

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA



PRODUCCION DE ENZIMAS CELULOLITICAS  
MEDIANTE EL EMPLEO DE TRICHODERMA VIRIDE

**T E S I S**

Que Para Obtener el Título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A N:

**ANA LAURA FLORES LECHUGA**  
**TERESA DE GPE VAZQUEZ CASILLAS**

1978



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

TESIS 1978

L.A.S.

A.P.

RCHA

NOC

~~U.T. 157~~ 150



JURADO ASIGNADO

Presidente;            Natalia Salcedo Olavarrieta  
Vocal:                 Enrique García Galeano  
Secretario:            Emilio Barragán Hernández  
1er. Suplente:        Alejandro Garduno Torres  
2o. Suplente:         Wenceslao Fuentes Solís

Lugar donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Tecnología de Alimentos  
Facultad de Química

Sustentantes:

Ana Laura Flores Lechuga  
Teresa de Gpe. Vázquez Casillas

Asesor del tema:

Emilio Barragán Hernández

A nuestros padres a quien debemos todo

A nuestros hermanos por su apoyo  
Al recuerdo de Octavio

A mi tía

A nuestros amigos

Al Ing, Emilio Barragán Hdz.  
por brindarnos su amistad, -  
apoyo y ayuda.

A Chaviel

## CONTENIDO

	Pag.
<b>INTRODUCCION</b>	
1.0 Materiales Celulósicos	3
1.1 Microestructura de Fibras Celulósicas	3
1.2 Celulosa	5
2.0 Enzimas	9
2.1 Clasificación de Enzimas	9
2.2 Fuente Enzimáticas	13
3.0 Hidrólisis de Celulosa	15
3.1 Pretratamiento de la Celulosa	15
3.2 Degradación Enzimática	17
4.0 Naturaleza de Celulasas	19
4.1 Enzimas Celulolíticas	19
5.0 Propiedades de Celulasas	24
5.1 Mecanismo de Acción de Celulasas	25
5.2 Determinación de Actividad	36
6.0 Fuentes de Celulasa Microbiana	41
6.1 Selección del Microorganismo	41
6.2 Otros Microorganismos Celulolíticos	43
6.3 Producción de Celulasa Extracelular	44
7.0 Producción de Celulasa	49
7.1 Condiciones de Cultivo	49
7.2 Producción de Enzima y Crecimiento del Microorganismo	51
7.3 Inducción y Represión	51

7.4	Separación y Purificación de la Enzima	53
8.0	Materiales y Métodos	54
8.1	Características Generales de <u>Trichoderma viride</u>	54
8.2	Descripción del Equipo	55
8.3	Medio de Mantenimiento	60
8.4	Medio de Crecimiento	60
8.5	Medio de Inducción	61
8.6	Técnicas de Análisis	61
9.0	Parte Experimental	68
10.0	Cálculos y Resultados	74

DISCUSION

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

## INTRODUCCION

La escasez de alimentos en el mundo ha originado que se promuevan investigaciones tendientes a utilizar fuentes renovables alimentarias hasta ahora no aprovechadas; se desperdician grandes volúmenes de alimento después de su cosecha o procesamiento debido a que no son tratados a decuadamente. Existe la necesidad de recuperar productos de baja calidad que al cabo de cierto tiempo presentan -- problemas de envejecimiento, dificultando su preparación y su digestibilidad. Este problema se presenta principalmente en el ramo de cereales y leguminosas, en bagazo de caña de azúcar y forrajes, los cuales presentan en su -- composición gran cantidad de material celulósico.

La degradación celulósica es de gran importancia en el ecosistema, los microorganismos contribuyen en gran -- parte al desdoblamiento de celulosa insoluble a monosacáridos y oligosacáridos solubles, razón por la que se ha -- incrementado el interés en la investigación tendiente al aprovechamiento de microorganismos que degraden materiales celulósicos y al empleo de las enzimas producidas por éstos.

Por medio del conocimiento de las propiedades de las enzimas celulolíticas se pueden desarrollar técnicas que pueden ser aplicables a procesos industriales.

Un gran número de bacterias y hongos presentan la ha

bilidad de utilizar la celulosa como fuente de energía, -- siendo estos últimos los mejores productores de celulasa y los más viables para la obtención industrial.

La celulasa puede ser empleada en la utilización de -- productos que presentan condiciones desfavorables para su utilización y es de gran interés económico y social, ya -- que además de mejorar la calidad de productos alimenticios, se pueden tener ventajas en procesos tales como la extracción de componentes del té verde, proteínas de frijol de -- soya, además de aplicaciones potenciales como preparación de glucosa a partir de celulosa, aprovechamiento de desperdicios urbanos, etc.; por otro lado, en base al empleo de la pasta de células obtenidas en la fermentación, ésta pue de ser utilizada en el mejoramiento de la alimentación ani mal por su contenido proteico.

Dada la importancia de la diversidad de aplicaciones de las enzimas celulolíticas, se ve la conveniencia de --- estudiar las condiciones de fermentación para la producción de celulasa por un proceso industrial a partir del hongo - Trichoderma viride.

## 1.0 MATERIALES CELULOSICOS

### 1.1 MICROESTRUCTURA DE LAS FIBRAS CELULOSICAS

Las fibras celulósicas pueden ser obtenidas de diferentes partes de la planta, de semillas de algodón, lino, yute, fibras de piña, de hojas y fibras de la madera de la parte leñosa. Las fibras se encuentran en los tejidos lignificados y su función principal es la de proveer de soporte mecánico a las diferentes partes de la planta. Este soporte proviene de las paredes de la célula, compuesta principalmente por celulosa, esto se puede ilustrar mediante división celular, en la cual la pared celular consta de tres capas: primaria, secundaria y terciaria, dando lugar a una célula amorfa que se forma en el aparato de Golgi y más tarde se desarrolla dentro de una capa intercelular que consiste de hemicelulosa y poliuronidos. Los componentes celulósicos de la pared se depositan como microfibrillas en arreglos característicos. La pared primaria se desarrolla durante la fase de crecimiento superficial, la cual se estira debilitándose cuando la célula crece y las microfibrillas sufren un reacondicionamiento, éstas, al irse formando, se depositan continuamente y sin orden sobre la superficie extendida.

Posteriormente, el crecimiento de la pared celular cesa en áreas en las cuales los nutrientes pasan a través de ésta. Estas áreas se presentan más tarde como regiones

delgadas de la pared y forman huecos de diferentes medidas, los cuales pueden retener la estructura de la pared primaria y sus microfibrillas presentan reacomodos posteriores. Cuando la pared primaria ha alcanzado su máxima extensión y el crecimiento superficial ha terminado, principia la formación de la pared secundaria que comienza en la parte central de la pared primaria y prosigue hacia ambos extremos de la célula. Esta pared se caracteriza por los reacomodos paralelos de las microfibrillas; su capa exterior consiste de varias láminas de microfibrillas dispuestas en espirales alternas. La capa media de la pared secundaria es el componente abultado, las microfibrillas se encuentran compuestas por numerosas láminas delgadas de la capa media, arregladas en forma de hélice. La capa terciaria presenta pequeñas partículas granulares y recibe el nombre de capa granulosa.

Entre los espacios de las microfibrillas se depositan sustancias como hemicelulosa y poliuronidos que se encuentran como incrustaciones ( lignina ), el contenido de hemicelulosa en las paredes secundaria y terciaria es bajo y alto en la lámina media.

Se ha visto que las fibras celulósicas, en general, presentan cierta dificultad para su degradación por medio de microorganismos. La razón principal es su estructura compacta que impide la libre difusión de las enzimas que la degradan, si se agrega a esto la composición química

heterogénea de la pared celular, se requiere que los microorganismos produzcan un complejo enzimático altamente especializado.

Los principales factores que influyen en la degradación de las fibras celulósicas son: la morfología de los microorganismos y ciertas peculiaridades en la producción de sus enzimas, ya que cada especie tiene sus propias características de llevar a cabo la hidrólisis.

## 1.2 CELULOSA

Es el polisacárido de sostén más distribuido en la naturaleza, ya que constituye aproximadamente la mitad de la pared celular de los vegetales y cereales, tales como la paja, cáscara de maíz, el algodón que es casi celulosa pura y el lino.

Químicamente la celulosa es un polímero de la glucosa, en el que las uniones de glucosa están enlazadas por uniones beta 1-4 glucosídicas formando cadenas rectas de variable grado de polimerización (Fig 1). El peso molecular es tan elevado que no se puede determinar hasta que se consigue su degradación. Haworth (citado por Jurasek<sup>11</sup>) mediante un fraccionamiento meticuloso consiguió aislar cierta cantidad de tetrametil glucosa, que corresponde a un grupo terminal de una cadena de 1,000 unidades de glucosa dando un peso molecular medio de 300,000 a 500,000.

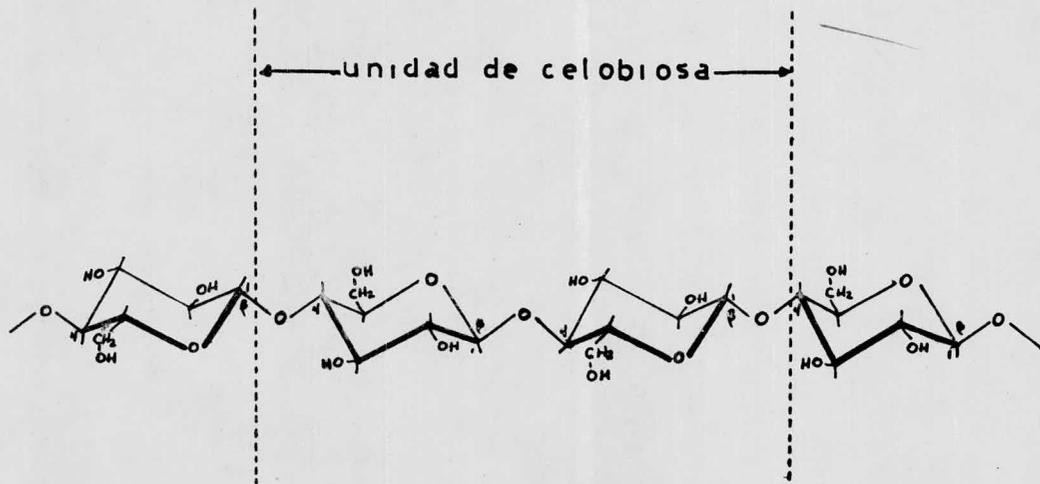
Las fibras muestran regiones que se explican por la--

teoría micelar, en las cuales la unidad cristalina superficial está constituida por haces de cadenas orientadas paralelamente ( micelas ), la longitud de la unidad micelar es de 1.6 A; lo que corresponde a 100 ó 200 cadenas de celulosa constituyentes de la micela, su longitud es de 600 A, - lo que indica una longitud mínima de la cadena correspondiente a 200 unidades.

