1957) sugiere discontinuidades cristalinas periódicas en el corazón, observándose una región cristalina y una región amorfa. Las microfibrillas están formadas por un número aproximado de 15 a 40 moléculas de celulosa y muestran una mínima dimensión de sección transversal de 35 Å. El tercer modelo,

propuesto por Manley (Manley 1964), sugiere que las moléculas se encuentran en cadenas delgadas formando una cinta enrollada en forma de hélice.

La celulosa vista al microscopio electrónico presenta una estructura capilar en dos formas:

a) Capilares gruesos que dan lugar a poros, visibles al microscopio electrónico, en un rango de 2000A a 10 micrones de diámetro.

b) Capilares de la pared celular que dan lugar a espacios entre microfibrillas y moléculas de celulosa en las regiones amorfas. Estos capilares están cerrados cuando las paredes están libres de agua y abiertos cuando la humedad es absorbida. (fig. 1)

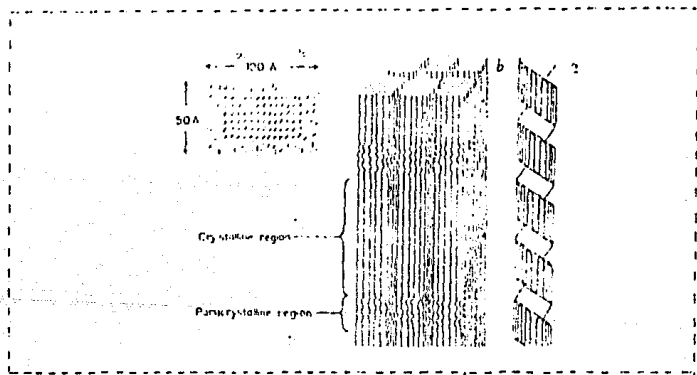


Fig.-1 . Estructura de la celulosa. (a) Cronshaw, J.,Preston 1958 b) Hess, Mahl, Gutter 1957 c) Manley 1964)

La celulosa se presenta en cuatro estructuras cristalinas designadas como celulosa I, II, III y IV. Ellas pueden distinguirse por sus características en los patrones de difracción por rayos X.

La celulosa I se encuentra en fuentes naturales, como algodón, madera, etc., y es la forma cristalina nativa.

La celulosa II se encuentra en materiales procesados como celofán y algodón mercerizado.

La transición de celulosa I a II se debe a la rotación de residuos de D-glucosa cerca del enlace glucosídico. Los grupos hidroxilo están completamente libres de los enlaces hidrógeno intermolecular; el grupo hidroxilo del C-3 forma un enlace intramolecular con el átomo de oxígeno en el próximo anillo. Esto permite que se reduzca la cohesión en la celulosa.

La celulosa III y IV se obtienen tratando la celulosa con etilamina anhidra a ciertas temperaturas y se diferencian entre sí por los tamaños de los cristales.

Existe una nueva modificación cristalina denominada "Celulosa-X", obtenida al tratar el algodón o pulpa de madera con ácido clorhídrico concentrado a temperatura ambiente, o con ácido fosfórico a 50 °C. No se tiene interpretación de la estructura, pero pruebas con rayos X indican que tienen las mismas dimensiones que la forma de celulosa IV. (Jones, D. 1964).

### 3.1.2.- Constituyentes químicos de los materiales celulósicos.

En los constituyentes químicos de las fibras de materiales celulósicos se incluyen: celulosa, hemicelulosa, lignina, materiales diversos y pequeñas cantidades de materia inorgánica.

En la tabla I se presenta la composición típica de las fibras de algodón y de madera.

TABLA I COMPOSICION DE ALGODON Y MADERA

(Cowling y Wynford 1969)

CONSTITUYENTE	ALGODON	ANGIOSPERMAS	GIMNOSPERMAS
	%	%	%
Proteína (n x 6.25 )	1.3	0.5	0.2
Celulosa	89.0	44.9	46.1
Polisacáridos no celulósicos	5.0	32.7	24.6
Lignina	0.0	19.3	26.3
Materiales extraños	2.5	2.3	2.5
Cenizas	1.2	0.3	0.3

La celulosa es un polímero lineal formado por pares de glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta(1-4)$ , con un grado de polimerización mínimo de 15 y máximo entre 10,000 y 14,000. El grado de polimerización es el número de unidades de glucosa por molécula.

Con respecto a las hemicelulosas, en el algodón están formadas por sustancias pécicas y en la madera por heteropolímeros de glucosa y xilosa, galactosa, manosa, arabinosa, así como ácidos urónicos de glucosa y galactosa. Estos compuestos están unidos por enlaces  $\beta(1-3)$ ,  $\beta(1-6)$  y  $\beta(1-4)$ . El grado de polimerización no excede los 200; además, presentan grupos acetilo como constituyentes.



La lignina es un polímero tridimensional formado de alcoholes p-hidroxicianamil. Se cree que una porción de la lignina está unida por enlace covalente con algunas hemicelulosas.

Las materias extrañas son grupos heterogéneos no estructurales. La mayoría son compuestos orgánicos, como grasas, aceites, taninos, resinas, gomas, terpenos, alcaloides y varios constituyentes citoplasmáticos.

Los materiales celulósicos también contienen minerales, que incluyen elementos inorgánicos necesarios en las plantas.

Las paredes secundarias de las fibras de algodón y de madera consisten de celulosa cristalina, mientras que las hemicelulosas están en la cutícula, y los materiales extraños se encuentran en la lamela, y en la pared celular al igual que los minerales.

Meiren Zimmerman (1964), demostró que la celulosa se encuentra en concentración alta en la pared secundaria y disminuye hacia la lamela. Por otra parte, existen bajas concentraciones de hemicelulosa y máximas de celulosa ocurren en la capa S3 de las angiospermas y en la S2 de las gimnospermas.

En la tabla II se presenta la composición típica de polisacáridos en varias capas de fibras de madera.

TABLA II.- PORCENTAJES DE POLISACARIDOS EN VARIAS CAPAS DE FIBRAS  
FIBRAS DE MADERA (Cowling 1967)

POLISACARIDO			LAMELA S1		S2	S3
	(%)	(%)	(%)	(%)		
Angiosperma	Celulosa		41.4	49.8	48.0	40.0
	Hemicelulosa		58.6	50.2	52.0	40.2
Gimnosperma	Celulosa		35.5	61.5	66.5	47.5
	Hemicelulosa		64.5	38.5	33.5	52.5

Las fuentes de celulosa pueden dividirse en 6 grupos, que a continuación se mencionan en orden de abundancia:

1) Tallos leñosos de angiospermas. La mayoría de ellos contienen 40% a 45% de celulosa, 24% a 40% de hemicelulosa y de 18% a 25% de lignina.

2) Tallos leñosos de gimnospermas, cuya composición es: de 45% a 50% de celulosa, de 25% a 35% de hemicelulosa y de 25% a 35% de lignina.

3) Tallos de monocotiledóneas (herbaje tales como palmeras, bambú, trigo, arroz, caña.) Poseen de 25% a 40% de celulosa, de 25% a 50% de hemicelulosa y de 10% a 30% de lignina.

4) Parénquima no lignificada.

Están formadas de 80% a 85% de hemicelulosa y de 15% a 20% de celulosa.

5) Fibras no lignificadas o parcialmente lignificadas; por ejemplo, semillas de algodón y fibras de lino. Poseen de 80% a 95% de celulosa y de 5% a 20% de hemicelulosa.

6) Residuos agrícolas y urbanos. Por lo general, los residuos agrícolas contienen cerca del 20% al 50% de celulosa, del 50% al 80% de hemicelulosa, y lignina en menor cantidad. En la tabla III se presentan algunos ejemplos de residuos agrícolas.

TABLA III PORCENTAJES DE ALGUNOS COMPONENTES EN RESIDUOS AGRICOLAS.

RESIDUO AGRICOLA	CELULOSA	HEMICELULOSA	LIGNINA	REFERENCIA
Caña de azúcar	35.98%	16.37%	9.6	Tejada 1980
Paja de cebada	40.44	28.30	(18-20)%	Avilés 1980
Pulpa de café	(12-20)%	-	-	Velasco 1980
Trigo (rastrajo)	40.00	-	13.60	Sloneker 1976
Soya (rastrajo)	41.40	-	-	Sloneker 1976

Similarmente, en la tabla IV se muestra la composición de algunos residuos urbanos.

TABLA IV .-PORCENTAJES DE ALGUNOS COMPONENTES EN RESIDUOS URBANOS (Cowling and Kirk 1976)

Porcentajes de algunos componentes en residuos urbanos.				
RESIDUO URBANO	CELULOSA	HEMICELULOSA	LIGNINA	
Periódico	(40-55)%	(25-40)%	(18-30)%	
Desperdicio de fibra corrugada	(60-70)%	(10.-20)%	(5-10)%	
Desperdicio de papel de fibras químicas	(60-80)%	(20-30)%	(2-10)%	

### 3.2- Derivados de Celulosa.

Debido a la gran resistencia que ofrece la celulosa nativa a la hidrólisis enzimática, han sido ampliamente usados los derivados solubles de celulosa, particularmente carboximetil-celulosa de sodio. Estos materiales proporcionan cadenas aisladas de moléculas de glucosa en solución, lo que evita la fase de prehidrólisis.

Los derivados de celulosa son formados al reemplazar el hidrógeno y los grupos hidroxilo primario y secundario, por grupos tales como metil, etil, hidroxietil, carboximetil, etc. La celulosa resultante es muy estable y los grupos sustituyentes no se eliminan fácilmente.

Estos grupos sustituyentes ocasionan que la celulosa no sea cristalina y además que sea soluble en agua en función del grado de sustitución (DS) y de la capacidad de solvatación de sus grupos sustituyentes. El valor DS se refiere al número promedio de grupos sustituyentes en cada unidad de glucosa en la celulosa y está en un rango de 0.5 a 0.7 para el cual la solubilidad es completa dependiendo de la capacidad de solvatación de los sustituyentes.

La susceptibilidad de los derivados de celulosa a la hidrólisis enzimática se incrementa al incrementarse su solubilidad en agua y disminuir la capacidad de cristalizar en el punto de su completa solubilidad. Después de este punto, la susceptibilidad decae al incrementar el DS hasta la completa inactividad enzimática; en este caso, el DS es mayor que 1.

De los derivados de celulosa, el más importante es la carboximetilcelulosa por sus múltiples aplicaciones como viscosante. Se ha

comprobado que muchos microorganismos la pueden usar como fuente de carbono y su degradación es fácilmente detectable ya que puede ser medida determinando la caída de viscosidad de la solución.

### 3.2.1.- Carboximetilcelulosa (CMC).

La CMC empezó a ser estudiada hacia los finales de la Primera Guerra Mundial por Jansen (Karabinos 1954). El derivado celulolítico era utilizado como sustituto de gomas naturales, y no tuvo interés comercial sino hasta un poco antes de la Segunda Guerra Mundial; al mismo tiempo, en Alemania, se descubrieron sus propiedades de detergencia.

Bajo el nombre comercial de "Tylose HBR" fue fabricada por la planta "Kalle" de Farbenindustrie, durante toda la Segunda Guerra Mundial, con la idea de ofrecer jabones y detergentes sintéticos. Después de promover las características de detergencia, éstas fueron confirmadas en laboratorios de Estados Unidos y la producción de esta sustancia recibió un gran impulso, preparándose a gran escala bajo una variedad de nombres comerciales como "CMC", "Carbose", "Cellulose Gum".

Aunque existen numerosas técnicas para la producción de CMC, la técnica básica fue desarrollada por Jansen y más tarde perfeccionada por Chowdhury y Höppler (Karabinos 1954). Esta consiste en tratar la celulosa con sosa cáustica y, posteriormente, se eterifica con monocloroacetato de sodio para formar carboximetilcelulosa y cloruro de sodio. La reacción puede ser representada en forma simple con la siguiente ecuación.



Debe señalarse que se encuentran disponibles tres hidroxilos para esterificación en cada glucosa de la cadena que forma la celulosa. Pueden esterificarse cualquiera de ellos, o los tres al mismo tiempo, lo que define el grado de sustitución. Si un producto tiene un hidroxilo esterificado por unidad de glucosa (figura 2-1), se dice que tiene un grado de sustitución. Si el producto tiene los 3 grupos hidroxilos sustituidos, se dice que el grado de sustitución es 3, (figura 2-2)

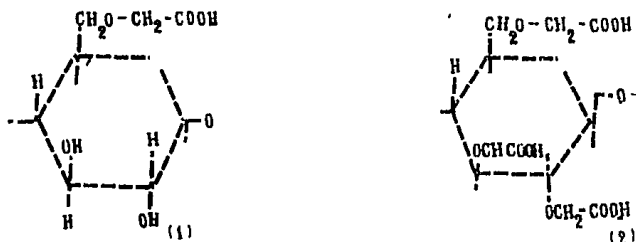


fig.- 2.- Hidroxilos sustituidos. (Morrison 1973)

Rydholm, (Karabinos 1954), mostró que los grupos carboximetil atacan preferentemente al carbono de la glucosa en la esterificación. Dyer y Arnold, (Dyer 1952), con una técnica diferente, también concluyeron que los grupos hidroxilo primarios son carboximetilados más fácilmente que los secundarios. En 1954, Allgen reportó las propiedades dieléctricas de la CMC, concluyendo que son similares a aquellos polielectrolitos con características semejantes al ácido hialurónico y al ácido desoxirribonucleico.

Se han sugerido una gran variedad de usos para la CMC: anticoagulante, adhesivo, estabilizador en preparaciones farmacéuticas, agente dispersante en emulsiones, e incluso se le han atribuido propiedades laxantes.

### 3.3.- Historia y origen de las Celulasas.

Se han publicado numerosos artículos sobre la historia de las celulasas. Podría decirse que el interés sobre estas enzimas se inicia durante la Segunda Guerra Mundial, cuando algunos artículos de algodón y lana necesarios para el Ejército de Estados Unidos se descomponían rápidamente en zonas cálidas. A consecuencia de ello, la mayoría del cargamento era desechado y se suplía con artículos que no eran funcionales. Con el fin de encontrar una solución inmediata al problema, algunas organizaciones del Ejército instalaron laboratorios de investigación; fue únicamente "Corps. Quartermaster" quien desarrolló un programa básico que consistía en estudiar la naturaleza de la descomposición, los organismos causantes, los mecanismos de acción y los métodos de control. El profesor William Weston dirigió tales trabajos.

Algunos años más tarde, el Dr. Ralph Siu estableció un proyecto similar cuyo objetivo era controlar insectos sin el uso de insecticidas. El Dr. Siu trabajó en el proyecto durante dos años, continuado posteriormente por los Doctores David Bailey, Gabriel Mandels y Fred Oesterling, del Centro de Desarrollo Natick del Ejército norteamericano.

Los estudios básicos fueron iniciados por el Dr. W. Lawrence White, micólogo, cuya misión fue determinar los organismos causantes del deterioro en el equipo del Ejército. Cuando identificó los organismos responsables, regresó a su vida académica, dejando la siguiente fase de la investigación al Dr. Siu.