Se atribuye a la beta configuración el que las cadenas de glucosa puedan interactuar con cada uno de los enlaces de hidrógeno formando micelas fibrilares cristalinas, dando gran resistencia mecánica y estabilidad a la molécula; presentando poca solubilidad en agua y al ser introducida en ésta o en álcalis diluidos se hidrata. Esto se debe a una reacción intermicelar con el agua, debido a que no se rompe el retículo cristalino, lo que sucede cuando se destruye la celulosa. Debido a esta propiedad, la celulosa es resistente a la enzimólisis. Muchos microorganismos como bacterias, ciertos protozoos, hongos y algunas algas son capaces de hidrolizarla y utilizarla como alimento. En consecuencia, se producen algunos casos interesantes de simbiosis, como el que se presenta en los rumiantes, los cuales pueden digerir la celulosa solamente por la presencia de microorganismos en el interior de su aparato digestivo especialmente organizado. Sin embargo, tanto éstos como el hombre y otros animales no sintetizan las enzimas necesarias para su degradación.

El hecho de que algunos microorganismos puedan hidrolizar los enlaces alfa glucosídicos y otros los beta, constituye un ejemplo del carácter estereoespecífico de los procesos bioquímicos y del impacto que la estereoquímica tiene en nuestras vidas.

FIG 1  
ESTRUCTURA DE LA CELULOSA



## 2.0 ENZIMAS

El grupo más importante de las proteínas que exhiben actividad biológica es el de las enzimas. Estas proteínas son los catalizadores que estimulan reacciones químicas en la célula. A diferencia de los catalizadores inorgánicos, una enzima despliega un grado inusual de especificidad, -- tanto como en lo que respecta al sustrato sobre el cual -- actúa, como en lo que se refiere al tipo de reacción que cataliza.

Las células pueden actuar como máquinas químicas --- porque poseen enzimas que aumentan la velocidad de reac--- ción química específica. Las enzimas poseen varios grados de estabilidad dependiendo de varios factores: tamaño iónico, temperatura, pH, etc.; en muchos casos, la actividad de estas enzimas se debe al manejo de estos parámetros, ya que por ejemplo, la exposición a temperaturas extremas causa desnaturalización o pérdida de la actividad enzimática. Hoy día se han encontrado muchas aplicaciones de uso industrial para las enzimas.

### 2.1 CLASIFICACION DE LAS ENZIMAS

Una clasificación utilizada comúnmente es la siguiente:

#### 1.- Oxidoreductasas

1.1 Actúan en los grupos  $\text{CH}_2\text{OH}$  del donador

1.2 Actúan en grupos aldehídos o cetona del donador

- 1.3 Actúan sobre grupos CH-CH
- 1.4 Actúan en grupos CH-NH<sub>2</sub>
- 1.5 Actúan en grupos C-NH del donador
- 1.6 Actúan sobre reducción del NAD o NADP como donador
- 1.7 Actúan sobre otros compuestos nitrogenados como donadores.
- 1.8 Actúan sobre grupos sulfuro del donador
- 1.9 Actúan sobre los grupos heme del donador
- 1.10 Actúan sobre difenoles y sustancias relacionadas como donadores
- 1.11 Actúan sobre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como aceptor
- 1.12 Actúan sobre hidrógeno como donador
- 1.13 Actúan sobre donadores individuales con incorporación de oxígeno ( oxigenasas )
- 1.14 Actúan sobre un par de donadores con incorporación de oxígeno en un donador ( hidrolasas )

## 2.- Transferasas

- 2.1 Transferencia de un carbono
- 2.2 Transfieren aldehídos o cetonas finales
- 2.3 Aciltransferasas
- 2.4 Glucosiltransferasas
- 2.5 Transfieren grupos alcoholó ó grupos relacionados
- 2.6 Transfieren grupos nitrogenados
- 2.7 Transfieren grupos que contienen fósforo
- 2.8 Transfieren grupos que contienen azufre

## 3.- Hidrolasas

- 3.1 Actúan sobre enlaces éster

- 3.2 Actúan sobre grupos glucosídicos
- 3.3 Actúan sobre enlaces éter
- 3.4 Actúan sobre enlaces peptídicos
- 3.5 Actúan sobre enlaces C-N
- 3.6 Actúan sobre enlaces ácido-anhídrido
- 3.7 Actúan sobre enlaces C-C
- 3.8 Actúan sobre enlaces haluro
- 3.9 Actúan sobre enlaces P-N

#### 4.0 Liasas

- 4.1 Liasas carbono-carbono
- 4.2 Liasas carbono-oxígeno
- 4.3 Liasas carbono-nitrógeno
- 4.4 Liasas carbono-azufre
- 4.5 Liasas carbono-halógeno
- 4.6 Otras liasas

#### 5.0 Isomerasas

- 5.1 Racemasas y epimerasas
- 5.2 Isomerasas cis-trans
- 5.3 Oxidorreductasas intramoleculares
- 5.4 Transferasas intramoleculares
- 5.5 Liasas intramoleculares
- 5.6 Otras isomerasas

#### 6.0 Ligasas

- 6.1 Forman enlaces C-O
- 6.2 Forman enlaces C-S

6.3 Forman enlaces C-N

6.4 Forman enlaces C-C

De acuerdo a esta clasificación las enzimas celulolíticas se encuentran dentro del grupo de las hidrolasas y en el subgrupo que actúa sobre grupos glucosídicos.

Las enzimas pueden ser divididas en dos grandes categorías de acuerdo a su localización en las células: exoenzimas o enzimas extracelulares y endoenzimas o intracelulares. Las enzimas extracelulares son sintetizadas dentro de la célula y secretadas al espacio extracelular; las enzimas intracelulares son sintetizadas dentro de la célula y no son secretadas. En la mayoría de los casos del tipo intracelular también están presentes como agregados y pueden ser liberadas o atrapadas dentro de las partículas subcelulares o membranas intracelulares, lo cual hace que su aislamiento se dificulte.

En general, las enzimas extracelulares tienden a catalizar hidrolítica o degradativamente las reacciones y las enzimas intracelulares se encuentran más asociadas con la síntesis de éstas; muchas enzimas intracelulares se presentan como sistemas altamente organizados que catalizan una serie ordenada de reacciones. La mayoría de las enzimas utilizadas comercialmente son del tipo extracelular.

Independientemente del interés que se tenga de la producción extra o intracelular de las enzimas, existen algunos tipos de procesos que pueden ser utilizados en favor -

de la enzima deseada. La cantidad producida de enzima por una célula resulta de una combinación de fenómenos genéticos y enzimáticos.

## 2.2 FUENTES ENZIMATICAS

Cualquier organismo viviente es, en teoría, una fuente de la cual se pueden obtener enzimas para aplicaciones -- industriales, analíticas o médicas.

No todas las enzimas se pueden extraer de los organismos vivos, o al menos, no en cantidades detectables; - de esta forma, la tarea es encontrar una fuente económica que produzca la enzima deseada en suficiente concentración y de la cual la enzima pueda ser aislada y posteriormente purificada con una pérdida mínima de su actividad.

Básicamente existen tres fuentes enzimáticas que son de origen microbiano, vegetal y animal; aunque existe una cuarta fuente o alternativa futurista, que es la obtención de enzimas o análogos de las mismas por síntesis química. Estos últimos son compuestos sintéticos modelados después de la fragmentación de la enzima, reteniendo la parte activa, pero probablemente pierde la especificidad de la enzima nativa y, en consecuencia, la modificación de la misma.

La mayoría de las enzimas de origen animal pueden ser obtenidas de diversos órganos o glándulas; por el tiempo de crecimiento y la dificultad del aislamiento, los animales sirven como fuente enzimática únicamente bajo condicio

nes especiales, aunque en ocasiones la fuente de origen -- animal es la única para algunas enzimas.

Hoy día, los organismos microbianos son los más utilizados como fuente enzimática, debido a que son fácilmente-inducibles de manera que ofrecen una oportunidad para el - desarrollo de enzimas con mayor opción a parámetros tales- como pH óptimo, temperatura, etc.; también los tejidos ve- getales son buenas fuentes para la obtención de enzimas co- merciales, pero como su ciclo de crecimiento es más largo- tiende a ser menos económica, lo que origina que la fuente microbiana sea la más aceptada desde cualquier punto de -- vista.

### \* 3.0 HIDROLISIS DE CELULOSA

La hidrólisis de celulosa produce celobiosa, celotriosa y celotetrosa, lo cual indica que las uniones de glucosa se encuentran unidas igual que en la celobiosa, es decir, que la molécula está constituida por una larga cadena que en condiciones más enérgicas se hidroliza produciendo glucosa. Aunque se hidrolice en las mejores condiciones, nunca se aísla más del 95% de la glucosa teórica, lo que indica que una parte de la glucosa se destruye durante el proceso, o bien, que existen pequeñas cantidades de otras unidades que no han sido identificadas. Esto último parece ser lo más probable, pues aún la celulosa más purificada contiene siempre una pequeña cantidad de grupos carboxilo que seguramente en la planta están esterificados y podrán formarse por grupos aldehído enmascarados por las partes terminales de la glucosa o también, por alguno de los grupos de alcohol primario.

#### 3.1 PRETRATAMIENTO DE LA CELULOSA.

Como la estructura de la pared celular de la celulosa nativa es totalmente compacta, los problemas de degradación son de tipo estérico, por lo que para un proceso práctico de hidrólisis es necesario tratar el material celulósico antes del uso de las enzimas por medio de algunos pretratamientos cuyo objeto es la pérdida de la estructura --

altamente cristalina y la remoción de lignina.

La deslignificación parcial puede ser alcanzada por -- tratamiento alcalino, ácido o combinado; el empleo de --- dióxido de azufre es equivalente al método convencional, - que consiste en el uso de bisulfito de amonio para la producción de celulosa y puede usarse para el rompimiento de carbohidratos sin ninguna remoción de lignina; la deslignificación biológica es una posibilidad interesante.