La siguiente fase consistió en evaluar la capacidad de los microorganismos aislados para degradar algodón, lana y otros materiales de interés para el Ejército, (Reese 1976). Miles de microorganismos fueron

incubados en fajas de materiales textiles y cada faja fue probada midiendo la pérdida de su fuerza tensora. Los organismos más activos fueron comparados con microorganismos incubados en matraces agitados y se probó su capacidad para producir la enzima responsable de la hidrólisis. Posteriormente se probaron diferentes materiales, como proteínas, maderas, polisacáridos, plásticos y varios ésteres, pero finalmente el programa se concentró en la celulosa.

Tiempo después, tres desarrollos experimentales de la década de los 40's simplificaron las investigaciones de la degradación de la celulosa: la cromatografía, el empleo de la enzima glucosa oxidasa y el uso de derivados solubles de celulosa. Con la ayuda de la cromatografía se detectaron rápidamente los productos de hidrólisis y se separaron componentes enzimáticos; el empleo de glucosa oxidasa hizo posible identificar glucosa rápida y definitivamente y los derivados solubles de celulosa permitieron preparar soluciones de celulosa en cuestión de minutos, lo que facilitó el trabajo.

Ya en la década de los 50's un estudio comparativo de una gran cantidad de microorganismos reveló que la celulasa estaba formada por un complejo de 3 enzimas ( Ghose 1969 ).

1) La enzima C1, llamada así porque se creía que era la primera que actuaba sobre la celulosa cristalina, modificándola para que las demás enzimas pudieran seguir actuando.

2) La enzima Endo  $\beta(1-4)$  glucanasa, o Cx, que actúa al azar sobre la celulosa no cristalina, derivados solubles de celulosa y  $\beta(1-4)$  oligómeros de glucosa.

3) La enzima  $\beta$ -glucosidasa, la cual convierte celobiosa y celotriosa a glucosa.



Mientras que se desarrollaba este concepto, se seleccionó al microorganismo Trichoderma viridae como la mejor fuente de una de las enzimas del complejo enzimático: la celobiohidrolasa, (CBH). Se trata de una enzima que remueve unidades de celobiosa de las terminales no reductoras de la cadena de celulosa. Sin embargo, algunos autores opinan que es la misma enzima que Cx. A partir de estas discrepancias, E. T. Reese y Col, (Reese 1975), sugieren un mecanismo de acción de las celulasas, el cual se muestra simplificado en la figura 3.

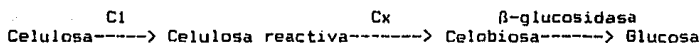


fig 3.- Mecanismo de acción de las celulasas de acuerdo con Reese y col (Reese 1975).

Actualmente el mecanismo de acción de las celulasas se ha resumido en un complejo de cuatro enzimas cuyo mecanismo es mostrado en la figura 4

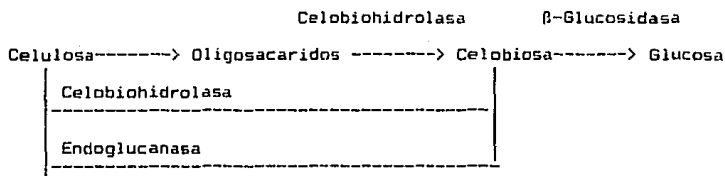


fig. 4.- Mecanismo actualizado de las celulasas (Fogarty 1983)

En la tabla V se muestra la caracterización de dos compuestos celulolíticos de acuerdo con las enzimas de la figura 4 y en la tabla VI se demuestra una característica general de estas enzimas: su efecto sinérgico.

TABLA V.- CANTIDADES RELATIVAS DE ENZIMAS CELULOLITICAS PRODUCIDAS POR T. reesei y A. niger. (Fogarty 1983).

Enzima	%total de la proteina extracelular.	
	<u>T. reesei</u>	<u>A. niger</u> .
Celobiohidrolasa	50-80	0
Endoglucanasa	3-12	2-3
Glucosidasa	0.2-1	2-3

TABLA VI EFECTO SINERGICO DE ENZIMAS DEL COMPLEJO CELULOLITICO DE DOS HONGOS (Fogarty 1983).

Enzima	% de solubilización de algodón	
	<u>F. solani</u>	<u>T. koningii</u>
Celobiohidrolasa (CBH)	2	1
Endoglucanasa (EG)	1	1
Glucosidasa (G)	1	0
CBH+EG	58	53
CBH+EG+G	71	72
CBH+G	18	20
sobrenadante	71	71
original.		

En 1962, la Dra. Mary Mandels (Reese 1976) puso su atención en el uso de celulasas para convertir vegetales en productos digeribles. A partir de este hecho las investigaciones posteriores no solamente se enfocaron a prevenir la contaminación por microorganismos celulolíticos sino que también se dirigieron a promover su producción.

EL Dr. Moshé Katz, (Katz et al 1968), demostró que por hidrólisis enzimáticas podrían obtenerse rendimientos de glucosa de un 30% lo que ocasionó pensar que no era factible usar celulosa como fuente de glucosa, ya que existía una industria que anualmente producía millones de toneladas de glucosa a partir de almidón.

El Dr. Tarun Ghose, (Ghose 1969), desarrolló un sistema de hidrólisis continua que separaba glucosa de los productos de reacción. Esto permitía que la enzima y el sustrato regresaran al reactor, aumentando así el rendimiento en un 10%

Por otro lado, la Dra. Mandels, (Reese 1976), desarrolló mutantes que producían cuatro veces más enzimas que los microorganismos originales.

Todos estos avances dieron lugar a que muchos laboratorios reconsideraran la hidrólisis de celulosa como una fuente económica de glucosa. Se iniciaron cientos de investigaciones; de las más importantes se pueden mencionar las elaboradas por el Dr. Toyama, del Japón, quien comenzó a usar las celulasas para convertir aserrín y paja en azúcares fermentables.

En el ejército, Dixon Brandt, (Brandt et al 1973), hizo un estudio de ingeniería química sobre la hidrólisis de desperdicios de celulosa, con resultados económicos prometedores.

En la División de Investigación de Natick fue suprimida la investigación sobre celulasas, y en su lugar se estableció un grupo dedicado al estudio sobre la prevención de la contaminación y localización de nuevas fuentes de energía. En estos estudios se hizo patente nuevamente la importancia de la conversión de celulosa a glucosa. Más tarde, Leo Spano obtuvo el financiamiento necesario para establecer, en 1974, una planta piloto de producción de glucosa a partir de celulosa.

Hay una vasta información del estudio de las celulasas que incluye temas referentes tanto a la naturaleza y componentes del sistema celulasa, así como la accesibilidad enzimática de la celulosa, digestibilidad y potencial nutricional, producción y aplicaciones comerciales. La información más reciente se refiere a pretratamientos para incrementar la accesibilidad a materiales de desperdicio de celulosa como residuos de madera, residuos agrícolas, bagazo de caña, paja, aserrín y residuos alimenticios.

También existen Asociaciones y nombres claves dentro de la historia de las celulasas como American Chemical Society, Division of Cellulose, o nombres como J.H. Dusenbury, R.G.H. Siu, J.F. Saeman, E.T. Reese, B.R. Bugardt, Mary Mandels, Leo A. Spano, quienes en su mayoría enfocan sus estudios a un objetivo común, que puede dividirse en varios puntos:

- 1.- Ayudar a resolver los problemas modernos de desperdicio.
- 2.- Disminuir la contaminación del medio ambiente.
- 3.- Aumentar las fuentes alimenticias tanto para animales como para humanos.
- 4.- Disminuir la dependencia del hombre a los combustibles fósiles, proporcionando una conveniente y renovable fuente de energía en forma de etanol.
- 5.- Proporcionar un mercado de las maderas duras de baja calidad y otras "chatarras verdes" que se desarrollan en tierras pobres.
- 6.- Impulsar los Centros de Investigación para aquellos que desarrollen nueva tecnología.

### 3.4.- Microorganismos Celulolíticos.

La celulosa nativa es enzimáticamente hidrolizada por un grupo de enzimas (endo-glucosidasa, exo-glucanasa y  $\beta$ -glucosidasa) que son producidas por muchas especies de organismos vivos. Entre ellos se incluyen microorganismos aerobios, como aquéllos que se encuentran en el suelo y anaerobios como los que se encuentran en el tracto intestinal, responsables de la digestibilidad de celulosa en animales. También existen celulasas que se cree son producidas por el propio organismo, como ocurre en el pez plata, caracol y ciertas termitas; entre éstas, por ejemplo, Trinerviter trinervoides presenta actividad celulolítica en el abdomen, (Poutts et al 1974), mientras que en otras su actividad celulolítica está asociada con microorganismos, como es el caso de Heticulitermes hesperas, de la que se han aislado Bacillus cereus, Arthobacter sp., Serratia Marcescens (Thayer 1976).

Con frecuencia el sistema celulolítico es diferente en cada microorganismo; por ejemplo, algunos no crecen en celulosa nativa, pero producen enzimas celulolíticas. Esto se debe a que en ellos están ausentes algunas enzimas esenciales para la hidrólisis de celulosa nativa, pero pueden utilizar celulosa parcialmente degradada. Esta característica es importante para la producción industrial de enzimas celulolíticas específicas. En cambio, existen otros microorganismos que crecen en celulosa pero que sólo ocasionalmente producen pequeñas cantidades de enzimas celulolíticas. Esta última condición ha dado lugar a clasificar los microorganismos celulolíticos en tres grupos principales, en función de los filtrados de cultivos. (Reese 1976).

#### 1.- Productores de celulasas en ausencia de celulosa

2.- Productores de celulasas en presencia de sustratos celulósicos.

3.- Productores de pequeña o ninguna cantidad de celulasas en presencia de algún sustrato celulósico.

Se ha observado actividad celulósica en filtrados de cultivos de microorganismos, pero también en células libres; estos resultados han motivado la clasificación del sistema enzimático, de acuerdo con su localización, en dos grupos.

1.- Enzimas unidas a las células; las que, a su vez se dividen en dos grupos más: uno se refiere a aquellas enzimas unidas a la superficie de la célula y el segundo dentro de la célula.

2.- Enzimas extracelulares: Estas enzimas son excretadas por el microorganismo al medio de cultivo.

Es claro que las enzimas que actúan sobre macromoléculas insolubles como la celulosa, deben estar localizadas fuera de la célula. En cambio, aquellas enzimas que degradan moléculas solubles de bajo peso molecular como la celobiosa, probablemente estén localizadas dentro de la célula.

#### 3.4.1.- Hongos.

La celulosa es el constituyente que se encuentra en mayor cantidad en las plantas, es utilizada como fuente de carbono y energía por la microflora de las mismas. Las plantas son atacadas in situ por bacterias, hongos y virus patógenos; cuando la planta muere, cae y se acumula en grandes extensiones de tierra, donde es atacada por microorganismos saprófitos que se encuentran en el suelo; los principales son hongos, de la clase I Phycomycetae, clase II Ascomycetae, y de la clase III Basidiomycetae. Esta última es importante porque esa clase de hongos no

solamente degradan celulosa sino también lignina. Se considera que estos microorganismos son el primer agente de descomposición biológica del material orgánico dentro del ciclo del carbono.

La capacidad para producir enzimas celulolíticas dentro de los hongos es muy amplia, algunos producen celulasas que degradan celulosa cristalina y otros producen celulasas que degradan celulosa modificada o previamente tratada.

El hongo más extensamente estudiado y probablemente el más eficiente en la producción de celulasas es Trichoderma reesei; la mayoría de las cepas de este microorganismo se originaron de la cepa T. reesei QM6a aislada por la US Army Natick Research and Development Command (Mandels 1969). En la figura 5 se muestra la genealogía de dicha cepa. También se han encontrado reportes de Penicillium y de Aspergillus. En la tabla VII se muestran algunos de los hongos estudiados.

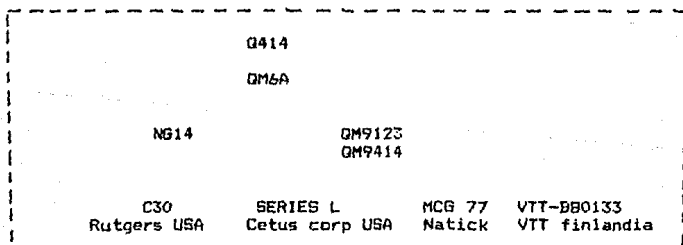


Figura. - 5 Genealogía de cepas hiperproductrices de enzimas  
celulolíticas. (Fogarty 1983)

TABLA VII ALGUNOS EJEMPLOS DE HONGOS CELULOLITICOS

MICROORGANISMO	REFERENCIA	OBSERVACIONES
<u>Aspergillus awamori</u>	Reese 1975	Productor de $\beta$ -glucosidasa
<u>Aspergillus niger</u>	Stenberg 1977	Productor de glucosidasa
<u>Aspergillus niger</u>	Markianen 1975	Productor de glucosidasa
<u>Talaromyces emersonii</u> <u>CBS 614.70</u>	Moloney 1983	Medio de crecimiento: azúcar de betabel y melazas. Estudio de inductores
<u>Phanerochaete</u> <u>Chrysosporium</u>	Frederich 1986	Medio de crecimiento: desperdicio de manzana que se usó para la producción de aguardiente de manzana.
<u>Penicillium sp. DD20</u>	Durard 1984	Mutante pH de crecimiento 4.8 temperatura 50°C
<u>Cladosporium</u> <u>cucumerinum</u>	Skare 1975	Microorganismo patógeno del pepino. Se usa pectina como inductor
<u>Aspergillus sydowi</u>	Olutiota 1977	Productor de Cl. Microorganismo patógeno del frijol de cacao.
<u>Aspergillus clavatus</u>	Olutiota 1977	Solubiliza la celulosa en 3 días en un 14.4%
<u>Trichoderma harzianum</u> <u>E58</u>	Breuil 1986	Productor de glucosidasa.

La mayoría de las celulasas producidas por los microorganismos son estables a temperaturas cercanas a 50 °C, pero a esta temperatura los reactores son frecuentemente contaminados por microorganismos que usan los azúcares liberados por las reacciones hidrolíticas y consecuentemente la relación de recuperación de azúcar es baja. Por razones económicas no es



posible trabajar bajo condiciones estériles y el subsecuente uso de azúcares en fermentación excluye el uso de antisépticos. Un camino simple podría beneficiar al proceso incrementando la velocidad de hidrólisis e inhibiendo el crecimiento microbiano, de ahí que los estudios recientes se han inclinado a este raciocinio. Como consecuencia se han aportado celulasas termoestables y han sido descritos algunos hongos celulolíticos termofílicos. En la Tabla VIII se muestran algunos de ellos. Algunos ya han sido patentados, como Thielavia terrestris (Skinner 1972) y Sporotrichum cellulophilum (Komura 1978).

En la tabla IX se muestra la degradación de celulosa por hongos en condiciones aerobias y anaerobias. En ésta tabla se presume que en algunos casos existe la presencia de algún mecanismo enzimático oxidativo en el complejo celulolítico, o bien, la presencia de una celobiosa-quinona oxidoreductosa o una celobiosa oxidasa.

TABLA VIII ALGUNOS EJEMPLOS DE HONGOS CELULOLITICOS TERMOFILICOS  
(Komura 1978)

MICROORGANISMO	REFERENCIA	OBSERVACIONES
<u>Thermascus aurantiacus</u>	Romanelle 1975	Degrada el 10% de celulosa en tres días
<u>Sporichium thermophile</u>	Smiths 1976	Produce una cuarta parte de celulosa de lo que produce <u>Trichoderma viridae</u> .
<u>Thielavia terrestris</u> NRRL B126	Durard 1984	Estable a 60°C por 24 horas.
<u>Chaetomium thermophile</u>	Erken 1976	Aislado de composta crece algodón, papel filtro y celulosa
<u>Sporitricum cellulophilum</u> ATCC 20484	Durard 1984	Estable a 60°C por 24 horas.

TABLA IX DEGRADACION DE CELULOSA POR ENZIMAS CELULOLITICAS DE  
DIFERENTES HONGOS EN CONDICIONES AEROBIAS Y ANAEROBIAS

Fuente de la enzima	Degradación de celulosa (%pérdida en peso)	
	aire	nitrógeno
<u>Phanerochaete chrysosporium</u>	52.1	21.5
<u>Polyporus adustus</u>	42.6	18.0
<u>Myrothecium verrucaria</u>	33.6	17.0
<u>Trichoderma reesei</u>	20.0	10.0
<u>Trichoderma koningi</u>	43.2	38.1
<u>Penicillium funiculosum</u>	43.5	43.1
<u>Eusarium solaris</u>	34.3	34.6

Por otro lado, en relación con la producción de celulasas, las levaduras se han investigado escasamente, y los reportes, en su mayoría muestran que la actividad es muy baja. Por ejemplo, B.J.H. Stevens y J. Payne reportan que Thichosporium cutancum y pullulans crecen en bolas de papel filtro y observaron una solubilización del 40% en tres horas (Stevens et al 1977). Trichoderma viridae y Myrothecium verrucaria, en las mismas condiciones, solubilizan el 46%.

### 3.4.2.- Bacterias.

Aunque muchas especies de bacterias son capaces de sintetizar enzimas celulolíticas, solamente algunas son lo bastante eficientes para ser de interés industrial. Sin embargo, han sido estudiadas especies que pertenecen a varias unidades taxonómicas. Algunas bacterias no excretan grandes cantidades de enzimas celulolíticas pero tienen interés industrial por su capacidad de crecer en materiales celulósicos. Una bacteria semejante es Cellulomonas, estudiada por Fogarty (Fogarty 1983)

Algunas bacterias degradan celulosa muy eficientemente pero no excretan enzimas que la hidrolicen en el medio de cultivo; tal es el caso de Sporocytophaga myxocoides (Hotsen 1983)

TABLA X.- BACTERIAS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR CELULOSA.

#### Myxobacteriales:

Sporocytophaga  
Cytophaga  
Actinomyetales  
Micromonospora  
Streptomyces  
Thermoactinomyces  
Thermospora  
Thermopolyspora

#### Eubacteriales:

Bacillus  
Cellulomonas  
Pseudomonas  
Clostridium  
Bacteroides  
Ruminococcus

Se ha encontrado que las mejores bacterias productoras de enzimas celulolíticas extracelulares son miembros del género Clostridium (Zeikus 1980). Posiblemente la actividad celulolítica más efectiva ocurra en asociaciones simbióticas, particularmente las que se encuentran en el rumen de animales como vacas y borregos.

También existen bacterias celulolíticas que atacan a plantas; una de estas es Cellulomonas flavigena, que descompone el tejido de las aceitunas y pueden crecer en papel filtro y carboximetilcelulosa como únicas fuentes de carbono.

Es de interés la asociación , en condiciones anaerobias de Clostridium thermocellum y Methanobacterium thermoacetotrophicum , ya que se observó un acortamiento del periodo lag al crecer juntas en celulosa en polvo. Además, la celulosa se solubilizó en cuatro días de manera que resultó 15 veces mas efectiva la asociación del microorganismo que si Clostridium hubiera crecido solo (Eimer 1963).

En la Tabla XI se resumen algunos estudios de bacterias celulolíticas que han sido publicados.

TABLA XI.- Algunos ejemplos de bacterias celulolíticas

MICROORGANISMO	REFERENCIA	OBSERVACIONES
<u>Bacteroides succinogenes</u> <u>Ruminococcus albus</u> <u>R. flavescens</u>	Halliwel (1957)	Aisladas del rumen de vaca. 10%v/v de inóculo se obtiene la máxima actividad.
<u>Bacillus cereus</u> <u>Serratia marcescens</u> <u>Arthrobacter sp.</u>	Thayer (1976)	Aisladas de la parte trasera de la termita <i>Reticulitermes hesperus</i> .
<u>Clostridium thermocellum</u> ATCC 27405	Park et al (1983)	Actividad glucosídica
<u>Pseudomonas fluorescens</u>	Zuzuki (1976)	Cellobiosa como inductor
<u>Cellulomonas uda</u>	Srinivsem (1979)	La enzima celulolítica está unida a la célula.
Bacteria aislada de las glándulas de Shipworm	Waterbury (1983)	Actividad celulolítica y fijadora de nitrógeno
<u>Cellulomonas flavigena</u>	Kaufman (1976)	Aislada de sólidos municipales. Solubiliza el papel en un 34%.
<u>Ruminococcus flavefaciens</u>	Pettipher (1972)	La enzima se encuentra unida a la célula.
<u>Cercospora arachidicola</u>	Fogarty (1974)	Bacteria que infecta a la nuez.

#### 4.- MATERIALES Y METODOS.

En la siguiente figura se muestra la secuencia seguida para el desarrollo de este trabajo experimental

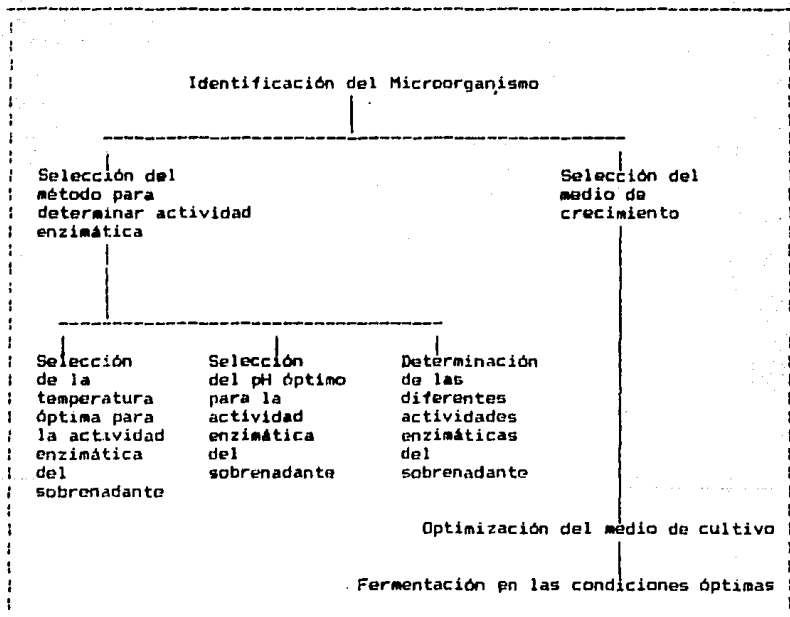


figura 5 Secuencia seguida para el desarrollo experimental.

#### 4.1.- Microorganismo.

Se utilizó la cepa MCW de una bacteria aislada de carboximetilcelulosa en polvo, que produce una rápida y notoria disminución

de la viscosidad en soluciones de C.M.C. El microorganismo se mantuvo en tubos inclinados de agar nutritivo, resemebrándose cada dos meses.

#### 4.2 Medios de cultivo para la identificación

Los medios inicialmente usados fueron diseñados con base en pruebas preliminares. Se usaron medios para bacterias y microorganismos celulolíticos, (Berkeley 1984). En la tabla XII se resume la composición de cada uno de ellos.

Tabla XII Medios Iniciales

Constituyente	Medio#1	Medio#2	Medio#3	Medio#3B	Medio#4
$K_2HPO_4$	-	0.5g	-	-	-
$KH_2PO_4$	2g	0.5g	-	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	2g	3g	-	-	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3g	0.1g	-	-	-
$CaCl_2$	0.3g	0.1g	-	-	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.4g	1.25ppm	-	-	-
$CoCl_2$	2mg	0.35ppm	-	-	-
NaCl	-	3g	-	-	-
$MnSO_4$	-	0.4ppm	-	-	-
$ZnSO_4$	-	0.35ppm	-	-	-
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	-	0.16ppm	-	-	-
C.M.C.	10g	10g	-	10g	10g
caldo nutritivo *	-	-	8g	8g	-
T.S.B.	-	-	-	-	30g
glucosa	-	-	10g	-	-
agua	1 litro	1 litro	1 litro	1 litro	1 litro

\* Composición del caldo nutritivo: Extracto de carne 1g/l, Extracto de levadura 2g/l, NaCl 5g/l, Peptona 5g/l. (Merck)  
 TSB: caldo de soya Tripticaseína (Merck)

Los medios 3, 3B, y 4 también fueron utilizados en forma sólida adicionando 15 w/v de agar. Para las pruebas bioquímicas (crecimiento en agar anaerobio, crecimiento a 50°C, crecimiento a 65°C, crecimiento en 7% NaCl, acidez y gas de glucosa, reducción de nitritos, hidrólisis de almidón, hidrólisis de caseína, voges proskauer, catalasa, movilidad) los medios usados fueron los reportados por McFadin (McFadin 1971).

#### 4.3 Identificación del Microorganismo

La determinación del género se llevó a cabo mediante la marcha específica para bacterias gram (+), reportada por Harrigan y McCance (McCance et al 1976). La identificación de la especie se estudió siguiendo la marcha que propone Berkeley (Berkeley et al 1984) específica para el género Bacillus.

Las técnicas de las pruebas bioquímicas usadas fueron aquellas reportadas por McFadin (McFadin 1971) y por Harrigan y McCance (McCance 1976).

#### 4.4.- Medios de cultivo para selección del Medio de Crecimiento.

Se ensayaron tres diferentes fuentes de carbono: papel periódico sin tratamiento alguno (Novedades), bagazo de caña con las siguientes características: Carbohidratos solubles 8.11%, hemicelulosa 44.3%, celulosa 26.82%, lignina 15.31%, cenizas 2.12%; y C.M.C. de



44.3%, celulosa 26.82%, lignina 15.31%, cenizas 2.12%; y C.M.C. de "Derivados Macroquímicos, S.A. de C.V." con una pureza del 95%, un grado de sustitución en un rango de 0.65-0.80, humedad 8%, viscosidad de una solución al 2% de 25-50 cps, pH 6-8. Para seleccionar la mejor fuente de nitrógeno se ensayaron tres de las más usadas: urea (Merck), peptona de carne (Merck) y sulfato de amonio (Merck). En la tabla XIII se muestra la composición de cada medio.

Tabla XIII  
Medios para seleccionar fuentes de nitrógeno y carbono.

	Medio								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Peptona de carne g/l	5.0	5.0	5.0	-	-	-	-	6.7	-
Extracto de levadura g/l	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	-	2.0	-	9.9
Sulfato de amonio g/l	-	-	-	2.78	3.4	-	-	-	-
Urea g/l	-	-	-	-	-	1.6	1.2	-	-
Periódico g/l	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Bagazo de caña g/l	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-
C.M.C. g/l	-	-	10	10	10	10	10	10	10
NaCl g/l	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

pH=7 para cada medio.

#### 4.5 Optimización del medio de cultivo.

Una vez definido el medio de crecimiento se procedió a su optimización. Para este fin se aplicó la técnica establecida por Box Wilson (Box Wilson 1951). Se eligieron como variables: pH, temperatura, concentración de peptona y de bagazo de caña, cada una a dos niveles, estos últimos se muestran en la tabla XIV.

TABLA XIV Variables de Box Wilson.

Parámetros	condición (+)	nivel base	condición (-)	unidad de variación.
A(pH)	8	7	6	1
B(Temp.)	34°C	28°C	22°C	6
C(peptona)	6 g/l	5g/l	4 g/l	1
D(bagazo)	15 g/l	10g/l	5 g/l	5

La variable de respuesta fue la actividad endoglucanasa determinada por colorimetría y por viscosimetría. El número total de parámetros fue de cuatro cada una a dos niveles, lo que corresponde a un factorial 2 dando como resultado 16 experimentos

De acuerdo a los primeros resultados del experimento factorial se diseñaron cinco diferentes fermentaciones cuyos medios se escogieron buscando el óptimo para la máxima actividad evaluada por viscosimetría. En la tabla XVI se resumen los medios de cultivo para Bacillus circulans experimentados.

TABLA XVI Formulación de medios para optimizar el medio de cultivo.

Medio	A (pH)	B (Temp.)	C (Peptona)	D (bagazo de caña)
Basal	7.0	28	5.0 g/l	10 g/l
17	7.3	29	5.2	9
18	7.6	30	5.4	8
19	7.9	31	5.6	7
20	8.7	34	6.2	4
21	9.6	37	6.8	1

$\sigma = .001$

#### 4.6.- Inóculo.

Cada medio utilizado fue inoculado con un mililitro de cultivo en fase exponencial de crecimiento que contenía aproximadamente  $5 \times 10^8$  células/ml, cuantificadas por cuenta indirecta en placa.

#### 4.7 Medio de cultivo usado en el fermentador de un litro.

El medio de cultivo seleccionado fue con base en los resultados obtenidos en el Box Wilson y tiene la siguiente composición : Bagazo de caña 0.8%, peptona de carne 0.50%, extracto de levadura 0.30%, NaCl 0.5%, pH inicial = 7.6

#### 4.8.- Fermentaciones

##### 4.8.1.- Fermentaciones para selección y optimización del medio de cultivo.

Los experimentos fueron llevados a cabo en matraces de 250 ml tapados con torunda de algodón, con un contenido de 150 ml de medio, las fermentaciones se realizaron a una temperatura de 28°C durante 72 horas y con una agitación de 100 rpm. Cada experimento se realizó por duplicado. Se muestreo a diferentes intervalos de tiempo y se analizó la cuenta microbiana por lecturas de absorbancia y actividad endoglucanasa por lecturas de caída de la viscosidad de una solución de CMC.

##### 4.8.2.- Fermentación en el fermentador de un litro.

Se realizaron dos fermentaciones en un fermentador a escala New Brunswick, Bio-flo Mod. C30, a un volumen de 500 ml. Durante todo el experimento se mantuvieron constantes la aireación a 0.5 vvm y la agitación a 100 rpm. Las fermentaciones fueron dos diferentes temperaturas, 24°C y 30°C, que se escogieron de acuerdo con los resultados

obtenidos en el Box Wilson. Se muestreó a diferentes intervalos de tiempo para su posterior análisis, el cual fue en función del crecimiento microbiano por lecturas de absorbancia y la actividad enzimática por caída de viscosidad de una solución de C.M.C. y presencia de reductores por el método del 2,3,5, trifeniltetrazolium (Fairbridge 1951).

#### 4.9- Medición del crecimiento microbiano.

Se midió la densidad óptica a 650nm en un espectrofotómetro Pye Unicam SP 30 UV para estimar el crecimiento microbiano. Se construyó una curva estándar de número de células contra densidad óptica.