El tratamiento con álcali es eficiente, ya que el -- hidróxido de sodio hidroliza la celulosa y provoca despolimerización, la menor concentración de hidróxido de sodio - que causa hidrólisis intracelular es del 8%. Si el tiempo de tratamiento es largo, se disuelven algunas cantidades - de hemicelulosa, lo que provoca pérdida de materia seca -- que es una desventaja.

Los ácidos orgánicos también hidrolizan y solubilizan la celulosa y pueden dar lugar a la formación de ésteres y enlaces glucosídicos hidrolizados, pero a través del uso - de concentraciones adecuadas del ácido, éstas reacciones - se pueden eliminar. Se ha encontrado que el ácido utilizado comúnmente para la deslignificación de celulosa sin ninguna hidrólisis significativa es el ácido fosfórico.

Otro pretratamiento es el uso de radiaciones ultravioleta en altas dosis, ya que rompe la molécula del polisacárido.

Generalmente se combinan tratamientos de calentamiento

to con alguno mecánico o químico, aunque el calentamiento sólo tiende a disminuir la porosidad, retardando la hidrólisis.

### \* 3.2 DEGRADACION ENZIMATICA

Las bacterias juegan un papel insignificante en lo -- que se refiere a la degradación de celulosa. El ataque -- por medio de hongos es fuerte y depende de la organización de sus hifas, las cuales dan a estos microorganismos la capacidad de penetración y de producción de enzimas.

Los hongos imperfectos y Ascomicetos son de los microorganismos más importantes para la degradación de plantas y vegetales y forman una parte considerable de la microflora zimógena del suelo.

#### 3.2.1 DEGRADACION POR BACTERIAS

La difusión de las bacterias en los tejidos es lenta, ya que la penetración de éstas entre las células ocurre sólo a través de los huecos de la pared celular y al llegar a las membranas delgadas las enzimas bacterianas las disuelven. La infección se difunde preferentemente en las hileras medulares, las cuales son ricas en nitrógeno y contienen numerosos espacios. La acción local de las bacterias es en el interior de las depresiones que se encuentran en la superficie de la célula, las cuales sólo ocupan

la mitad de la lámina.

La degradación de las fibras de algodón por bacterias generalmente empieza en la superficie exterior, contrastando con el ataque de los hongos que comienza en el lumen de la fibra. La bacteria adherida a la superficie exterior crece rápidamente hacia adentro disolviendo la cutícula y más tarde causa erosiones profundas en la pared secundaria; ésto es debido probablemente al abastecimiento de nitrógeno orgánico.

### \* 3.2.2 DEGRADACION POR HONGOS

Desde un punto de vista morfológico, los hongos se encuentran mejor equipados que las bacterias para atacar los tejidos celulósicos, por la penetración profunda de sus hifas dentro del tejido; de esta forma, su crecimiento se ve restringido al lumen de la célula y esta es la razón por la cual el ataque por hongos procede más rápido en una dirección axial que en una transversal, ya que las hifas penetran en las paredes celulares a través de los huecos del tejido.

Algunos microorganismos de la flora zimógena del suelo que degradan la celulosa son: Fusarium solani, Trichoderma viride, Aspergillus ustae y algunas especies de Penicillium, los cuales se han aislado de la madera aportando aproximadamente el 95 % de los microorganismos aislados de ésta.

#### 4.0 NATURALEZA DE CELULASAS

#### \* 4.1 ENZIMAS CELULOLITICAS

Hasta ahora se ha establecido que por lo menos hay -- tres tipos de actividad celulolítica; exo beta 1-4 glucanasa, endo beta 1-4 glucanasa y beta glucosidasa. Se observa un fuerte efecto de sinergismo entre las endo y exo -- beta glucanasas en la hidrólisis de la celulosa cristalina, este efecto no se presenta cuando la celulosa sufre un pre tratamiento por medio de ácidos. La beta glucosidasa hi droliza la celobiosa y cadenas cortas de celooligosacári-- dos produciendo glucosa, pero no tiene efecto sobre la ce-- lulosa; algunas beta glucosidasas atacan aril beta glucós*i* dos pero no celobiosa.

La primera hipótesis concerniente a la hidrólisis -- enzimática de celulosa fué dada a conocer por Reese y cola boradores (24), ellos reportan la existencia de una enzi-- ma no hidrolítica  $C_1$ , la cual actúa como iniciadora de la hidrólisis de celulosa nativa por rompimiento de los enla-- ces hidrógeno entre las cadenas de celulosa. Este primer-- escalón es un prerrequisito para poder efectuar la degra-- dación mediante las enzimas hidrolíticas  $C_x$ . También se -- pensó que los microorganismos celulolíticos eran incapaces de crecer sobre celulosa nativa y no sintetizaban enzimas--  $C_1$ ; en el presente, lo más aceptado es que la enzima  $C_1$  es una enzima exo beta 1-4 glucanasa. En el caso de ---

Trichoderma viride y Trichoderma koningii se ha encontrado que la enzima  $C_1$  pura es una celobiohidrolasa.

De acuerdo a lo visto anteriormente, se observa una acción cooperativa entre endo y exo glucanasas que hidrolizan celulosa cristalina a celooligosacáridos solubles --- principalmente en celobiosa, la cual es puesta en libertad por exoglucanasa.

A nivel molecular, la hidrólisis de celulosa es una reacción simple, la cual consiste de una adición de agua que se une a los enlaces glucosídicos resultantes de la despolimerización de la cadena principal para perder viscosidad, obteniéndose como productos finales glucosa y celobiosa ( Fig. 2 ).

#### 4.1.1 EXO Y ENDO GLUCANASAS

Wood y Mc. Crae ( citado por Enari<sup>2</sup> ) separaron el complejo celulasa producido por Trichoderma koningii, encontrando 8 componentes puros por medio de cromatografía en gel; cromatografía de intercambio iónico y electroforesis. Estos componentes fueron una exo beta 1-4 glucanasa,  $C_1$ ; cinco endo beta 1-4 glucanasas,  $C_x$  y dos beta glucosidasas.

Los mismos autores reportaron que las exo glucanasas están presentes en el desdoblamiento de la celobiosa de la cadena final no reducida de la celulosa, así que se les llama sistemáticamente 1-4 glucancelobiohidrolasas. Las

→ Endo glucanasas hidrolizan los enlaces 1-4 glucanhidrolasas. Las endo glucanasas pueden ser diferenciadas de su ataque sobre carboximetil celulosa por la rapidez de solubilización de la celulosa hidratada con ácido fosfórico.

Erickson y colaboradores ( 3 ) estudiaron celulasas provenientes de hongos como Sporotrichum pulvurentum -- ( comúnmente llamado Cryso sporium lignorum ) y aislaron cinco endo beta 1-4 glucanasas y una exo beta 1-4 glucanasa. Posteriormente se aislaron estas proteínas y utilizándose varios métodos de prueba, determinaron la relación de actividades de éstas, la cual fué: 4:1:1:1:1

Petterson ( citado por Enari<sup>2</sup> ) fraccionó el complejo celulasa extraído de Trichoderma viride encontrando -- cuatro fracciones, los métodos utilizados fueron cromatografía en gel, intercambio iónico y electroforesis; los componentes son una endo glucanasa, una exo glucanasa y una celobiasa.

→ La beta glucosidasa acelera la acción de la exo glucanasa sobre celulosa microcristalina por remoción de celobiosa. Según Wood y Mc. Crae ( citado por Enari<sup>2</sup> ) los hongos producen por lo menos cinco endo beta 1-4 glucanasas; los componentes C<sub>x</sub> varían en grado casual la acción hidrolítica, sin embargo, se ha demostrado que todos los organismos que hidrolizan celulosa nativa son capaces de producir por lo menos una exo beta glucanasa. En el caso de Trichoderma viride, Trichoderma koningii y Sporotrichum

pulvulentum, esta enzima es beta 1-4 glucan celobiohidrolasa además de una beta 1-4 glucan glucosilhidrolasa, pero ninguna de estas enzimas han sido aisladas en estado puro.

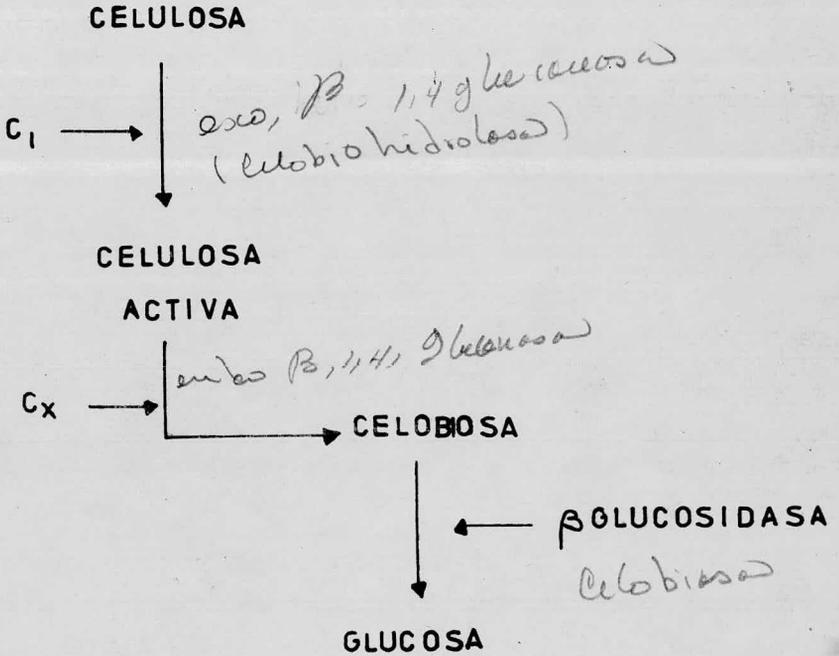
#### 4.1.2 BETA GLUCOSIDASAS

La tercera actividad involucrada en el rompimiento de celulosa, es beta glucosidasa o celobiasa, la cual hidroliza principalmente celobiosa y celodextrinas de alto peso molecular a beta glucosa. Estas enzimas aceleran la hidrólisis de celulosa cristalina por remoción de celobiosa, la cual es un inhibidor de exo beta glucanasa. Las beta glucosidasas se encuentran muy difundidas en los hongos.