#### 4.10.- Actividad Enzimática.

La actividad celulolítica fue determinada en muestras de cultivo centrifugado a 7000 rpm durante 10 minutos. Las actividades medidas fueron las siguientes:

##### a) Actividad celulolítica total.-

Esta actividad fue determinada usando como sustrato papel filtro Whatman 1, el método usado corresponde al reportado por Mandels y Weber (Mandels 1969). La actividad es expresada como: mg. de glucosa

producidos por volumen de cultivo centrifugado no diluido (U/ml.) La U.I. corresponde a la concentración de enzima que permite la liberación de una micromol de glucosa por minuto, a 50°C y pH=4.8

b) Actividad celobiohidrolasa y endoglucanasa.-

El método aplicado está basado en determinar la presencia de azúcares reductores usando el método del ácido dinitro sallicílico (DNS) (Sumner J.B. 1935) después de la reacción enzimática en la que se usa como sustrato algodón. (Mandels, Weber 1969). La actividad es expresada como mg de glucosa producidos por cultivo centrifugado no diluido U/ml. La Unidad Internacional corresponde a la concentración de enzima que permite la liberación de una micromol de glucosa por minuto a 50°C a pH=4.8

c) Actividad endoglucanasa.

Para determinar esta actividad se usó como sustrato C.M.C. y se evaluó de dos maneras: por viscosimetría, midiendo la reducción de la viscosidad de soluciones de C.M.C., y por colorimetría detectando la producción de azúcares reductores usando el método del 2,3,5 trifenil tetrazolium (Fairbridge 1951)

1) Viscosimetría.

El procedimiento empleado fue el siguiente: Inicialmente se detectó la reducción de la viscosidad, para ello se incubaron dos ml. de cultivo centrifugado y 14 ml de una solución de C.M.C. a una concentración de 0.525 g/l, preparada en solución buffer de citratos pH=4.8. El tiempo de incubación fue de 2 minutos 20 segundos; transcurrido el tiempo, la solución sustrato-enzima se transfirió al viscosímetro, después de 30 segundos se hizo la lectura en la escala del viscosímetro. El tiempo de

reacción fue de 3 minutos. El viscosímetro usado fue Brookfield, modelo RTV de 8 velocidades con un sistema de cilindros concéntricos.

Para definir la actividad enzimática se determinaron velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sobrenadante. La actividad fue reportada como una unidad a la cantidad de enzima que produce el 10% de caída de viscosidad en un minuto, de una solución de C.M.C.

## 2) Colorimetría

Para determinar la actividad por producción de reductores a 5 ml de cultivo centrifugado, se adicionaron 5 ml de una solución de C.M.C. a una concentración de 10 g/l preparada en solución buffer de citratos pH=4.8. La solución enzima-sustrato se incubó durante 30 minutos a una temperatura de 50° C en un baño de temperatura controlada CHRD MAALOX, Edwin L. Wiegand Co De esta mezcla se tomó 1 ml y se determinaron azúcares reductores por el método del 2,3,5 trifeniltetrazolium (Fairbridge 1951). La actividad enzimática fue determinada por comparación de una curva patrón de glucosa en concentraciones de 0 a 200 microgramos de glucosa.

#### 4.11.- Temperatura óptima de la reacción enzimática.

La reacción enzimática se efectuó a 5 diferentes temperaturas manteniendo el pH constante y se evaluó la actividad endoglucanasa midiendo la aparición de azúcares reductores aplicando el método del 2,3,5, trifeniltetrazolium (Fairbridge 1951) y la caída de la viscosidad de una solución de C.M.C.

#### 4.12.- pH óptimo de la reacción enzimática.

Se efectuaron varias reacciones enzimáticas variando el pH en el sustrato y manteniendo la temperatura constante. Se evaluó la actividad endoglucanasa midiendo la aparición de azúcares reductores según el método del 2,3,5, trifenil tetrazolium y la caída de la viscosidad de una solución de C.M.C.

#### 4.13.- Determinación de proteína.

Terminada la fermentación en el fermentador de un litro se centrifugó el cultivo a 7000 rpm durante 10 minutos y se precipitó la proteína usando sulfato de amonio. Se determinó el contenido de proteína en el sobrenadante por el método de Lowry (Lowry et al 1951) empleando como estándar albúmina de plasma bovina.



**Equipo utilizado:**

- \* Espectrofotómetro PYE UNICAM SP 30 UV
- \* Baño de temperatura controlada GCA/ Precisión Scientific THEL CD -184.
- \* Medidor de pH, SARGENT WELCH ,Scientific Co. Model LDX.
- \* Agitador para tubos de ensaye VORTEX MIXER Scientific Industries INC.
- \* Balanza de dos platos HARVARD TRIP BALANCE, Manufacturada by Ohaus.
- \* Baño María, CHRD MAALOX, Edwin L. Wiegand Co.
- \* Agitador MAC-MIX. Precisión Scientific GCA
- \* Incubadora
- \* Viscosímetro Brookfield, modelo RTV, de 8 velocidades con un sistema de cilindros concéntricos.
- \* Fermentador New Brunswick de 800ml.

**Reactivos Utilizados.**

- \* Caldo de Soya Trypticaseina, MERCK
- \* Caldo Nutritivo, MERCK.
- \* Fosfato de potasio, MERCK.
- \* Sulfato de Amonio, MERCK.
- \* Sulfato de Magnesio, MERCK.
- \* Cloruro de Calcio, MERCK.
- \* Sulfato de hierro, MERCK.
- \* Sulfato de Manganeso, MERCK.

- \* Sulfato de zinc, MERCK.
- \* Cloruro de cobalto, MERCK.
- \* Carboximetilcelulosa, DERIVADOS MACROQUIMICOS  
S.A.,C.V.
- \* Reactivos para tinción de Gram.
- \* Peptona, merck
- \* Glucosa, reactivo para laboratorio, J.T. Backer  
S.A. de C.V.
- \* Triptona, MERCK.
- \* Nitrato de potasio, MERCK
- \* Acido sulfonilico, MERCK.
- \* Acido acético, MERCK.
- \* Cloruro de sodio, QUIMICA J.V.C.
- \* Rojo de metilo, SIGMA DE MEXICO
- \* Rojo de fenol, SIGMA DE MEXICO
- \* Papel Wathman # 1
- \* Reactivo de Folin-Diocalteu, MERCK.
- \* Tartrato de sodio y potasio, MERCK
- \* Acido citrico, MERCK
- \* Citrato de sodio, MERCK.
- \* Albúmina de suero bovino cristalizada y liofilizada  
para uso de laboratorio, SIGMA CHEMICAL COMPANY.

## 5.- RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

### 5.1.- Identificación del microorganismo.

La cepa bacteriana seleccionada para este estudio fue un bacilo aerobio, gram positivo, esporulado, cuyo crecimiento en los medios líquidos mostró las siguientes características: En el medio 1 y 2 se observó una ligera opacidad, un sedimento escaso y ausencia de crecimiento superficial, mientras que los medios 3 y 3B mostraron un sedimento compacto, opacidad ligera y también ausencia de crecimiento superficial. El crecimiento en tubos inclinados con medio sólido (3 y 3B) inoculado por estria, fue filiforme, mientras que en las cajas petri las colonias mostraron una forma circular, de superficie lisa con textura viscosa, elevadas y con el contorno de los bordes bien delineado, de color blanco-amarillento, que después de tres días de crecimiento cambió a una coloración amarilla fuerte.

El género de la cepa aislada fué identificado como Bacillus, el esquema experimentado corresponde a la reportada por Harrigan (Harrigan 1976). En la Figura 7 se especifica cada prueba, en ésta se señalan los resultados obtenidos mediante un asterisco.

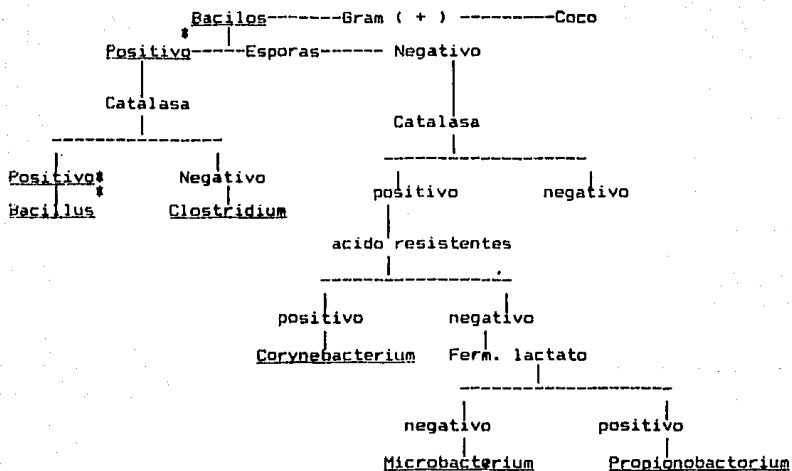


Figura 7 Esquema seguido para identificar género ( Harrigan 1976)  
 (Los resultados observados se señalan mediante un asterisco)

Una vez identificado el género se procedió a definir la especie. Con este fin se consultó la marcha específica para Bacillus de Berkeley (Berkeley 1984). En la figura 8 se muestra la secuencia seguida, en esta se señalan los resultados obtenidos.

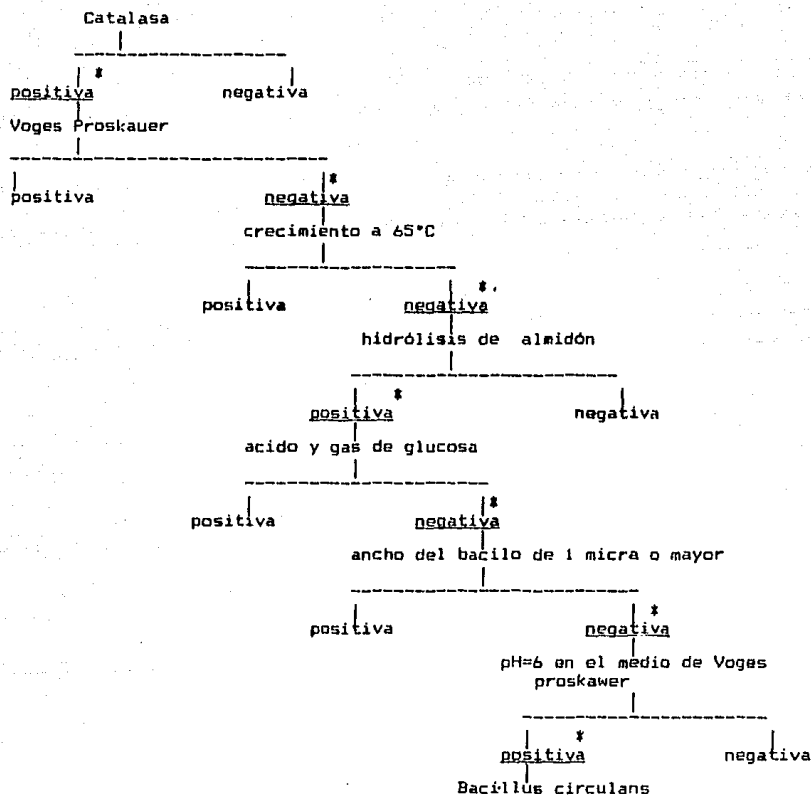


Figura B Esquema para determinar la especie (Berkeley 1984)  
 (Los resultados observados se señalan mediante un asterisco)

Ya identificada la especie se buscó en la literatura la descripción detallada de Bacillus circulans y se comparó con los datos obtenidos de la cepa aislada, a fin de confirmar que la identificación del

Página - 51

microorganismo fuera correcta. En la tabla XVII se muestra dicha comparación.

TABLA XVII Comparación de las características bioquímicas y morfología de la bacteria aislada con Bacillus circulans.

Característica	<u>Bacillus circulans</u>	Bacteria aislada
Tamaño del bacilo	0.5-0.7 u ancho(*)	0.95 u de ancho
Forma de la espora	2-5 largo (*) elíptica o cilíndrica (*)	3-7 largo elíptica
Distención de la Espora, esporangio	+(*)	+
Posición de la espora	central-terminal(*)	terminal
Movilidad	d(**)	-
Catalasa	+(&)	+
Voges-Proskauer	-(&)	-
pH > 6	d (&)	+
en Voges-Proskauer		
Crecimiento en agar anaerobio	d (**)	-
Crecimiento a 50°C	+(&)	-
Crecimiento a 65°C	-(&)	-
Crecimiento en 7%NaCl	d (&)	-
gas de glucosa	-(&)	-
Acidez de glucosa	+(&)	+
Reducción de nitratos	d (**)	+
Hidrólisis de almidón	+(&)	+
Hidrólisis de caseína	-(&)	-

d=variable, (\*) referencia de Buchanan y Gibbons (Buchanan 1972)  
(&) referencia de Berkeley (Berkeley 1984).

Todas las pruebas realizadas para identificar al microorganismo fueron corridas acompañadas de un testigo: Bacillus subtilis, los resultados fueron característicos.

## 5.2.- Caracterización de la enzima.

Se determinó la actividad celulolítica en el sobrenadante del cultivo después de centrifugar.

### a) Actividad celulolítica total.

Fue determinada usando como sustrato papel filtro. La actividad observada fue de 3.93 unidades de papel filtro/mg de proteína soluble.

### b) Actividad celobiohidrolasa.

Se realizó usando como sustrato algodón (Mandels y Weber 1969) La velocidad observada fue de 2.22 unidades/mg de proteína soluble.

### c) Actividad endoglucanasa

Por determinación colorimétrica se obtiene un valor de 0.017 U/mg de proteína soluble.

Para definir las unidades de actividad, evaluada por viscosimetría, se estudió el efecto de la concentración de enzima en las velocidades de reacción. En la figura 10 se muestra la relación de % de caída de viscosidad de una solución al 0.5% de C.M.C. en función del tiempo a diferentes concentraciones de sobrenadante de la fermentación (solución enzimática) de Bacillus circulans. Para evaluar la caída de viscosidad se consideró el 100% a la solución de C.M.C. preparada en buffer antes de adicionarle la enzima.

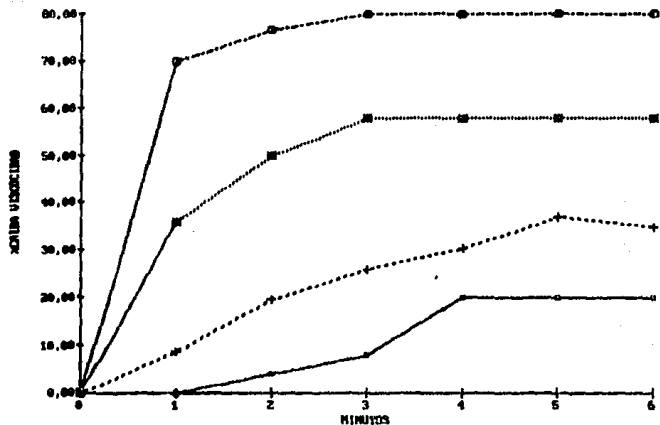


Figura 9 Relación del porcentaje de la caída de la viscosidad de una solución de C.M.C. en función del tiempo para diferentes concentraciones de sobrenadante de la fermentación de Bacillus circulans + 4% \* 10% ■ 1% ○ 100%

De las curvas de la Figura 9 se obtiene la velocidad inicial para diferentes concentraciones de enzima. En la Figura 10 se reporta el efecto de la concentración de enzima en la velocidad de reacción.



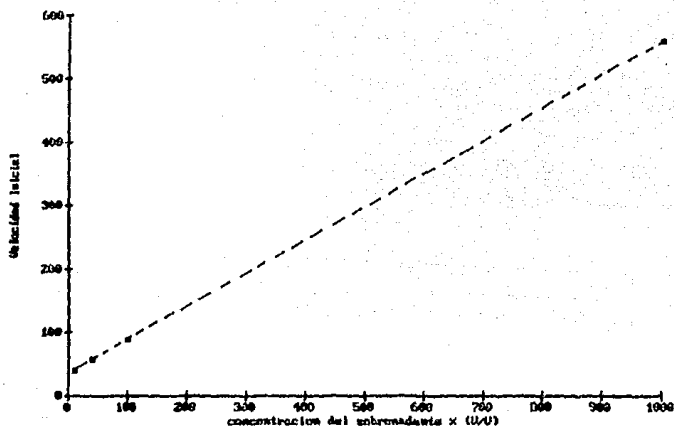


Figura 10 Variación de la velocidad inicial con respecto a la concentración del sobrenadante de la fermentación de Bacillus circulans.

En la Figura 9 se observa que la velocidad decae rápidamente durante los tres primeros minutos de reacción por lo que es necesario trabajar con bajas concentraciones para observar los cambios de viscosidad. En la curva de la Figura 10 se observa una relación lineal entre la concentración de enzima y la velocidad de reacción, para diluciones no mayores a 1/10 (v/v). Este comportamiento ha sido observado en otras enzimas donde está involucrada una reducción en la viscosidad. (Anaya et al 1982). La linealidad observada a concentraciones bajas de enzima nos permite definir la actividad con seguridad. Para los fines de este trabajo, se definió como una unidad de actividad enzimática a la cantidad de enzima que produce el 10% de caída de viscosidad en un

Página - 55

minuto. La actividad en las condiciones mencionadas fue de 69.32 U/mg de proteína soluble.

De esta primera parte de resultados se observa que Bacillus circulans tiene principalmente actividad endoglucanasa ya que reduce drásticamente la viscosidad de soluciones de C.M.C. produciendo poca cantidad de azúcares reductores. Esta característica concuerda con lo reportado por Fogarty (Fogarty 1983) para la composición de los complejos celulolíticos bacterianos. Los resultados también muestran buena actividad hacia celulosa nativa.

#### 5.2.1. Temperatura Optima de la actividad endoglucanasa.

Se probaron siete diferentes temperaturas. Las unidades observadas para cada prueba fueron registradas siguiendo el mismo sistema empleado para detectar la actividad endoglucanasa.

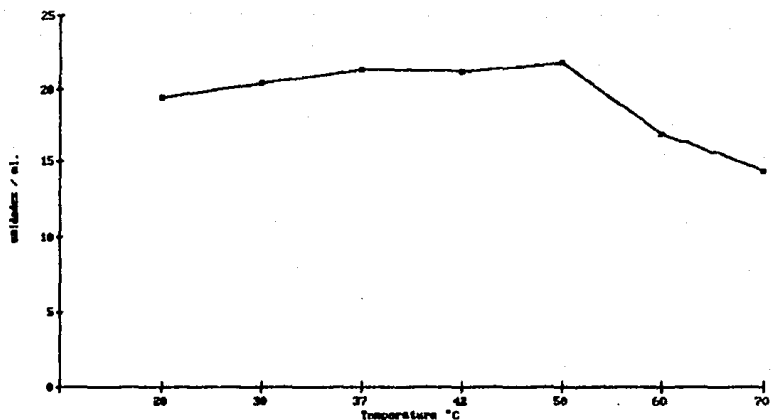


Figura 11 Efecto de la temperatura en la actividad endoglucanasa, determinada por viscosimetría, en el sobrenadante de la fermentación de Bacillus circulans

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos en la determinación por viscosimetría, en ella se observa un nivel de actividad enzimática muy similar entre los 37°C y los 50°C, con una ligera tendencia a aumentar la velocidad al aumentar la temperatura, después de los 50°C la actividad disminuyó drásticamente.

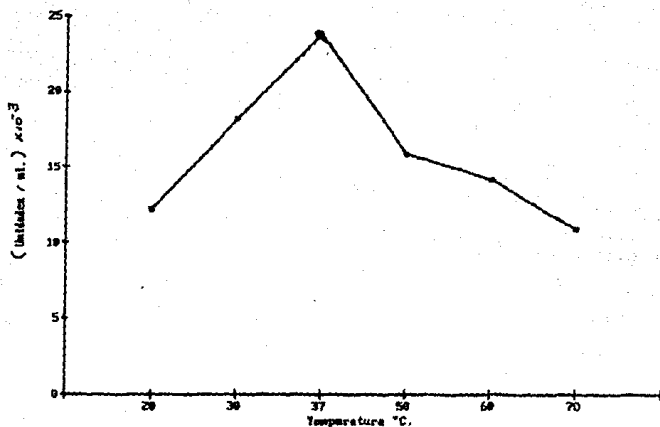


Figura 12 Efecto de la temperatura en la actividad endoglucanasa, determinada por colorimetría, en el sobrenadante de la fermentación de Bacillus circulans.

En la figura 12 se reportan los cambios de actividad determinados por colorimetría, en ella se observa un máximo de actividad a los treinta y siete grados centígrados.

#### 5.2.2.- pH óptimo de la actividad endoglucanasa.

Para estudiar el efecto del pH se fijó la temperatura en 37°C y se midió la actividad endoglucanasa en varios valores de pH, en el intervalo de 6 a 9. En las figuras 13 y 14 se muestra el comportamiento obtenido.

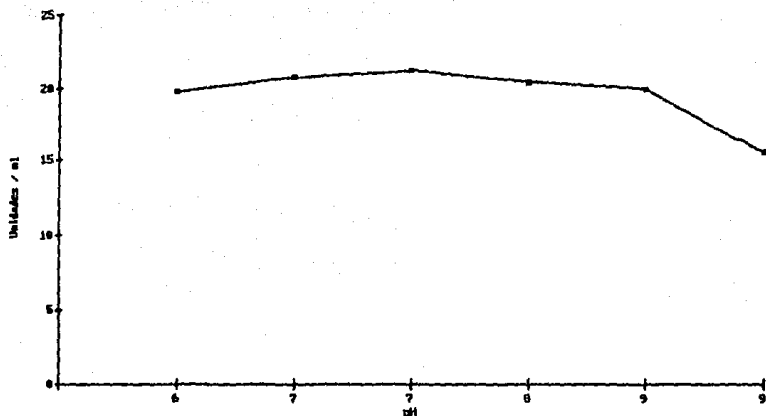


Figura 13 Efecto de los cambios de pH en la actividad endoglucanasa, determinada por viscosimetría, en el sobrenadante de la fermentación de Bacillus circulans.

Como se puede observar en la figura 13, la máxima actividad determinada por viscosimetría se obtuvo a un pH=7 mientras que la actividad evaluada por colorimetría se incrementó al aumentar el pH en el intervalo estudiado ( Figura 14).

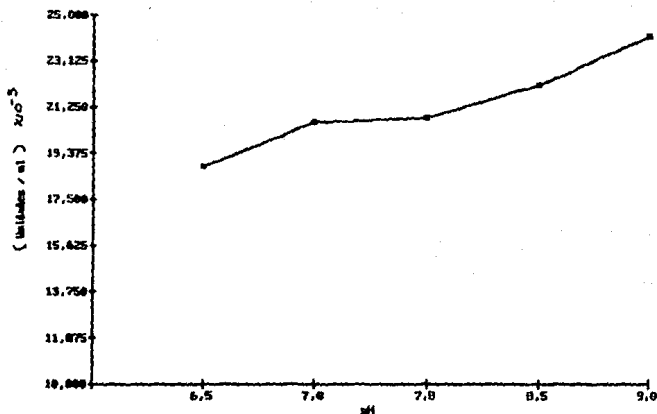


Figura 14 Efecto de los cambios de pH en la actividad endoglucanasa, determinada por colorimetría, en el sobrenadante de la fermentación de Bacillus circulans.

Con base en estos resultados se eligieron una temperatura de 37°C y un pH=7 para medir la actividad endoglucanasa en experimentos subsiguientes.

### 5.3.- Selección del medio de crecimiento.-

En la definición de un medio de cultivo para el microorganismo aislado, primeramente se llevaron a cabo fermentaciones en los medios reportados como 1,2,3 y JA y se observó el crecimiento determinando los cambios de absorbancia en cada medio. Los resultados se reportan en la tabla XVIII.

TABLA XVIII Cambios de absorbancia en los medios de cultivo durante el crecimiento de Bacillus circulans.

Tiempo días	# Medio # 1 abs. 650nm	Medio # 2 abs. 650nm	Medio #3A abs. 650nm	Medio #3B abs. 650nm
0	0.01	0.002	0.020	0.020
1	0.02	0.350	0.425	0.750
2	0.02	0.650	0.725	0.900
3	0.04	0.111	0.690	0.800
4	0.04	0.111	0.690	0.800
5	0.05	0.111	0.690	0.800
6	0.06	0.110	0.690	0.800
7	0.08	0.111	-	-
8	0.08	0.111	-	-

\* Todos los valores son un promedio de triplicados  
 (-) muestras contaminadas

Estos primeros resultados permitieron dar información acerca de los componentes necesarios para el crecimiento del microorganismo y seleccionar el medio de cultivo. Como puede observarse, el medio 3B resulta ser el mas adecuado entre los inicialmente probados para cultivar el microorganismo.

#### 5.4 Selección del medio de cultivo.

Los cambios de actividad endoglucanasa y lecturas de absorbancia en los diferentes medios probados para seleccionar el medio de cultivo se muestran en la tabla XIX

Tabla XIX Cambios en la actividad endoglucanasa y lecturas de absorbancia Selección del medio de crecimiento.

Medio	D.O.	Unidades/ml
A(E.L.,pept.,per.)	0.90	13.00
B(E.L.,pept.,bagazo)	0.90	13.96
C(E.L.,pept.,C.M.C.)	0.61	18.00
D(E.L.,(NH)SO <sub>4</sub> ,C.M.C.)	0.04	--
E((NH)SO <sub>4</sub> ,C.M.C.)	0.45	8.00
F(urea,C.M.C.)	0.05	--
G(E.L.,urea,C.M.C.)	0.33	5.66
H(pept.,C.M.C.)	0.45	5.33
I(E.L.,C.M.C.)	0.31	6.66

La composición de cada medio se reporta en Materiales y Métodos, E.L.=extracto de levadura, pept.=peptona,C.M.C.=carboximetilcelulosa. El tiempo de incubación para cada medio fue de 24 horas y la temperatura de crecimiento 28°C. Cada medio fue fermentado por triplicado la desviación estándar para las lecturas de densidad optica fue de  $\pm 0.05$  y para las lecturas de actividad fue de  $\pm 0.01$

Los resultados de la experimentación anterior manifiestan que es necesaria la presencia de extracto de levadura como fuente adicional de factores de crecimiento, ya que en los medios donde está presente se observan los mejores valores de D.O. y actividad.

En cuanto a la fuente de carbono, los resultados parecen mostrar que puede usarse cualquiera de las tres fuentes alternativas.

Las fuentes de carbono de los medios ocasionan dificultades para medir crecimiento microbiano por turbidez. El papel se desbarata y provoca turbidez extra, y en el caso del bagazo de caña, a este se adhieren



células, lo que impide hacer una lectura correcta. Por estas razones, todas las evaluaciones subsiguientes se efectuaron únicamente por actividad celulolítica, que es objetivo del presente trabajo.

#### 5.4.1 Efecto de la fuente de carbono.

Se corrieron fermentaciones en las que se varió la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno se mantuvo constante, se escogió peptona ya que en la etapa previa se observaron los mejores valores de actividad en los medios que la contenían (Los medios usados corresponden al A,B,C, reportados en materiales y métodos). En la figura 15 se muestra el comportamiento observado en las tres diferentes fuentes probadas; C.M.C., bagazo de caña y papel periódico.

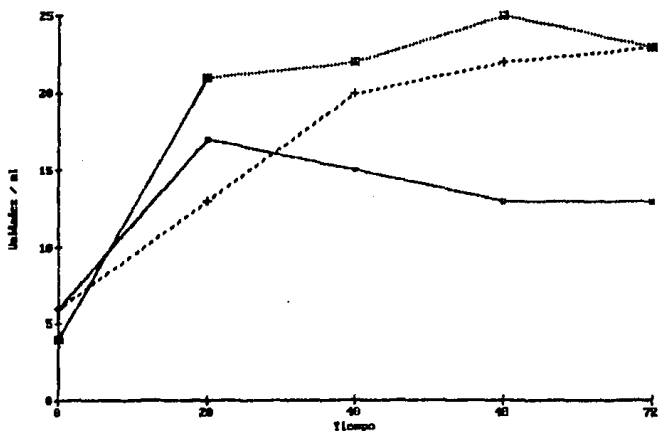


Figura 15 Efecto de la fuente de carbono de la fermentación de Bacillus circulans en la actividad endoglucanasa, determinada por viscosimetría. + Bagazo de caña \* C.M.C. ■ Papel Periódico

En la figura anterior se observa que las mejores fuentes de carbono corresponden a CMC y bagazo de caña. La caída de viscosidad a las 24 horas cuando se usa periódico puede deberse a una inhibición de la enzima por la presencia de la tinta del papel.

De las dos mejores fuentes de carbono, la CMC es más eficiente que el bagazo de caña; sin embargo, en los experimentos posteriores se ha escogido bagazo de caña por su bajo costo.

#### 5.4.2 Efecto de la fuente de nitrógeno.

Usando C.M.C. como fuente de carbono se varió la fuente de nitrógeno, probando tres de las más comunes: urea, sulfato de amonio y peptona (los medios corresponden a los reportados en Materiales y Métodos como: D, E y G), el comportamiento de las fermentaciones se muestran en la Figura 16. La actividad más alta fue obtenida con peptona nuevamente, la cual fue seleccionada como la fuente de nitrógeno para los experimentos subsecuentes

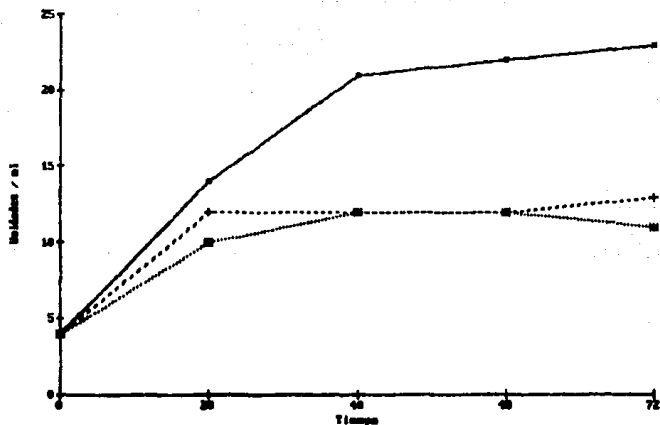


Figura 16 Efecto de la fuente de nitrógeno de la fermentación de Bacillus circulans, en la actividad endoglucanasa, determinada por viscosimetría. + Sulfato de Amonio \* Urea ■ Peptona

Al terminar esta etapa de la experimentación quedó definido el medio basal de crecimiento microbiano, el cual consiste en: 5 g/l de NaCl, 2 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de bagazo de caña, 5 g/l de peptona. Las condiciones de crecimiento fueron: temperatura de 28°C y pH=7.