Bucht y Eriksson ( citado por Enari<sup>2</sup> ) aislaron beta-glucosidasa de Sterum sanguinolentum y de Trichoderma koningii que producen las dos beta glucosidasas.

fig 2

DEGRADACION ENZIMATICA  
DE  
CELULOSA NATIVA



## X 5.0 PROPIEDADES DE CELULASAS

Los pesos moleculares de las cinco endo glucanasas -- aisladas de Sporotrichum pulvulentum varían entre 28300 y 37,500, se han encontrado pocas diferencias en la -- composición de aminoácidos, el punto isoelectrico varía -- entre 4.2 y 5.32 haciendo posible su separación; con excep -- ción de un componente, todas las endo glucanasas son gluco -- proteínas.

Se muestran algunas de las propiedades de celulasas - aisladas de Trichoderma viride en la Tabla I.

→ Los pesos moleculares de las exo y endo glucanasas de Trichoderma viride y Trichoderma koningii se encuentran -- entre 40,000 y 75,000, teniendo también componentes de ba -- jo peso molecular que oscilan entre 12,500 y 13,000. Una de las propiedades más importantes de las celulasas es la -- termoestabilidad, ya que la hidrólisis de la celulosa se -- lleva a cabo más rápido a altas temperaturas, siendo las -- endoglucanasas más estables que las exo glucanasas. Las -- endoglucanasas son estables aún después de cuatro horas a -- 60°C y a pH de 4.5; la beta glucosidasa y las exo glucana -- sas de Trichoderma koningii se asemejan una a la otra en -- su estabilidad al calor a 60°C, perdiendo el 80 % aproxima -- damente de su actividad original a esta temperatura y a pH -- de 5.0 durante un lapso de cuatro horas; en presencia de -- algodón, las celulasas de Trichoderma koningii y Fusarium -- solani son estables, no presentan pérdida de actividad --

cuando se incuban cuatro semanas a 37°C y pH 5.0

### 5.1 MECANISMO DE ACCION DE CELULASAS

Wood y Mc. Crae ( citado por Linko<sup>13</sup> ) purificaron la exo glucanasa ( componente C<sub>1</sub> ) de Trichoderma koningii -- utilizando cromatografía de intercambio iónico en una columna DEAE-Sephadex y elusión con gradientes de pH, las endoglucanasas de bajo peso molecular no afectan la remoción cinética de las fibras de algodón, siendo separadas -- primero de un filtrado de cultivo por cromatografía de gel en una columna Sephadex G-75, la fracción sobrante conteniendo endo glucanasa ( C<sub>x</sub> ) y beta glucosidasa son separadas como se muestra en la Fig. 3

La extracción cuantitativa de exo y endo glucanasa de un filtrado de cultivo de Sporotrichum pulvurentum es posible reconstituirla utilizando las enzimas purificadas. El filtrado original degrada 52.1% de algodón desengrasado, mientras que la solución reconstituida degrada 20%; cuando el cultivo se incubaba con nitrógeno en lugar de oxígeno del aire, el nivel de degradación de celulosa disminuye del -- 52.1% al 21.5%, lo que es debido a la oxidación del sitio activo de la enzima.

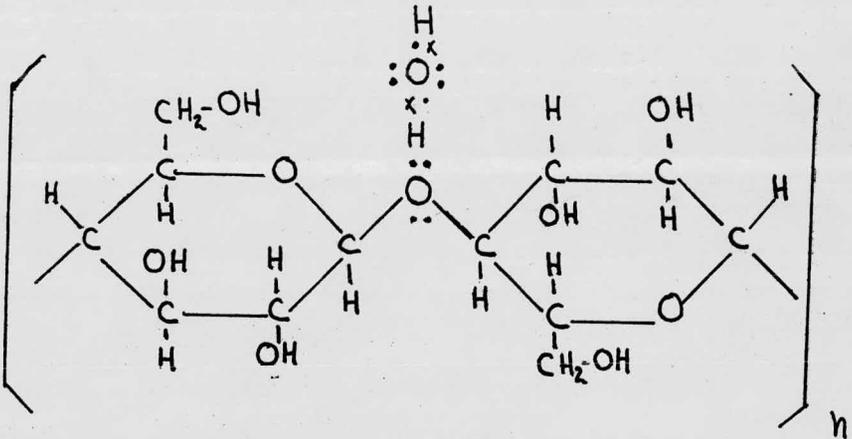
La mayoría de los estudios concernientes a la hidrólisis de celulosa se han realizado utilizando celulosa pura como sustrato, ya que en materiales naturales la celulosa se presenta generalmente como un complejo.

La degradación de celulosa es un proceso complicado, se ha demostrado ampliamente que hay un efecto de sinergismo entre exo y endo glucanasa, además de esto es necesaria la presencia de beta glucosidasa para la remoción de celobiosa, que de otra forma inhibiría la acción de exoglucanasa.

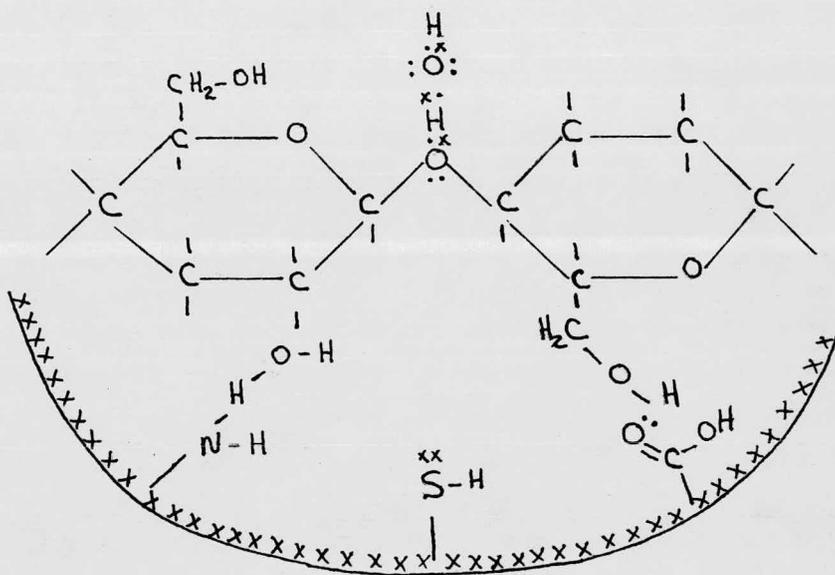
Se ha tratado de reemplazar el viejo concepto de  $C_1$ ,  $C_x$  por nombres más precisos como exo beta glucanasa y endo beta glucanasa, evitándose de esta forma la confusión del término  $C_1$  por exo glucanasa, ya que hay exo glucanasas -- que no atacan la celulosa nativa.

El mecanismo de reacción del complejo celulasa se puede esquematizar de la siguiente manera:

1.- Hidratación del carbohidrato.- Para que se efectúe la hidrólisis del carbohidrato es necesario que se encuentre hidratado, ya que se forman puentes de hidrógeno entre el agua y éste.

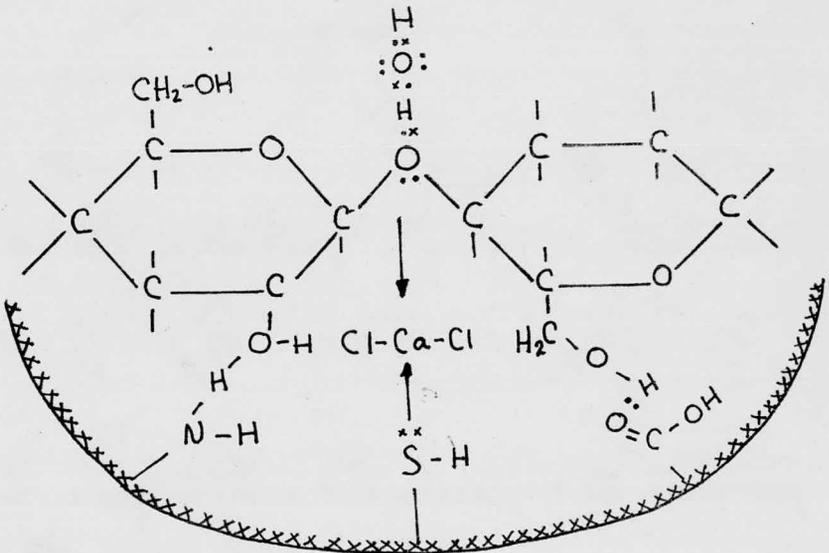


2.- Fijación o Anclaje.- La fijación del carbohidrato por la enzima se lleva a cabo mediante puentes de hidrógeno formados entre los grupos libres de la enzima y los grupos OH<sup>-</sup> del azúcar.

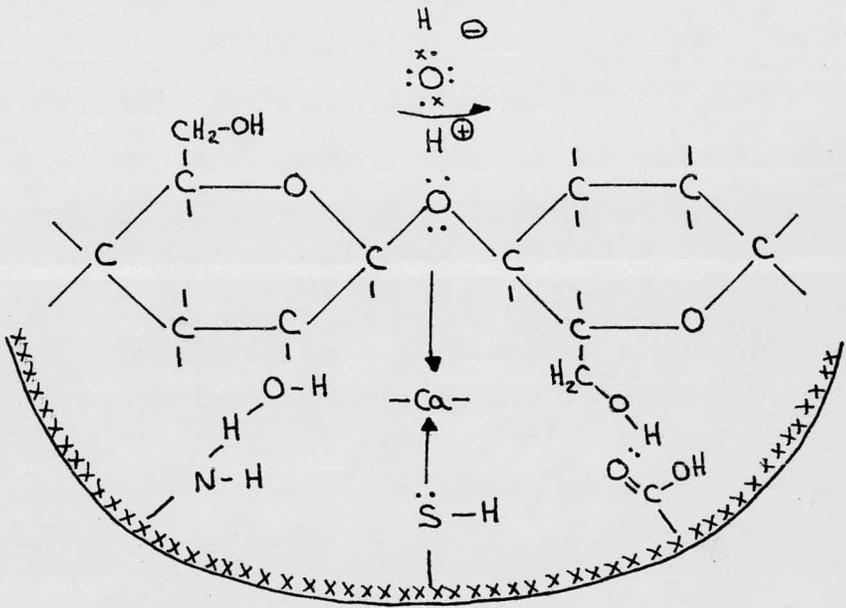


3.- Fijación entre el carbohidrato y la enzima por el metal.- En esta fase se efectúa la fijación entre el enlace glucosídico del azúcar y el sitio activo de la enzima por medio del metal que, en este caso es calcio ( en forma de cloruro de calcio ), que en su estado basal presenta una configuración  $4s^2$ , sufriendo hibridación  $sp$  con posibilidad de aceptar dos pares electrónicos.

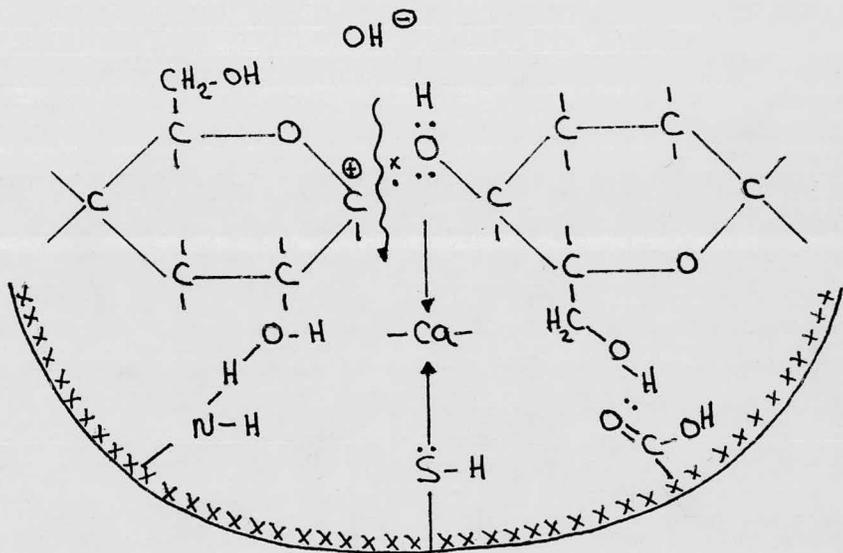
ESTADO BASAL DEL CALCIO



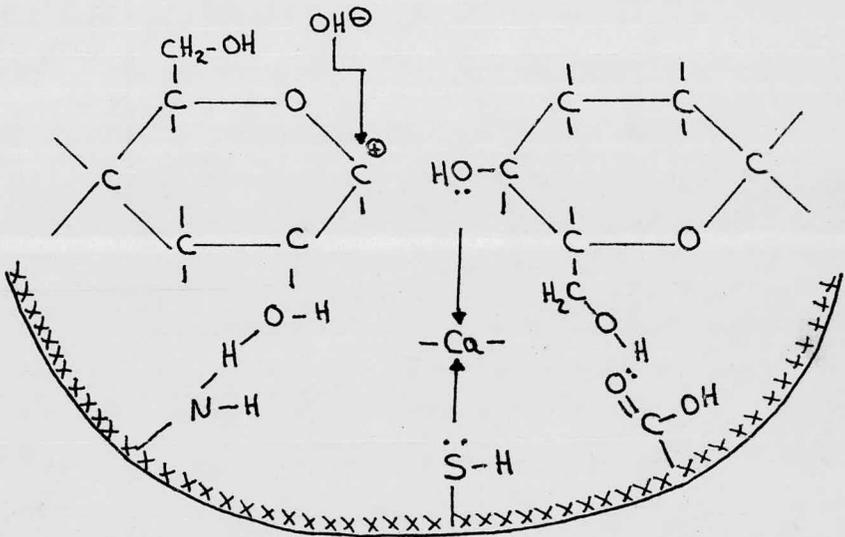
4.- Una vez que se tiene la unión enzima-sustrato, sobreviene la ruptura en el puente de hidrógeno formado -- entre el agua y el oxígeno del enlace glucosídico debido a la densidad electrónica de éste, quedando con carga positiva el hidrógeno y con carga negativa el OH del agua.



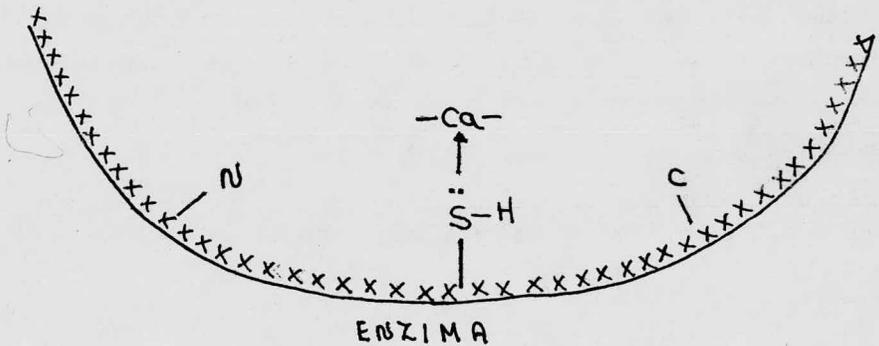
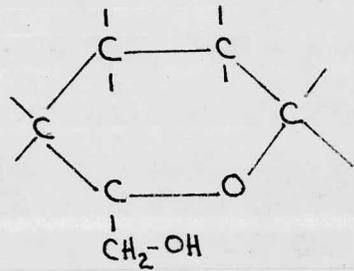
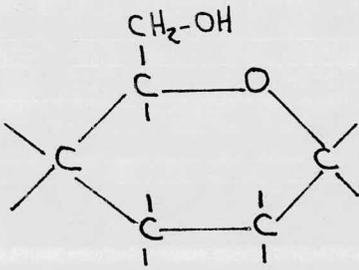
5.- Posteriormente se lleva a cabo un rompimiento -- heterolítico entre el oxígeno del enlace glucosídico y el carbono núm 1 de una unidad de glucosa, con la subsecuente aparición de carga positiva en este carbono.



6.- Al quedar el carbono Núm 1 con carga positiva, - hay una neutralización de cargas por la atracción electrostática del  $\text{OH}^-$  del agua y la carga positiva.



7.- Finalmente, una vez efectuado el rompimiento del enlace se forman dos azúcares y viene la separación del complejo enzima-sustrato.



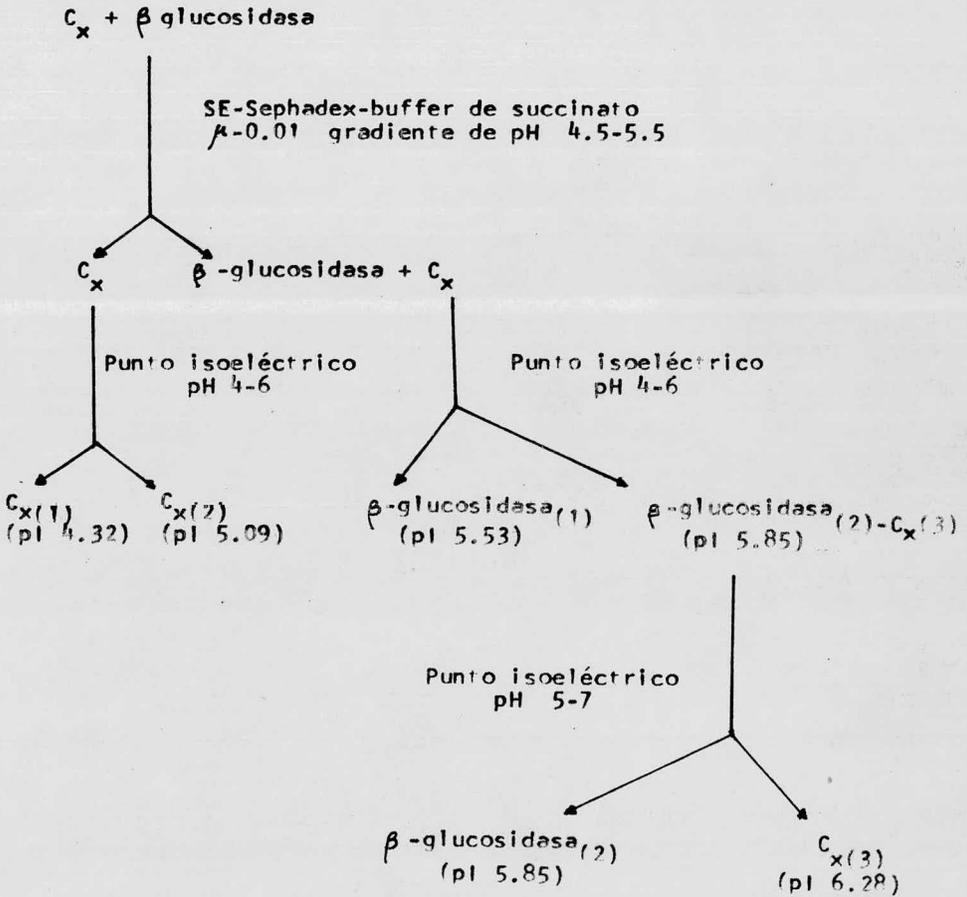
T A B L A I

Algunas propiedades de enzimas celulolíticas aisladas de  
Trichoderma viride

Tipo de enzima	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico	Contenido de Carbohidratos ( % )	CMC	Celulosa Micro cristalina	Celotetraosa
				Actividad hacia diferentes Sustratos		
Exo beta 1-4 glucanasa	42,000	3.79	9	-	+	+
Endo beta 1-4 glucanasa I	12,500	4.60	21	+	-	+
Endo beta 1-4 glucanasa II	50,000	3.39	12	+	-	+
Beta glucosidasa	47,000	5.74	0	-	-	+

FIG. 3

Esquema de fraccionamiento de enzimas celulolíticas de Trichoderma koningii



## 5.2 DETERMINACIONES DE ACTIVIDAD

Las determinaciones de actividad de las enzimas celolíticas son complicadas debido principalmente a dos factores:

1) En la mayoría de los casos las determinaciones no son realizadas con enzimas purificadas, pero sí en soluciones que contienen una mezcla de enzimas celolíticas. Debido a la acción sinérgica de estas enzimas, la actividad determinada se ve influenciada por las propiedades de las diferentes enzimas.

2) Los sustratos utilizados son macromoléculas naturales que dificultan la estandarización, por lo que el sustrato ideal sería uno de bajo peso molecular y específico para la determinación de la actividad de cada fracción enzimática; desafortunadamente, sólo en el caso de beta glucosidasa existe un sustrato específico.

En los métodos utilizados para las determinaciones de actividad pueden adoptarse dos técnicas: una en la cual el punto inicial es la utilización de celulosa para la producción de glucosa para varios materiales celulósicos, en la que se determinan los reductores totales, métodos de este tipo dan un valor que abarca la actividad celolítica total, pero no indican cual es el rango de actividad enzimática individual. Estos son utilizados para las determinaciones de la capacidad de un complejo enzimático que degrada la celulosa. La otra técnica es la que deter-

mina la actividad enzimática en forma individual, definiéndose el rango de actividad de cada enzima. El inconveniente de este método es que se tienen que conocer qué enzimas se encuentran involucradas en esta degradación, además de la falta de sustratos e inhibidores específicos, los cuales permitirían la cuantificación de la actividad de una enzima en presencia de otras.