#### 5.4.3 Optimización del Medio de Cultivo por el método de Box-Wilson.

En la tabla XXI se muestran las variables de respuesta en la experimentación del Box Wilson así como la combinación que corresponde a cada resultado.

Tabla XXI Resultados de la optimización del medio de cultivo de Bacillus circulans.

Experimento	Actividad (viscosimetría) U/ml	Actividad (colorimetría) (U/ml) × 10 <sup>-5</sup>	Niveles			
			A	B	C	D
Basal	21.80	16.80				
1	21.84	18.82	+	+	+	+
2	22.41	34.46	+	+	+	-
3	18.72	13.89	+	+	-	+
4	22.69	28.54	+	+	-	-
5	22.22	35.29	+	-	+	+
6	22.22	4.37	+	-	+	-
7	20.35	16.02	+	-	-	+
8	22.56	41.87	+	-	-	-
9	17.44	13.89	-	+	+	+
10	20.14	34.46	-	+	+	-
11	20.14	17.51	-	+	-	+
12	20.99	23.27	-	+	-	-
13	20.99	23.27	-	-	+	+
14	10.24	39.81	-	-	+	-
15	21.19	11.58	-	-	-	+
16	19.48	33.64	-	-	-	-

Las lecturas corresponden a promedios de duplicados con una desviación estandar de  $\pm 0.12$  para lecturas de actividad por viscosimetría y de  $0.35 \times 10^5$  para lecturas de actividad por colorimetría. Las condiciones de actividad son: T=38°C, pH=7, Sustrato C.M.C. = 0.5%. El tiempo de reacción enzimática para las determinaciones viscosimétrica y colorimétrica son: 3 minutos y 30 minutos respectivamente.

El análisis estadístico de estos resultados, es decir, el coeficiente de cada parámetro individual, así como el producto de las unidades de variación por el coeficiente de regresión, se muestra en las tablas XXI y XXII.

TABLA XXI Relacion del coeficiente de cada parámetro individual para la actividad endoglucanasa determinada por viscosimetría

	pH (A)	T (B)	P (C)	B.c (D)
Coefficiente de Regresión	1.97	0.832	-0.0019	-1.75
Unidades de Variación	1	6	1	5
Coefficiente de Regresión por unidades de variación	1.97	4.992	-0.0019	-8.75

TABLA XXII Relacion de coeficientes de cada parámetro individual para la actividad endoglucanasa determinada por colorimetría.

	pH (A)	T (B)	P. (C)	B.c. (D)
Coefficiente de Regresión	-0.016	-1.0631	0.878	-0.538
Unidades de Variación	1	6	1	5
Coefficiente de Regresión por unidades de variación	-0.016	-6.3786	0.878	-2.69

Como consecuencia de los datos anteriores las ecuaciones que relacionan el rendimiento con los cuatro coeficientes de regresión son las siguientes:

Actividad Endoglucanasa (por viscosimetría)

$$Y=19+1X_1+0.831X_2-0.0018X_3-1.74X_4$$

Actividad Endoglucanasa (por colorimetría)

$$Y=24.16-0.016X_1-1.063X_2+0.878X_3-0.538X_4$$

Dado que los parámetros pH y temperatura presentan los mayores coeficientes de regresión, en lo que respecta a la actividad endoglucanasa, determinada por viscosimetría, debe pensarse que ellos influyen mayormente el rendimiento. Su valor positivo indica que deberán ser aumentados; en cambio, la peptona y el bagazo de caña deberán ser disminuidos.

Con respecto a la producción de azúcares reductores los resultados sugieren que el parámetro que más podría afectar sería la temperatura. Los valores negativos de los parámetros A (pH), B (Temperatura) y D (Bagazo de caña) indican que sería conveniente disminuir los valores del medio basal que corresponden a estos parámetros.

Es importante señalar que estos resultados sugieren incrementar la temperatura del medio de cultivo si se desea reducir la viscosidad de soluciones celulosicas o bien reducir la temperatura si lo que se desea producir es azúcares reductores.

Tomando en cuenta estas consideraciones se diseñaron cinco experimentos más. Consisten en cinco diferentes fermentaciones cuyos medios se escogieron buscando el óptimo para la actividad endoglucanasa determinada por viscosimetría. En la tabla XXIII se muestran los resultados obtenidos.

TABLA XXIII Relación de actividades de los medios formulados para optimizar el medio de cultivo

Medio	Actividad Viscosimetría U/ml	Actividad Colorimetría (U/ml) x 10 <sup>-3</sup>
basal	21.00	16.80
17	20.16	--
18	20.16	48.67
19	20.58	21.35
20	20.53	28.77
21	20.53	28.77

Las fermentaciones fueron realizadas por duplicados con una desviación estándar de  $\sigma = 0.01$  para viscosimetría y de  $\sigma = 0.103 \times 10^{-3}$  para colorimetría.

Puede observarse en los resultados anteriores que no se detectan incrementos significativos en la actividad determinada por viscosimetría, lo que sugiere que el experimento basal se encontraba ya en la zona de producción óptima. En la actividad determinada por colorimetría el mejor medio corresponde al 18. Los resultados anteriores nos sugirieron escoger el medio 18 para los experimentos subsecuentes.

La composición del medio seleccionado es la siguiente: Bagazo de caña 8 g/l, peptona de carne 5.4 g/l, extracto de levadura 3 g/l, NaCl 7.5 g/l, pH=7.6.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

### 5.5.- Fermentación en las condiciones óptimas

(En fermentador de 1 litro).

Una vez seleccionadas las condiciones más favorables para el crecimiento del microorganismo y' producción de las enzimas celulolíticas, se llevaron a cabo dos fermentaciones, a dos temperaturas diferentes: 30°C y 24°C. Ambas se realizaron en un fermentador de 1 litro. El objetivo de efectuarlas a estas dos temperaturas se fundamentó en los resultados del proceso de optimización del medio de cultivo, específicamente en la influencia que este parámetro tiene en la producción de actividad enzimática capaz de reducir soluciones de C.M.C. o de producir azúcares reductores

Los resultados de las fermentaciones se presentan en las figuras 17 y 18.



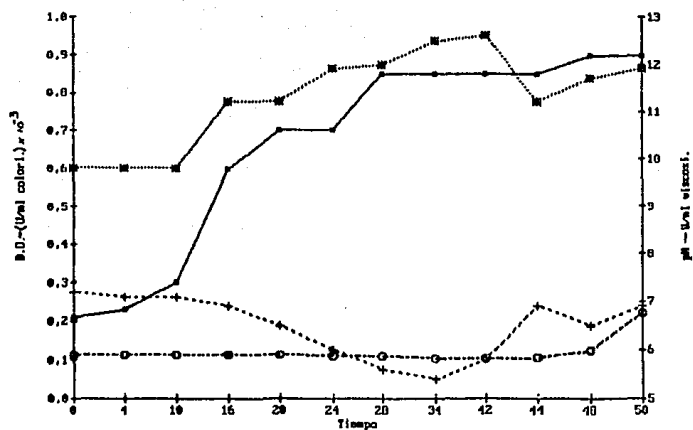


Figura 17 Fermentación a 24 °C la desviación estándar para las lecturas de actividad determinadas por viscosimetría corresponde a 0.01 y para las lecturas por colorimetría a  $0.103 \times 10^3$  + pH \* U/ml Viscosimetría ° U/ml Colorimetría

D.O.

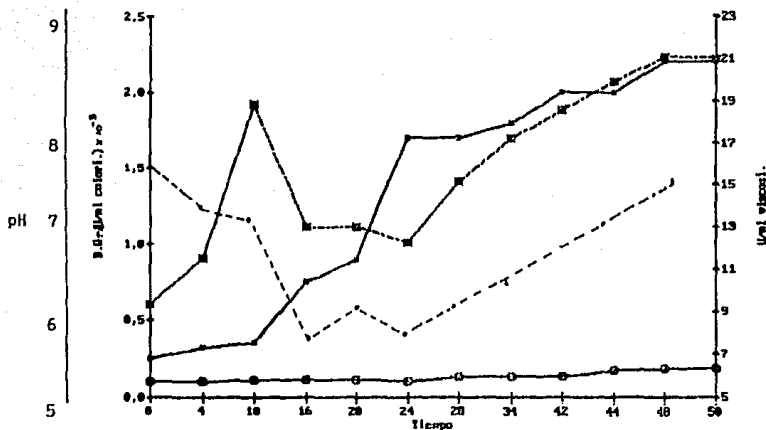


Figura 18 Comportamiento del fermentador a 30°C . La desviación estándar para las lecturas de actividad determinada por viscosimetría corresponde a 0.01 y por colorimetría a 0.103  
 . pH   \* U/ml Colorimetría   \* U/ml Viscosimetría   D.O.

A las temperaturas estudiadas el microorganismo mostró una fase lag de 10 horas aproximadamente, después de la cual se observó una aceleración de crecimiento. En la gráfica correspondiente a la fermentación efectuada a 30°C se observó una segunda fase lag de 4 horas, ya que seguramente en este momento comenzó a utilizar otros componentes del bagazo como fuente de carbono, aunque en esa zona estacionaria puede deberse a la caída de pH que ocurre en ese tiempo causada probablemente a la formación de ácidos al consumo de proteínas. El crecimiento prosigue cumpliendo la fase exponencial, hasta llegar a la estacionaria. Es evidente que en este

punto se presenta un cambio en el crecimiento, ya que el pH ahora se incrementa. En ambas etapas la producción de enzima se mantiene.

En las dos gráficas se observa una caída del pH hasta valores alrededor de 5.7 pero a medida que transcurre la fermentación el pH se recupera hasta un valor cercano a la neutralidad.

En la fermentación efectuada a 30 °C se observa una mayor producción de actividad enzimática capaz de reducir la viscosidad de una solución de C.M.C. La caída de actividad que se observa en la gráfica puede deberse a que el pH baja hasta valores de 5.7, probablemente no conveniente para la enzima, ya que cuando se recupera el pH vuelve a incrementarse la actividad. Por otro lado, experimentos anteriores mostraron que a este pH se observa una baja actividad. Es importante mencionar que este incremento también coincide con la recuperación del crecimiento microbiano.

En las gráficas se observa un ligero aumento en la actividad celulolítica total en la fermentación realizada a una temperatura de 24°C, con respecto a 30°C, lo que coincide con la predicción del estudio estadístico de Box Wilson. La situación inversa se presenta para la actividad endoglucanasa, también predicha por el estudio estadístico. Este sistema es un ejemplo de cómo para un microorganismo que produce varias enzimas la manipulación de las condiciones del proceso fermentativo puede definir los niveles de producción de cada una.

Con el fin de entender el comportamiento de la fermentación se hizo su estudio cinético a 30 °C correspondiente a un proceso de lote o batch. Los datos obtenidos se presentan en la tabla XXIV y en la figura 19 se grafican.

Tabla XXIV Cinética de la fermentación de Bacillus circulans en un fermentador de un litro

Tiempo (hr)	D.O. (650 nm)	P (mg/ml de enzima) mg.	$\mu$	q prod. /ml. hr.
0	0,25	0	-	-
4	0,32	0.143	$9.8 \times 10^{-3}$	$20.1 \times 10^{-3}$
10	0,35	0.205	$2.8 \times 10^{-3}$	$10 \times 10^{-3}$
16	0,75	1.025	$37 \times 10^{-3}$	$77 \times 10^{-3}$
20	0,90	1.333	$21 \times 10^{-3}$	$43 \times 10^{-3}$
24	1,70	2.974	-	-
28	1,70	2.974	-	-
34	1,80	3.17	$9.4 \times 10^{-3}$	$19 \times 10^{-3}$
40	2,00	3.58	$18.8 \times 10^{-3}$	$38 \times 10^{-3}$
44	2,00	3.58	-	-
48	2,20	4.0	$28.2 \times 10^{-3}$	$38 \times 10^{-3}$

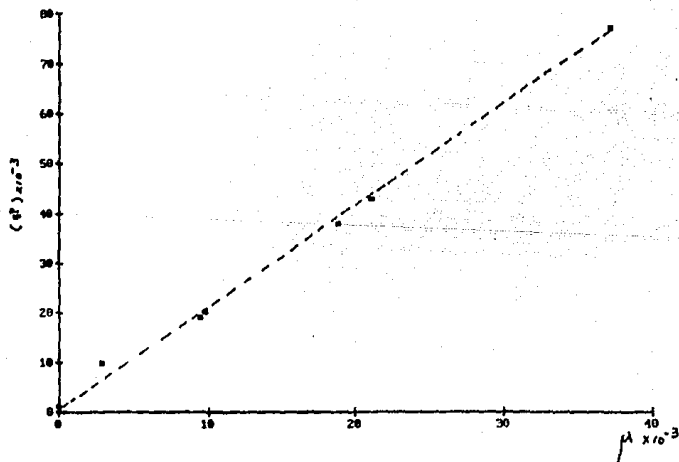


figura 19 Cinética de la fermentación a 30°C.

## 5.6 Recuperación de la enzima

Considerando que, con respecto a las preparaciones comerciales, la actividad del sobrenadante de fermentación es relativamente baja, se decidió precipitar la proteína, para su concentración y parcial purificación. Para ello se escogió el método de precipitación con sulfato de amonio. Los resultados del contenido de proteína y la actividad enzimática del sobrenadante a cada concentración de sulfato de amonio se registran en la figura 20.

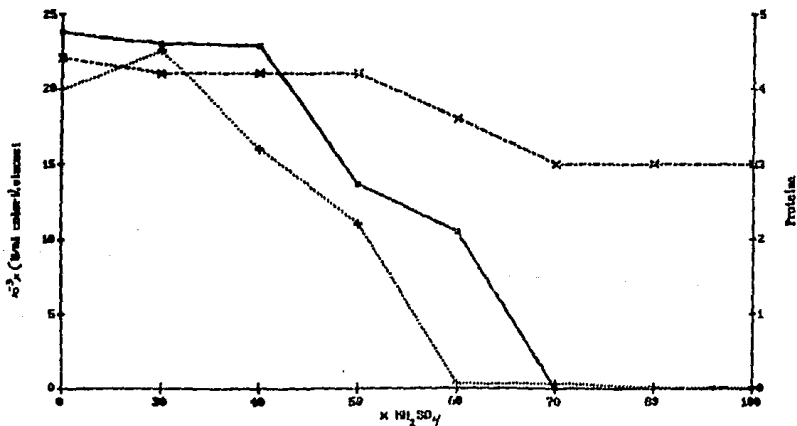


figura 20 Comportamiento de la precipitación de la proteína con sulfato de amonio • Proteína U/ml Colorimetría x U/ml Viscosimetría

Se observa que el comportamiento de las enzimas celulolíticas es el siguiente: Entre 50% y 70% precipita la actividad

enzimática responsable de producir mayor cantidad de azúcares reductores. La de actividad determinada por viscosimetría presentó interferencias debidas probablemente a la presencia de los iones amonio y sulfato, por lo que no pudo detectarse la fracción de sulfato de amonio en la que precipita.