### 5.2.1 ACTIVIDAD CELULOLITICA TOTAL

En determinaciones de actividades celulolíticas, el sustrato debe ser normalizado, debe tomarse en cuenta el tiempo de reacción debido a que el sustrato es un material insoluble ya que se requiere de cierto tiempo para que la enzima se difunda dentro de la fibra y los productos de hidrólisis fuera de ésta.

Para obtener un resultado significativo, los análisis requieren de un tiempo de reacción largo para que se pueda hidrolizar una fracción apreciable de los enlaces menos accesibles. Esto es, para una actividad celulolítica total, no existe regla que muestre el rango inicial de reacción.

Para estos fines se han propuesto varios sustratos, entre los cuales se encuentran la fibra de algodón, que es una de las más resistentes, el avicel, carboximetil celulosa y papel filtro.

La hidrólisis del papel filtro se ha utilizado para la determinación de la actividad celulolítica total con re

sultados satisfactorios. El método más aceptado es el propuesto por Mandels y Weber ( citado por Enari<sup>2</sup> ), el cual consiste en la cuantificación de azúcares formados bajo -- condiciones estandarizadas, el tiempo de reacción es relativamente corto, 1 hora; si el tiempo de reacción se quiere reducir, entonces se incrementa la cantidad de enzima, aunque el incremento en la formación de glucosa no es lineal, porque la mayor parte del sustrato reactivo es convertido al principio del período de reacción, pero se puede lograr un incremento lineal utilizando diluciones de la enzima; por otro lado, si se determinan concentraciones altas de glucosa o preparaciones muy activas, los valores de actividad son erráticos.

Las determinaciones cuantitativas más exactas involucran las actividades de enzimas basadas en el grado de -- hidrólisis del papel filtro.

El umbral más difícil en esta hidrólisis de materia-- les celulósicos es su solubilización, por lo que se da --- énfasis a las determinaciones de la actividad solubilizante, referida como  $C_1$ .

La formación de glucosa ó celobiosa como productos finales, dependen de la beta glucosidasa, la cual puede de - esta forma, influenciar el resultado. La determinación del sustrato hidrolizado después de la digestión enzimática da un resultado confiable, pero el método es laborioso y no - recomendable para determinaciones de series largas.

Las medidas basadas en la disminución de la densidad óptica en suspensiones de celulosa son utilizadas para cuantificar residuos de organismos productores de celulasa o para la determinación de hongos celulolíticos; así como el método en placa, el cual consiste en cultivar estos microorganismos en un medio conteniendo ácido fosfórico y celulosa hidratada, detectándose por la formación de un halo de inhibición. Para determinar la actividad solubilizante se emplea un sustrato insoluble teñido, por ejemplo: Avi-cel, papel filtro o el Azure, el cual es un sustrato comercial muy recomendado.

### 5.2.2 EXO BETA GLUCANASA

La primera enzima involucrada en el rompimiento de celulosa insoluble es la exo beta glucanasa, consecuentemente entre los sustratos recomendados para la actividad de la misma, se considera como el mejor el algodón, pero también se recomienda la celulosa microcristalina, la cual es hidrolizada por la exo beta glucanasa. De esta manera, la enzima produce celobiosa como producto de reacción, la medida de azúcares reductores es influenciada por la beta-glucosidasa. Por otro lado, la acción de la endo beta glucanasa descubre nuevas cadenas finales, produciendo más sustratos para la exo beta glucanasa. Si se calculan los azúcares reductores producidos en celulosa cristalina o algodón, la medida es una determinación constante o pura -

de exo beta glucanasa, solamente cuando se encuentran --- ausentes otras enzimas celulolíticas.

### 5.2.3 ENDO BETA GLUCANASA

Las endo beta 1-4 glucanasas hidrolizan las uniones - beta 1-4 de materiales celulósicos hidratados; para determinar su actividad el mejor sustrato es la Carboximetil--- celulosa, este sustrato ha sido empleado por muchos investigadores, mediante el cual determinan la disminución de - la viscosidad o la producción de azúcares reductores. La medida de la disminución de la viscosidad es una técnica - sensible, ya que un rompimiento pequeño en la cadena, causa un marcado decremento, no así la medida de azúcares reductores que se ve influenciada por la presencia de otras enzimas celulolíticas, especialmente beta glucosidasa.

### 5.2.4 BETA GLUCOSIDASA

Se encuentran menos problemas en la determinación de actividad para la enzima que hidroliza celobiosa. Esta -- enzima hidroliza beta 1-4 oligosacáridos y celobiosa a glu cosa. Puede ser determinada con una celobiosa como sustra to o con un pseudosustrato, que es el para-nitro fenil -- glucósido el uso del cual provee un método de determina -- ción rápido y conveniente.

## 6.0 FUENTES DE CELULASA MICROBIANA

### 6.1 SELECCION DEL MICROORGANISMO

La selección del microorganismo es el primer paso en el desarrollo de un proceso; para enzimas microbianas deben considerarse varios factores:

a) Localización de enzimas.- Las endo enzimas tienen la ventaja de que se encuentran concentradas en un tejido que puede ser separado rápidamente del caldo fermentado, pero siendo una endoenzima, implica los problemas asociados con la desintegración de las células y, subsecuentemente, la separación de otros componentes celulares. Aunque muchas enzimas nunca son obtenidas de células vivas, relativamente muy pocas enzimas comerciales son de este tipo.

Las exoenzimas, por otra parte, deben ser concentradas de soluciones muy diluidas de cultivos filtrados, aunque este proceso puede ser costoso, en general su pureza es relativamente grande en comparación con enzimas obtenidas de extractos de células. La mayoría de las enzimas comerciales son de este tipo.

b) Naturaleza del organismo.- Se prefieren aquellos que sean fácilmente manejables; en el caso de aplicación en alimentos, debe tener la aprobación de la FDA ( Food Drug Administration ). Deben establecerse las características de rendimientos enzimáticos, producción de esporas y

requerimientos de medio de cultivo, presentar una mínima dificultad en filtración, centrifugación o desintegración ( si es requerida ); no deben ser productores de toxinas u otros productos indeseables y crecer en sustratos baratos.

c) Producción y purificación de enzima.- La pureza generalmente es medida como actividad específica ( enzima/ unidad de peso de proteína ), la cual puede ser errónea -- cuando están presentes polisacáridos, poliésteres, etc., en cantidades grandes. Por lo tanto, industrialmente las -- enzimas son medidas en términos de actividad/unidad de -- peso.

Se ha observado que una meta razonable es la obten -- ción de un cultivo filtrado o extracto de células en las -- cuales la enzima deseada tiene un total del 10 % del total de proteínas. Se ha encontrado que un microorganismo produce una enzima en particular en una cantidad igual a una tercera parte de la proteína total.

#### 6.1.1 SELECCION DE Trichoderma viride

Se han realizado hidrólisis de celulosa por métodos -- químicos y se ha visto que son incosteables, por lo cual -- se han efectuado hidrólisis por acción enzimática; la factibilidad económica por medio de hidrólisis de materiales -- celulósicos, esencialmente depende de preparaciones de las -- celulosas activas a un precio razonable.

Existen muchos microorganismos celulolíticos que pue-

den crecer en materiales celulósicos, tales como bacterias, actinomicetos y hongos superiores; se ha observado que los mejores productores del complejo celulasa son los hongos y uno de ellos, Trichoderma viride, es de los más destacados por la producción de estas enzimas. Las preparaciones enzimáticas de este hongo solamente se han estudiado a nivel de planta piloto y de laboratorio.

## 6.2 OTROS MICROORGANISMOS CELULOLITICOS

Muchos organismos degradan la celulosa por contacto directo con el sustrato y se ha observado en muchos casos, -- que las celulasas son más eficientes cuando las células se enlazan. En la superficie de la célula las enzimas se --- encuentran en alta concentración y por lo tanto, pueden -- alcanzar un contacto estrecho con el sustrato.

En la degradación de materiales celulolíticos, en la cual dos microorganismos no pueden actuar por separado, el crecimiento simbiótico de éstos, principalmente de Pseudomonas y organismos productores de celobiasa son utilizados -- siempre para incrementar el rendimiento de biomasa.

Un pretratamiento de la celulosa mejora el crecimiento de Pseudomonas, debido a que el número de microorganismos - adheridos a las fibras aumenta y las bacterias son ordenadas de manera regular a lo largo de la cadena de celulosa. Se ha observado un fenómeno similar en la degradación de fibras de celulosa por Sporocytophaga myxococoides. La secre

ción de enzima en el medio no es el único camino para --- utilizar enzimas celulolíticas.

Se puede observar en forma comparativa la efectividad de producción de celulasa de Trichoderma viride con otros hongos productores de dicha enzima en la tabla Núm II

### 6.3 PRODUCCION DE CELULASA EXTRACELULAR

Como la celulosa es insoluble en soluciones fisiológicas, no puede pasar a través de membranas celulares, lo -- que supone que la celulosa microbiana es extracelular. En filtrados de cultivos de hongos celulolíticos, cultivados bajo condiciones favorables, se puede demostrar la presencia de celulosas extra celulares. Lyr y Schanel ( 19 ) -- consideraron que existe una secreción activa en el medio de cultivo, por lo que se excluye la idea de que la liberación de celulasas sea autolítica.

Un prerequisite para la producción industrial de glucosa a partir de celulosa es que las preparaciones de celulasa tengan una alta actividad.

Se ha encontrado que la mejor fuente de celulasa extracelular es Trichoderma viride, aunque se han estudiado -- otros microorganismos celulolíticos a partir de los cuales se obtienen buenos rendimientos, algunas bacterias y hongos cultivados en celulosa nativa o pretratada no secretan solamente endoglucanasa (  $C_x$  ) o beta glucosidasa. Solamente microorganismos celulolíticos verdaderos que poseen-

actividad exo glucanasa (  $C_1$  ) pueden hidrolizar celulosa nativa.

Otros microorganismos que degradan la celulosa son - las bacterias móviles, bacterias verdaderas Gram negati-- vas y Gram positivas y algunos Actinomicetos, así como -- también anaerobios estrictos ( Pseudomonas ), anaerobios- facultativos ( Bacillus, Pseudomonas ) y anaerobios obli- gados ( Clostridium ).

En años recientes se han estudiado organismos termó- filos; un hongo termófilo típico capaz de producir un sis- tema celulolítico que descompone la celulosa nativa es el ascomiceto Termonites chaetomium Var. lissitum, --- Chaetomium termofiles, Sporotrichum termofilium y --- Termonites aurantiacus; crecen y descomponen la celulosa- muy rápido, pero las actividades de celulasas en los fil- trados de los cultivos son muy bajas.

Termonites curvata produce endo y exo glucanasa cuando - crece sobre celulosa, el sistema excretado por este micro- organismo hidroliza menos del 1% de fibras de algodón, lo cual indica que es incapaz de degradar celulosa nativa.

Ha aumentado el interés de los microorganismos termó- filos para la investigación de celulasas termoestables, - aunque las celulasas de termófilos no son necesariamente más estables al calor que las celulasas de mesófilos. Mandels ( 15 ) comparó los sistemas de celulasas produci-

dos por Thermoactinomyces y Trichoderma viride, en análisis cortos y en sustratos susceptibles a ambas celulasas, - se mostró mayor actividad a 65<sup>0</sup> C que a 50<sup>0</sup> C; en análisis de 24 horas en algodón, la celulasa de Trichoderma viride - fué inactivada a 60<sup>0</sup> C, encontrándose que la celulasa de - Thermoactinomyces es deficiente en actividad exo glucanasa, por lo que no se puede hacer tal comparación.

No obstante, se han efectuado muchos trabajos con varios organismos y se ha visto que Trichoderma viride es la fuente más conveniente de enzima extracelular. Por lo tanto, la descomposición de celulosa puede ser diferente en - diferentes microorganismos. No todas las endoglucanasas - actúan sinérgicamente con todas las exo glucanasas, ya que por sinergismo, dos enzimas pueden trabajar juntas en la - forma de un complejo libre, el cual no puede ser formado - entre todas las exo y endo glucanasas.

15 T A B L A II

Producción de  $C_1$  y  $C_x$  por diferentes hongos

Preparación en solución de acetato 0.05 M	$C_1$	$C_x$	Azúcar	Pérdida de peso
			% de Hidrólisis	
<u>Trichoderma viride</u>	50	50	58	53
<u>Sporotrichum pruinosum</u>	30	70	11	19
<u>Penicillium pusillum</u>	27	110	22	23
<u>Fusarium moniliforme</u>		3.5	39	39
<u>Aspergillus terreus</u>	5	36	28	24
<u>Basidiomyceto</u>	5	75	15	23
<u>Stachybotrys atra</u>	1	2	5	6
<u>Streptomyces sp.</u>	0.7	40	9	12
<u>Fusarium roseum</u>	0.7	10	9	10
<u>Pestalotiopsis westerdijkii</u>	0.7	60	4	8
<u>Myrothecium verrucaria</u>	0.4	28	2	2
<u>Chaetomium globosum</u>	0.2	0.5	-	-

Todos estos microorganismos crecieron en Solka Floc, - excepto Penicillium pusillum. Las unidades  $C_x$  se determinaron sobre carboximetil celulosa como sustrato ( 0.5 % ) - durante una hora a  $50^{\circ}\text{C}$ , las unidades  $C_1$  se determinaron - sobre algodón ( 4% ) durante 24 horas a  $40^{\circ}\text{C}$ .

En la tabla anterior se observa que el microorganismo que tiene mayor producción de enzima  $C_1$  es Trichoderma -- viride, por lo que este hongo es el más utilizado para la hidrólisis de celulosa nativa; esto se debe a que el factor  $C_1$  es el iniciador de la hidrólisis.

## 7.0 PRODUCCION DE CELULASA

La producción económica de celulasa depende de la selección del microorganismo y del diseño adecuado de la fermentación. Las investigaciones relacionadas con métodos de producción de Trichoderma viride presentan la dificultad de tiempo, de cultivo prolongado y baja producción si no se efectúan las correcciones necesarias a la fermentación. Algunos mutantes de Trichoderma viride han producido tres o cuatro veces más celulasa que el género no mutado.

La baja producción de celulasa comparada con la hiperproducción de otras enzimas fúngicas tales como amilasas y proteasas, puede ser resultado del mecanismo de inducción; otro factor que afecta este mecanismo, son los catabolitos represores, los cuales reducen la concentración de celulasa.

## 7.1 CONDICIONES DE CULTIVO

Cuando se desean hidrolizar materiales celulósicos, se emplean éstos para inducir el complejo enzimático en el proceso de fermentación.

El medio básico de crecimiento y producción de celulasa de Trichoderma viride ha sido descrito por Mendels y colaboradores ( 14 ): éste contiene peptona ( .05 a .1% ) y urea como fuente de nitrógeno, diferentes preparaciones de celulosa ( 0.5 a 1.5 % ) como fuente de carbono y sales minerales.

Para la producción de celulasa es importante tomar en cuenta la naturaleza de la fuente de carbono, a fin de que ésta sirva como sustrato para la producción de la enzima y como inductor y en ningún momento como represor.

### 7.1.1 EFECTOS DE NUTRIENTES

1) Efecto de la fuente de carbono.- La producción de celulasa depende de la naturaleza de la celulosa; se encuentra que la celulosa powder 123 produce la máxima actividad enzimática con 37.2 unidades / ml.; se encuentran resultados similares con MN-celulosa con 33.3 Unidades / ml., Alphacel con 29.9 unidades / ml.; CMC HT-7 produce una actividad de 3.16 unidades/ml. y CMC 50-T 2.61 unidades/ml.

2) Efecto de la fuente de nitrógeno.- Se obtienen rendimientos con urea de 13.9 unidades/ml. y con una mezcla de urea, sulfato de amonio y peptona de 40.01 Unidades/ml.

3) Efecto de la adición de azúcares.- Se observa represión en la síntesis de la enzima con la adición de azúcares tales como sacarosa, fructuosa, glucosa y celobiosa.

4) Efecto de la adición de sales orgánicas.- El acetato, maleato y alfa ceto glutarato, tienden a incrementar el rendimiento enzimático en una concentración del 0.1 %. El succinato y citrato reducen el rendimiento.

5) Efecto de activadores.- Con la adición de ascor-

batos y acetatos, en una concentración del 0.1 % y relación 1:1, se aumenta considerablemente el rendimiento de la enzima ( 7 ).

## 7.2 PRODUCCION DE ENZIMA Y CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO

En la determinación del crecimiento del microorganismo, el micelio la dificulta, ya que en la producción de celulasas la celulosa insoluble disminuye conforme la biomasa aumenta y ésta no presenta una suspensión homogénea, por lo que en la mayoría de los casos solamente se determina la actividad enzimática.

El pH del medio está directamente relacionado con la velocidad de consumo de carbohidratos, produciéndose ácidos que son neutralizados por la secreción de compuestos amoniacales. Cuando la actividad metabólica es alta, la generación de ácido produce la inducción de celulasas actuando los ácidos como reguladores; al adicionar glucosa se tiene una disminución en el pH con pérdida de actividad celulolítica, debido al efecto represor de ésta, pero si se encuentra presente un inductor al consumirse la glucosa, la actividad enzimática aumenta, debiendo mantenerse a pH constante de 5.

## 7.3 INDUCCION Y REPRESION

En el crecimiento de Trichoderma viride es posible --

inducir el complejo celulasa y se ha observado que éste es constitutivo en algunos microorganismos, como Pseudomonas fluorescens. El hongo Trichoderma viride puede ser cultivado al principio de la fermentación en glucosa, lactosa y celobiosa; agotándose estos azúcares es factible inducir la formación de celulasa adicionando celulosa al medio.

Con este mecanismo es posible obtener una alta producción de biomasa en una primera etapa y la inducción del complejo enzimático en una segunda, eliminándose al mismo tiempo el poder represor de la glucosa.

Durante la hidrólisis enzimática, la celulosa es --- convertida en celobiosa y glucosa; si el crecimiento del hongo se lleva a cabo en condiciones óptimas, la celobiosa estimula la producción de beta 1-4 glucosidasa y la celulosa la de beta 1-4 glucanasa.

Las actividades de celulasa y aril beta glucosidasa se incrementan por el uso de células de Trichoderma viride, lavadas y agitadas con soporosa ( 2-O-Beta-D-glucopiranosil D-glucosa ) la cual se cree que es formada durante la hidrólisis ácida del almidón. Se observó un efecto similar con xantobiosa pero la estimulación es pequeña. La concentración óptima de soporosa fué de  $10^{-3}M$  y a concentraciones de  $10^{-1}M$  se inhibe la formación de celulasa; esto es debido a que la soporosa es hidrolizada por beta glucosidasa, formando glucosa que es un represor.

En conclusión, la formación de celulasa en Trichoderma

viride es controlada por un mecanismo inductor-represor. Se encuentra, por lo tanto, que la soporosa es un fuerte inductor; pero este efecto inductivo es reprimido por glucosa y otros compuestos rápidamente metabolizables, tales como fructosa, maltosa y gluconato ( 14 ).

#### 7.4 SEPARACION Y PURIFICACION DE LA ENZIMA

Las enzimas celulolíticas sintetizadas por hongos, generalmente se presentan en suspensión coloidal, o sea en el caldo donde el microorganismo ha sido crecido; este líquido contiene la enzima, celulosa, biomasa y sales minerales, por lo que para separar los sólidos en suspensión se centrifuga el medio. Para efectuar un estudio sobre la enzima se necesitan grandes volúmenes de la solución de cultivo, por lo tanto, para facilitar el manejo y obtener concentraciones satisfactorias de enzima que posteriormente serán purificadas, es esencial encontrar métodos convenientes que den rendimientos altos de actividad enzimática.

Una vez concentrado el caldo se deben utilizar técnicas adecuadas de separación y purificación de proteínas tales como: filtración en gel, Intercambio iónico en columnas DEAE Sephadex, Separación por medio de unto soelectrico y Absorción Específica sobre diferentes columnas de celulosa. ( 3 ).

8.0 MATERIALES Y METODOS

8.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE Trichoderma viride

( gr. Thrix: cabello; derma: piel )

Organismo: Trichoderma viride QM9414

Clase: Deuteromicetos. Se caracterizan por tener esporas asexuales

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae. Micelio claro y sin coloración o puede presentar coloración -- fuerte o débil.