## CONCLUSIONES.

Una bacteria celulolítica fue aislada de una carboximetilcelulosa contaminada. Fue identificada como Bacillus circulans, la cual produce endo beta-(1,4)glucanasa con un pH óptimo de 7.8 y una temperatura de 50°C. El sobrenadante muestra una actividad celulolítica total muy baja y que no es comparable con alguna comercial.

El medio y condiciones de crecimiento para una producción óptima de endoglucanasa son: Bagazo de caña 8 g/l, peptona de carne 5.4 g/l, extracto de levadura 3 g/l, NaCl 7.3 g/l, pH=7.6 T=30°C.

La aplicación de la técnica de Box Wilson y las fermentaciones en fermentador de 1 litro muestran que con incrementos de temperatura se obtiene una mayor actividad endoglucanasa determinada por viscosimetría. Por otro lado el decremento en temperatura promueve la actividad colorimétrica.

Dado el comportamiento de los procesos fermentativos es probable, que una regulación del pH del medio resulte en una mayor producción.

La enzima podría tener una aplicación en la reducción de la viscosidad en la producción de concentrados de fruta seca y productos vegetales. Sin embargo para degradar completamente la celulosa es necesario complementar, como es el caso de todas las celulasas bacterianas, con actividad celobiohidrolasa.

## BIBLIOGRAFIA

- Almin, K., Eriksson, K., Janson, H. Enzymatic Degradation of Polymers I. *Biochim. Biophys. Acta*, 139 238-247 1967.
- Almin, K., Eriksson, K., Janson, Ch. Enzymatic Degradation of Polymers II. *Biochimica et Biophysica Acta* 139 248-253 1967.
- Almin, K., Eriksson, K., Pettersson, B. Extracellular Enzyme System Utilized by the Fungus *Sporotrichum pulverulentum* for the Breakdown of Cellulose. *Eur. J. Biochem.* 51 207-211 1975.
- Allgen, L., Roswall, S. Properties of Carboxymethylcellulose. *J. Polymer Sci.* 7 229-231 1954.
- Anaya, M., López-Munguía, A., Arjuna, J. Continuous clarification of pectin solutions in a basket reactor with immobilized commercial pectinases in: Dupuy P. (ed.) Use of enzymes in food technology. Techniques, et documentation Lavoisier, Paris 503-512 1982.
- Avilés M. Memorias del Seminario "Utilización de recursos celulósicos en la alimentación animal CINVESTAV IPN México, D.F. 1980.
- Barra, D., Moore A., Enzyme-Substrate Relationships Among -glucan Hydrolases. *Advances in Chemistry* 105-137 1969.
- Berkeley, R. *Methods in Microbiology* 1984
- Box, W., Wilson, K. *Methods Statistical Box Wilson. J. Royal Statistical Soc. B.* 13 (1) 1-45 1951.
- Brandt, D., Hontz, L. Hydrolysis of Wastes by Microbial Cellulases. *Aiche Symp. Ser.* 69 127-132 1973.
- Brandt, D., Mandels, M. Engineering Aspects of the Enzymatic conversion of wastes cellulose to glucose. *Aiche symposium series* 69 127-133 1969.
- Breuil C., Mayers P. Substrate Conditions that influence the assays used for determining the -glucosidase Activity of Cellulolytic Microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering* 28 1653-1656 1986.
- Bruchmann, E., Schach, H., Graf, H. Role and Properties of Lactonase in a Cellulase System. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 9 146-159 1987.
- Buchanan, R. *Gergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Gibbons 1972.
- Buchholz, K. Hydrolysis of Cellulosic Wastes. *Process Biochemistry Dec./Jan.* 37-43 1980/81.
- Clayton, D. How Engineers are putting Microbes to work. *Chemical Engineering* 21 160-164 1970.



Coutts, A. , Smith, R. Factors Influencing the Production of Cellulase by Sporotrichum thermophile. Applied and Environmental Microbiology, 31 (6) 819-825 1976.

Cowling, B., Brown, W. Structural feature of cellulosic materials in relation to Enzymatic Hydrolysis. Advances in Chemistry series 155-185 1969.

Cowling, B. , Wynford, B. Components of Cellulose. Symp. of cellulases. American Chemical Society. U.S.A. 1969

Cowling, E. , Kirk, T. Components of Cellulose Biothecnology and Bioengineering. Symp. 6 1976.

Cronshaw, J., Preston, R. Structure of Cellulose. Nature 181 248-257 1958.

Dunlap, Ch. Nutrients from cellulose. Food Technology dec. 63-67 1975.

Durard, H. Comparative Study of Cellulases and Hemicellulases from four Fungi: mesophiles Trichoderma reesei and Penicillium sp. and thermophiles Thielavia terrestris and Sporotrichum Cellulophilum Enzyme Microb. Technol. 6 175-180 1984

Dyer, E. Carboxymethylcellulose. J. Am. Chem. Soc. 74 2677-2688 1952

Enari, T. in: Microbial Enzymes and Biotechnology. Appl. Sci, Pub., England Fogarty (eds.) 1983.

Eriksson, K. New Methods for the Investigations of Cellulases. Advances in Chemistry series 83-104 1969.

Erken, J. , Gorsoy, J. Thermophilic that Decompose Crystalline Cellulose Arch. Microbiol. 110 233- 235 1976.

Eveleigh, D. Monteneourt, B. Antibiotic Disks-An Improvement in the filter paper assay of cellulase. Biothecnology and Bioengineering 20 297-300 1978.

Fairbridge, R., Willis, K. The direct Colorimetric Estimation of Reducing Sugar and other Reducing Substances with Tetrazoliums Slats. in: Southgate, D. The determination of Food Carbohydrate. Applied Science Published LTD London. 1976.

Fisher, M. Blnder A., The value of Food. Oxford University Press 1970.

Fogarty, W. (ed.) Microbial Enzymes and Biotechnology. Appl. Sci. Pub. Essex England 1983.

Friedrich, J. , Cimerman, A. , Perdih, A. Comparison of different Cellulolytic Fungi for Bioconversion of Apple Distillery Waste. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24 432-436 1986.

Gallo, B. , Andreotti, R. , Roche, Ch. , Ryu, Dewey. , Mandels, Mary. Cellulose Production by a New Mutant Strain of Trichoderma reesei MCG 77. Biotechnology and Bioengineering Symp. No.8 89-101 1978.

- Ghose, T. Structure of Cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 11 239-243 1969
- Godfrey, T. Plant Tissues Industrial Enzymology. The Application of Enzymes in Industry. ed. Godfrey, T. McMillan Pub. Ltd. Hong Kong 1983.
- Harrigan, W.F., McCance, D. Laboratory Methods in Food Dairy Microbiology. Academic Press. 1976.
- Hess, M. Structure of Cellulose *Gütter Kolloid.* 2 155-162 1957
- Hotsten L. Microbial Enzymes and Biotechnol. *Appl. Sci. Pub.* 1983
- Howell, J. Enzyme the Activation during Cellulase Hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 20 847-863 1978.
- Hulme, M. Viscosimetric Determination of Carboxymethylcellulase in Standard International Units. *Archives of Biochemistry Biophysics* 147 49-54 1971.
- Jensen, L. The Coryneform Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 6 77-90 1952.
- Jones, D. A Numerical Taxonomic Study of Coryneform and Related Bacteria. *Journal of General Microbiology* 87 52-96 1975.
- Jones, D. Structure and some Reactions of Cellulose. *Advances in Carbohydrate Chemistry.* 19 219-246 1964.
- Joslyn E. *Methods in Food Analysis* 2ed. Academic Press 1970.
- Jozica, F. Cellulolytic Fungi. *Appl. Microbial Biotechnol.* 241 432-438 1986.
- Jurasek, L., Colvin, R., Whitaker, R. Microbiological Aspects of the Formation and Degradation of Cellulosic Fibers. Cellulose and Cellulolysis by: Birgitta Norkans. 1980
- Karabinos, Carboxymethylcellulose. *Advances in Carbohydrate Chemistry* 9 285-302 1954.
- Katz, M., Reese. Hydrolysis of Cellulose. *E. Appl. Microbiol* 16 419-423 1968
- Kaufman, D., Fegan, J., Doleac, P. Cellulase Production during growth of Cellulomonas flavigena *Gen. Microbiol.* 94 405-412 1976.
- King, K. Enzymes of the Cellulase Complex. *Advances in Chemistry series.* 7-23 1969.
- Komura, I., Waot, K. *Us Pat.* 4106 989 1978.
- Lee, Y., Fan, T. Kinetic Studies of Enzymatic Hydrolysis of Insoluble Cellulase: Analysis of the initial rates. *Biotechnology and Bioengineering* 24 2383-2406 1982.
- Linder, A., Dennison, C. Pitt falls in the Assay Carboxymethylcellulase Activity. *Biotechnology and Bioengineering* 25 377-385 1983.

- Lowry U., Rosebrough, N., Lewis, A., Randall, F. Methods for determination of Proteina Bio. Chem. 193 265-275 1951
- Manley, R. Structure of Cellulose. Nature 204 1155-1172 1964.
- Markianen, B. Proceedings of Symposium Bioconversion in Food Technology IP Linné VTT, Espo VII 1975.
- Masuo, E., Nakagawa, T. Numerical Classification of Bacteria. Agr. Biol. Chem. 33 8 1124-1133 1969.
- McCance M. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press 1976.
- McFadin L. Methods in Microbiology 1971.
- McHale, A., Coughlan, P. A convenient zymogram stain for Cellulase. Biochem. J. 192 267-268 1981.
- McHale, A., Morrison, J. Cellulase production during growth of Talaromyces emersonii CBS 814.70 on Lactose Containing Media. Enzyme Microb. Technol. 8 749-754 1986.
- Miller, G., Blum, R. Measurement of Carboxymethylcellulase Activity. Analytical Biochemistry 2 127-132 1960.
- Moloney A., Considine P. Cellulose Hydrolysis by the Cellulases Produced by Talaromyces emersonii when Grown on Different Inducing Substrates. Biotechnology and Bioengineering 25 1169-1173 1983.
- Moloney, A., Hackett, T. Coughlan, P. Isolation of Mutants of Talaromyces emersonii CBS 814.70 with enhanced Cellulase Activity. Enzyme Microb. Technol. 5 260-264 1983.
- Morrison, R. Boyd, R. Organic Chemistry Copyright 1973.
- Nakamura, K., Kitamura, K. Isolation and Identification of Crystalline Cellulose Hydrolyzing Bacterium and its Enzymatic properties. J. Ferment. Technol. 6 4 343-348 1982.
- Nikerson R. The relative Crystallinity of Celluloses. Advances in Carbohydrate Chemistry 5 103-126 1950
- Okada, G., Nisizawa, K., Suzuki, H. Cellulase Componentes from Trichoderma viridae The Journal of Biochemistry. 63 (5) 1968.
- Olutiota, P. Comparison of different Cellulolytic fungi Physiol. Plant. 39 243-245 1977.
- Oshima, H., Sakata, M. Enhancement of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose by Surfact. Biotechnology and Bioengineering 28 1727-1734 1986
- Park W., Dewey D., Ryu, D. Cellulolytic Activites of Clostridium thermocellum and its Carbohydrate Metabolism. J. Ferment. Technol. 61 (6) 563-571 1983
- Petterson, L. Symp. on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Helsinki 1975

- Pettipher, F., Latham, G. Cellulase Production by Strain of Ruminococcus flavefaciens. Journal of General Microbiology 110-121 1973.
- Poutts, R., Hewith, P. Activity Cellulase by Termitas. Comp. Biochem. Physiol. 47B 327-331 1974.
- Ranby, B. Recent Progress on the Structure and Morphology of Cellulose. Advances in Chemistry series 139-151 1969.
- Reed G. (ed.) Enzymes in Food Processin. Academic Press.
- Reese, E. Estimation of  $\text{exo-}\beta\text{-1}\rightarrow\text{4-glucanase}$  in crude Cellulase solutions. Advances in Chemistry series 26-33 1969.
- Reese, E. History of Cellulase Program at the U.S. Army Natick Development Center. Biotechnolog. Bioeng. Symp. 6 9-20 1976
- Reese E. memorias of Symposium in Enzymatic Hydrolyses of Cellulose 1975
- Romanelle, R., Houston, E. Factors Influencing the Production of Cellulase by Thermoascus aurantiacus Appl. Microbiol. 30 276-281 1975.
- Selby, K. The Purification and Properties of the C1-component of the Cellulase Complex. Advances in Chemistry series 34-51 1969.
- Siu, G. A perspective on Cellulase Research. Advances in Chemistry series 1-5 1969.
- Skare, J. Agricultural Residues Including Feedlotwastes. Biotechnol. Bioeng. Symp.#6 236-246 1976.
- Skinner W., Tokuyama F. US Pat. 40B1328 972
- Srinivasam V. in: Symp. of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Bailey E. (eds.) Helsinki 1975.
- Stenberg, D. Vijayakumer, P. Can. J. Microbiol. 23 139-145 1977.
- Stevens, B., Payne, J. Comparison of different cellulolytic yeast. J. Gen. Appl. Microbiol. 100 381-385 1977.
- Stone, J., Skallan, A. Digestibility as a simple funtion of a molecule of similar size to a Cellulase Enzyme. Advances in Chemistry series 217-241 1969.
- Sukhumavasi, J., Ohmiya, Y., Shimizu, S. Conversion of Tough to Useful Compounds by an Anaerobe Isolated from Compost. J. Ferment. Technol. 62 (6) 545-550 1974.
- Suzuki, H., Yamane K. Ext acellular and Cell-bound Cellulase component of Bacteria. Advances in Chemistry series 80-81 1969.
- Tan, L., Saddler, J. Column Cellulase Hydrolysis reactor: the effect of retention time, temperature, Cellulase concentration and exogenously added Cellobiose on the overall process. Applied Microbiology Biothecnoogy 26 21-27 1987.

Tanaka, M. , Morita, T. , Taniguchi, M. Saccharification of Cellulose by Combined Hydrolysis with Acid and Enzyme. J. Ferment. Technol. 59 (6) 517-524 1980.

Taya, M. , Hinoki, H. , Suzuki, Y. , Yagi, T. , Yag. M. , Kobayashi, T. New Thermophilic Anaerobes That Decompose Crystalline Cellulose. J. Ferment. Technol. 63 (4) 383-387 1985.

Tejada, I. Memorias del Seminario "Utilización de recursos celulósicos en la alimentación animal" CINVESTAV IPN México, D.F. 1980

Thayer, E. Comparison of different Microbial Cellulases J. Gen. Microbiol. 95 287-293 1976.

Toyama, N. Applications of Cellulase in Japan. Advances in Chemistry series 359-389 1969.

Velasco C. Memorias del Seminario "Utilización de recursos celulósicos en la alimentación animal" CINVESTAV IPN México, D.F. 1980.

Warwick, L. , Gray, P. Evaluation of the DNS Method for Analysing Lignocellulosic Hydrolysates. J. Chem. Tech. Biotechnol. 32 1016-1022 1982.

Warzywoda, M. Development of a culture medium for large-scale production of Cellulolytic Enzymes by Trichoderma reesei. Biotechnology and Bioengineering 25 3005-3010 1983.

Wasserman, B. Thermostable Enzyme production. Food Technology feb. 78-98 1984.

Waterbury, J. A Cellulolytic Nitrogen-Fixing Bacterium Cultured from the Gland of Deshayes in Shipworms. Science 221 1401-1403 Septiembre 1983.

Weimer P., Zeikus L. J. Appl. Envir. Microbiol. 33 333-335 1983.

Wilke, Ch. Preliminary cost Analyses for Enzymatic Hydrolysis of Newsprint. Biotechnology and Bioengineering Symp. 6 155-175 1976.

Wood T. int. Symp. on Wood and pulping Chemistry Stockholm 1965.

Yagi, T., Kobayashi, T. Anaerobic Cellulose digestion and characterization of the Cultivation Process in tower - type Fermentor. Journal Ferment. Technol. 63 4 363-370 1985.

Yamada, K., Komagata, K. Taxonomic Studies on Coryneform Bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 18 417-431 1972.

Zeikus, K. Factors Influencing the Production of Cellulase by Clostridium, Annual Reviews Microbiology 34 423-429 1980

Zimmerman, M. The formation of wood forest trees. Academic Press N.Y. 1964

Zuzuki, K. , Yamane K. Cellulase Production by Pseudomonas fluorescens Biotechnol. Bioeng. Symp. 6 1979.

## An endoglucanase from an isolated strain of *Bacillus circulans*

María de los Angeles Olvera-Treviño, María del Carmen Wachter-Rodarte, and Agustín López-Munguía Canales

Departamento de Alimentos, División de Ingeniería, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F.

**Summary.** A cellulolytic bacterium was isolated from a carboxymethylcellulose production plant, where it caused dramatic damage due to its high cellulolytic activity. It was identified as *Bacillus circulans*, and found to produce endo- $\beta$ -1,4-glucanase with pH and temperature optima of 7.8 and 50°C respectively. It also showed good activity towards native cellulose. Conditions for optimum endoglucanase production were a medium containing 8 g/l sugar cane bagasse, 5 g/l peptone, 2 g/l yeast extract and 5 g/l NaCl, at a pH of 7.6 and incubation temperature of 30°C. Diauxic growth and increase in endoglucanase activity throughout the fermentation were observed on this medium in a 1-l fermentor. The bacterium showed excellent endoglucanase activity, but would have to be used in conjunction with other enzymes to degrade native cellulose completely.

(EC 3.2.1.4), which hydrolyses  $\beta$ -1,4-glycosidic linkages randomly; (2) cellobiohydrolase (exo- $\beta$ -1,4-glucanase) (EC 3.2.1.91), which splits off cellobiose units from the non-reducing end of the chain; (3)  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21), which hydrolyses cellobiose and cello-oligosaccharides to glucose. A wide variety of fungi are able to produce mixtures of all three enzymes. However, in general, bacteria are known to produce only endoglucanases and a few exceptions are reported to produce extracellular  $\beta$ -glucosidase (Enari 1933).

The objective of this investigation was to identify the strain that showed the best cellulolytic activity and to study the type and properties of the cellulases produced, growth medium required and production kinetics.

### Introduction

A microbial contamination was detected in a carboxymethylcellulose (CMC) production plant, where it caused dramatic damage due to its high CMC-lytic activity. Toothpastes in which this CMC was being used as a thickening agent were liquefied and their containers became inflated.

Eight bacterial strains were isolated from the contaminated CMC and were able to grow and decrease the viscosity of CMC broths. One of these strains was selected for further investigation due to its high activity towards this polymer. There are three major types of cellulase (Enari 1933): (1) endoglucanase (endo- $\beta$ -1,4-glucanase

### Materials and methods

**Identification.** The isolated culture was subjected to diagnostic tests according to Berkeley et al. (1964)

**Culture conditions.** A broth of the following composition was used in growth experiments: meat peptone, 5 g/l; yeast extract, 2 g/l; NaCl, 5 g/l; CMC with a substitution degree of 0.95, 10 g/l; pH = 7. This medium was modified as described in Results and discussion for the fermentor experiments.

Shake-flask experiments were carried out in 250-ml erlenmeyer flasks stoppered with cotton plugs and containing 150 ml medium. The broths were inoculated with a culture in the exponential growth phase, containing approximately  $5 \times 10^8$  cells/ml. They were incubated at 28°C (unless otherwise indicated) and at 100 rpm in a New Brunswick Controlled Environment Incubator Shaker, Model G25 (Edison, New Jersey, USA). Two flasks were removed at every sampling time for analysis. Fermentor experiments were conducted in a bench scale Bio-Flo fermentor (Edison, New Jersey, USA) with a working volume of 500 ml. Constant aeration at 1.5 vvm and 100 rpm was maintained throughout the experiment. Ten millilitre samples were removed at timed intervals for analysis.

**Overall measurement** Microbial growth was estimated by measuring the optical density of the cultures at 650 nm. A standard curve of cell number vs optical density was made.

**Enzyme activity** A culture supernatant was obtained by centrifuging the cultures at 7500 rpm for 10 min. The following activities were measured: exoglucanase (on cotton), endoglucanase (on CMC) and filter paper activities, according to Mandel and Weber (1969). The number of units per millilitre in each case was the inverse of the dilution required to give 0.50 mg reducing sugar as glucose. To measure the viscosimetric endoglucanase activity, enzyme extract (2 ml) at an appropriate dilution was added to 14 ml of 0.5% CMC solution in 0.01 M acetate buffer, pH 5, and incubated for 3 min at 38 °C. Viscosity was measured in a Brookfield viscosimeter model LBT with UL adaptor (concentric cylinders), with spin speed of 50 rpm (Stoughton, Mass., USA). One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that reduced viscosity by 10% in 1 min.

**Protein determination** Protein was measured with bovine serum albumin as standard by the method of Lowry et al. (1951). Specific enzyme activity was expressed in terms of total soluble protein.

## Results and discussion

### Identification

The isolated strain was an aerobic, Gram-positive rod, which formed yellow, circular, glistening colonies on nutrient agar. The tests that led to its identification as *B. circulans* are shown in Table 1. It has been reported that some strains of *B. circulans* degrade cellulose weakly (Buchanan and Gibbons 1975).

### Enzyme characterisation

Cellulase activities determined in the culture supernatant after centrifugation and referred to as soluble protein were: 3.93 filter paper units/mg protein, an exoglucanase (on cotton) activity of 2.22 U/mg protein, an endoglucanase (on CMC) colorimetric activity of 0.017 U/mg protein and an endoglucanase viscosimetric activity of 69.32 U/mg protein. As can be observed, *B. circulans* produced mainly endoglucanase activity. It drastically reduced the viscosity of CMC solutions, producing very few reducing sugars. It also showed good activity towards native cellulose.

The percentage decrease in viscosity at different enzyme concentrations for *B. circulans* with the fermentation supernatant, and the effect of enzyme concentration on the rate of reaction are shown in Fig. 1 and 2. Viscosity decreased rapidly during the first minutes of the reaction, and after-

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of the isolated bacterium, as compared with *Bacillus circulans*

Characteristics	<i>B. circulans</i>	Isolated bacterium
Size of rods	Width, 0.5–0.7 $\mu$ Length, 2–5 $\mu$ Elliptical or cylindrical*	Width, 0.95 $\mu$ Length, 3–7 $\mu$ Elliptical
Spore shape	+	+
Spore distends sporangium	+	+
Spore's dominant position	Central-terminal*	Terminal
Motility	v**	-
Catalase	+	+
Voges-Proskauer	+	+
pH in Voges-Proskauer	<6	-
Growth in anaerobic agar	v**	-
Growth at 50 °C	+	-
Growth at 65 °C	+	-
Growth in 7% NaCl	v*	-
Gas from glucose	-*	-
Acid from glucose	+	+
Nitrate reduction	v**	+
Starch hydrolysis	+	+
Casein hydrolysis	-*	-

\* From Buchanan and Gibbons (1975)

\*\* From Berkeley et al. (1984); v, variable character

wards very slight changes were observed during the experimental measurements. Very low enzyme concentrations were needed in order to observe viscosity changes in the first 3 min of reaction. The 100% value was the viscosity of the CMC solution when buffer instead of enzyme solution was added. A linear relationship between enzyme concentration and rate of reaction was found for enzyme extract dilutions not greater than 1/10 (v/v). This behaviour has been observed in other en-

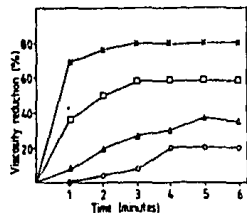


Fig. 1. Percentage decrease in viscosity as a function of time for different dilutions of *Bacillus circulans* fermentation supernatant v/v: O, 1%; Δ, 4%; □, 10%; ▲, 100%

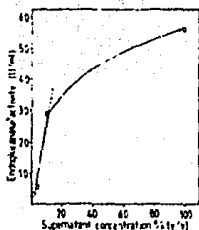


Fig. 2. Effect of *B. circulans* endoglucanase concentration on the rate of reaction. The enzyme was used directly from the fermentation broth and diluted as indicated.

zymes involved in viscosity reduction (Anaya et al. 1982). The optimal temperature and pH were found to be 50°C and 7.8 respectively.

#### Culture medium definition

**Carbon source (Fig. 3).** In shake flask experiments CMC, newspaper and sugar cane bagasse were used as sources of carbon. The highest activities were produced with CMC and sugar cane bagasse; similar results at the end of the fermentation in terms of enzyme activity were found. The activity when newspaper was used was inhibited, possibly because of the ink. Sugar cane bagasse, being a waste material, was chosen as the carbon source for further experiments.

**Nitrogen source (Fig. 4).** Urea, ammonium sulphate and peptone were used as sources of ni-

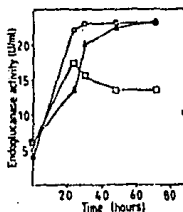


Fig. 3. Effect of different sources of carbon on the production of endoglucanase activity by *B. circulans* in shake flasks: O, carboxymethylcellulose; Δ, sugar cane bagasse; □, newspaper.

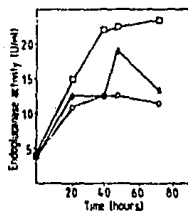


Fig. 4. Effect of different sources of nitrogen on the production of endoglucanase activity by *B. circulans* in shake flasks: □, meat peptone; Δ, ammonium sulphate; O, urea.

trogen in shake flask experiments. The best activity was obtained with peptone, which was selected as the nitrogen source for further experiments.

To optimize the culture medium for endoglucanase production, the Box-Wilson method (Box and Wilson 1951) was used. The four parameters chosen and their levels are shown in Table 2. The response variable was the viscosimetric endoglucanase activity. The following equation was obtained:  $Y = 19.72 + 1.97X_1 + 0.83X_2 - 0.002X_3 - 1.75X_4$  where  $X_1$  = pH,  $X_2$  = temperature (°C),  $X_3$  = peptone concentration (g/l), and  $X_4$  = sugar cane bagasse concentration (g/l). According to the regression coefficients obtained for every parameter (Table 2), enzyme production was most sensitive to the fermentation pH value and sugar cane bagasse concentration. After the fermentation experiments in culture media modified as indicated by the Box-Wilson results, enzyme production remained almost constant, so the highest

Table 2. Parameters and results of culture medium optimization by the Box-Wilson method

	pH	Temperature (°C)	Peptone conc (g/l)	Sugar cane bagasse conc (g/l)
Upper level	8	34	6	15
Base	7	28	5	10
Lower level	6	22	4	5
Variation units	1	6	1	5
Regression coefficient	1.97	0.83	-0.002	-1.75
Regression coefficient × variation units	1.97	4.99	-0.002	-8.75
New variation units	0.2	0.6	-0.0002	-1.0



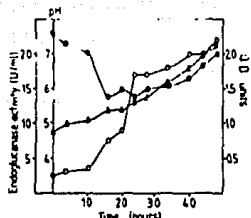


Fig. 5. Growth (O), medium pH (●) and endoglucanase activity (Δ) of *B. circulans* in a 1-l fermentor.

final endoglucanase viscosimetric activity obtained was 20.7 U/ml at a 2° C higher temperature and by decreasing the bagasse concentration to 8 g/l. A more extensive analysis of the temperature effect, consisting of fermentations carried out at 28°, 30°, 31°, 34° and 37° C gave similar results, indicating that 30° C was the optimal temperature.

#### Fermentation at optimum conditions

A fermentation experiment was carried out using a medium with 8 g/l sugar cane bagasse, 5 g/l peptone, 5 g/l NaCl, and 2 g/l yeast extract, at pH = 7.6 and 30° C. Growth, pH and endoglucanase activity were measured at regular intervals during 48 h. As can be observed in Fig. 5, after a growth period of about 10 h, diauxic growth was observed. The first exponential phase ( $\mu = 0.12 \text{ h}^{-1}$ ) was probably due to growth on the soluble sugars from bagasse, and the second one ( $\mu = 0.01 \text{ h}^{-1}$ ) on its cellulose. The pH value decreased during the first 16 h from 7.6 to 5.8 and then increased to reach a value of 7.0 at the end of the fermentation. This behaviour could possibly be due to acid metabolite production during the first stage, followed by their consumption for fur-

ther oxidation, or to deamination of the amino acids present in the peptone and yeast extract.

Endoglucanase activity increased throughout the fermentation at a higher production rate in the second growth phase. These results would suggest that soluble sugars should be eliminated from the substrate. The concentration of soluble sugars in bagasse was found to be 8.1%. However, it has not yet been shown if enzyme production also depends on biomass concentration. Further experiments are needed to clarify this situation.

The isolated bacterium, identified as *B. circulans*, showed excellent endoglucanase activity. It drastically reduced the viscosity of CMC solutions. Its enzyme would have potential application in viscosity reduction in the production of concentrated or dried fruit and vegetable products, or as a filtration aid. However, to degrade native cellulose completely, it would have to be used in conjunction with other enzymes.

#### References

- Anaya MC, López-Munguía CA, Arjona JL (1982) Continuous clarification of pectin solutions in a basket reactor with immobilized commercial pectinases. In: Dupuy P (ed) Use of enzymes in food technology. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, pp 503-512
- Berkeley RCW, Logan NA, Shute LA, Capey AG (1984) Identification of *Bacillus* species. In: Bergan T (ed) Methods in Microbiology, vol 16. Academic Press, London, pp 292-393
- Box GEP, Wilson KB (1951) On the experimental attainment of optimum conditions. J R Stat Soc Ser B, 13, 1-45
- Buchanan RE, Gibbons NE (eds) (1975) Berg's manual of determinative bacteriology, 8th edn. Williams and Wilkins, Baltimore, p 539
- Enari TM (1983) Microbial cellulases. In: Fogarty WM (ed) Microbial enzymes and biotechnology. Applied Science Publishers, Barking, Essex, UK, pp 183-223
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275
- Mandelis M, Weber J (1969) The production of cellulases. J Adv Chem Ser 95:391-414

Received 11 November 1988/Accepted 14 February 1989