Género: Trichoderma

Especie: viride

Es un hongo imperfecto, los conidios se producen en globos viscosos como en Cephalosporium y Berticillium, pero los conidióforos se ramifican irregularmente siendo las ramas finales verdaderas fiálides, de las que los conidios se van separando sucesivamente.

En la literatura se encuentran a menudo tres nombres: Trichoderma lignorum (Tode), Trichoderma koningii (Oudmans) y Trichoderma viride (Pers. ex Fr.) que según algunos autores se diferencian entre sí por el color de las colonias y el tamaño de las esporas.

Bisby (citado por Rhodes<sup>25</sup>) ha demostrado que cuando se examina un gran número de cepas no se encuentran diferencias netas y que el grado de variación no excede del -- que puede encontrarse en una especie bien definida.

En base a estos estudios el autor considera que el --

género es monotípico y que el nombre correcto de la especie debe ser Trichoderma viride. Se encuentra generalmente en los restos de la madera, en el suelo, especialmente en los terrenos muy húmedos en donde puede parasitar otros hongos; a nivel de laboratorio crece en todos los medios comunes al desarrollo de hongos. Las colonias se desarrollan con rapidez formando una capa micelial delgada con manchas irregulares de color verde grisáceo, debidas al color de la masa de esporas maduras. Las esporas se producen mejor en los extremos de la superficie de los cultivos en tubos inclinados y la masa de esporas de algunas especies conserva por algún tiempo el color blanco, volviéndose verdes tardíamente, en algunos cultivos el reverso del medio es amarillo brillante o parduzco y algunas capas presentan un intenso olor a nuez de coco. Las cabezas esporóforas frágiles y esféricas contienen de 10 a 20 conidios - cada una, son globosos o ligeramente ovales, de 2.5 a 3.0 micras de diámetro, presentan micelio y conidióforo septados.

## 8.2 DESCRIPCION DEL EQUIPO

### 1.- Descripción del Fermentador:

Microferm Fermentor, New Brunswick Scientific Co. INC. New Brunswick N. J. US Patent No. 3,445,342; Modelo No. MF-114.

Especificaciones:

Capacidad	14 l
Volúmen de fermentación	2 - 11 l
Agitación ( rpm )	100 - 1000
Impulsores	Turbinas
Aspersores de aire	Orificios simples removibles
Capacidad de flujo ( aire ml./min )	1600 - 16,000
Rango de temperatura	5 - 60°C $\pm$ 0.25°C
Calentamiento	Cartuchos de inmersión de acero inoxidable

Fermentador compacto a escala utilizado para cultivos de microorganismos en fermentaciones intermitentes y continuas. La célula se cultiva en jarras de paredes gruesas con el objeto de que resistan el continuo autoclave. Consta de una placa estandar adecuada para las diferentes medidas de jarra ( 5, 7 y 14 litros ); para eliminar una posible fuente de contaminación los vasos del fermentador tienen dos flechas impulsoras acopladas magnéticamente.

La agitación se realiza por medio de impulsores con agitadores planos y cuatro baffles verticales. El medio de cultivo es agitado en dirección radial lográndose la dispersión uniforme de los constituyentes.

La velocidad de agitación es regulada por un sistema de retroalimentación electrónica para fluctuaciones normales de voltaje y cambios de viscosidad en el medio de cultivo, esta agitación es calibrada por un tacómetro, el

cual determina la agitación deseada.

El aire es introducido a través de un regulador de presión que tiene un rotámetro y un filtro de acero inoxidable. El gas estéril es alimentado por medio de una línea aspersora con un orificio, el cual puede ser adaptable y reemplazado por un anillo o disco aspersor. Para minimizar la pérdida de líquido y evaporación del mismo, el gas que fluye es pasado a través de un pequeño condensador de aire por medio de un sistema de enfriamiento colocado en la cabeza del fermentador; de esta forma, los vapores son condensados e incorporados al cultivo en cuanto el gas pasa a través del filtro.

La regulación térmica se consigue por medio de dos termistors, los cuales se encuentran sumergidos en compartimientos especiales conteniendo agua; también se encuentra provisto de una válvula solenoide en la línea de entrada de agua fría. Las fluctuaciones de temperatura son controladas por recirculación de agua al pasar por los baffles. Esta mezcla de agua caliente y fría en el depósito y el flujo rápido a través de los baffles evita que la temperatura se incremente o disminuya.

#### Control automático de pH

Se puede conectar el microfermentador a una bomba peristáltica con la que se pueden adicionar soluciones para conservar el rango de pH, se introducen electrodos de referencia y de medida en los orificios de acero inoxidable.

ble que se encuentran en la cabeza de la placa del fermentador, estos electrodos son esterilizados por medio de vapor.

2.- Incubadora con agitación:

Controlle Environment. Incubator Shaker, New Brunswick. Modelo No. G27 US Patent No. 3,002,895.

Especificaciones:

Rango de Temperatura	0 - 60°C ± 0.5°C
Velocidad ( rpm )	40 - 400
Movimiento	Rotatorio, describiendo un círculo de diámetro - de 1 pulgada
Dimensiones de plataforma	18 x 30 pulgadas
Dimensiones de anaqueles	19.5 x 32.5 pulgadas
Motor de mando	1/4 HP.
Corriente	200 Volts. Alterna

En esta incubadora se pueden combinar el crecimiento de cultivos estáticos y agitados bajo las mismas condiciones de temperatura y medio ambiente. La velocidad de agitación se controla eléctricamente y es mantenida con una variación -- despreciable. Una vez fijada la velocidad, ésta permanece constante, despreciando la variación de voltaje.

El trabajo se observa a través de una ventanilla colocada en la puerta de la incubadora cerrada herméticamente, cuando ésta es abierta, automáticamente cesa el movimiento. Para prevenir un sobrecalentamiento tiene incorporado un --

termostato en el circuito de control. Además consta de -- tres plataformas intercambiables con entrada para tres dimensiones diferentes de matraces.

3.- Espectrofotómetro:

Perkin Elmer. Hitachi 200. Patente No. 200-0064, Made in Japan.

Este espectrofotómetro consta de una lámpara de Deuterio y de una de Tungsteno para el espectro UV y visible respectivamente. El porcentaje de absorbancia, de transmitancia y concentración, se leen directamente en una pantalla digital.

Se complementa con un graficador el cual tiene control de velocidad de longitud de onda, velocidad de la carta y amplitud de la escala.

4.- Potenciómetro:

SargentWelck pH meter, Modelo SX, Sargent Welch-Scientific Co.

Escala de pH 0 - 14, escala de mv.

Presenta un electrodo integrado de medida y referencia -- Sargent Welch. Para el funcionamiento del mismo, se ajusta con una solución reguladora pH 7.0 y enseguida se ajusta con una solución reguladora de pH 4.0. El mantenimiento del electrodo se hace por medio de lavado con acetona para eliminar grasa y, de esta manera, mantenerlo en condiciones óptimas.

5.- Centrífuga manual de dos brazos.

6.- Material de vidrio Pyrex, normalmente usado en el laboratorio.

8.3 MEDIO DE MANTENIMIENTO 1 lt

El medio de mantenimiento utilizado es gelosa glucosa-papa ajustado a un pH 4.0 con ácido tartárico al 10 %. El período de resiembra es de cuatro semanas, incubándose a -- 30°C durante 72 horas en tubos inclinados por siembra superficial. Se conserva en refrigeración a 4°C.

8.4 MEDIO DE CRECIMIENTO (Se necesitará 1 lt.)

Fosfato monobásico de potasio	0.2	%
Sulfato de amonio	0.14	"
Urea	0.03	"
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.03	"
Peptona	0.1	"
Glucosa	0.6	"
pH	4.5	

El medio se esteriliza a 121°C durante 15 minutos y antes de ser inoculado se enfría a 30°C

8.5

MEDIO DE INDUCCION

(Se necesitarán 8 lts. en total)

Fosfato monobásico de <b>potasio</b>	0.20	%
Sulfato de amonio	0.14	"
Urea	0.03	"
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.03	"
Cloruro de Calcio	0.03	"
Carboxi metil celulosa	1.00	"
Solución de metales traza*	0.1	ml.
pH	4.50	

\*Solución de metales traza: 500 mg. de sulfato de fierro-heptahidratado, 156 mg. de sulfato de manganeso monohidratado, 167 mg. de cloruro de zinc, 1 ml. de ácido clorhídrico al 19 %; aforar a 100 ml. con agua destilada. La solución se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

8.6

TECNICAS DE ANALISIS

DETERMINACIÓN DE GLUCOSA POR EL METODO DNS

10 detts.

Reactivos:

Acido 3,5 dinitro salicílico

Hidróxido de sodio

**Sal de la Rochelle (tartrato doble de sodio y potasio)**

Fenol ( fundido a 50°C )

Metabisulfito de sodio

#### Fundamento del método:

De acuerdo a los autores de esta prueba ( 16 ), la -- sal de la Rochelle se introduce para prevenir la oxidación del reactivo, el fenol incrementa la cantidad de color producido y el metabisulfito estabiliza el color obtenido en presencia de fenol. Para la acción reductora de glucosa - sobre el ácido dinitro salicílico, se requiere de la presencia de álcalis.

La química de la prueba se puede explicar de la siguiente forma:

El ácido 3,5 dinitro salicílico es reducido a ácido - 3,amino 5,nitrosalicílico, de tal manera que los grupos -- aldehído del azúcar se oxidan a grupos carboxilo; no hay equivalencia entre el ácido 3 amino producido y los azúcares presentes y, dependiendo de la cantidad de azúcares es la intensidad del color ( Fig. Núm 4 ).

#### Procedimiento:

Se mezclan 10.6 gramos de ácido 3,5 dinitro salicílico con 13.98 gramos de hidróxido de sodio y se afora a 1l. con agua destilada, se disuelven perfectamente y se agregan 216 gramos de metabisulfito de sodio. Se titulan 3 ml. -- del reactivo con ácido clorhídrico 0.1 N utilizando como - indicador fenolftaleína. Para estandarizar el reactivo, - se deben de gastar aproximadamente de 5 a 6 ml. de ácido; - si es necesario, se adiciona hidróxido de sodio ( 2 g. --- equivalen a 1 ml. de ácido clorhídrico 0.1 N ).

\* -5 Determinación de azúcares reductores:

La muestra debe contener de 0.2 a 1.0 mg. de glucosa por ml. Se coloca 1.0 ml. de muestra en un tubo de ensayo y se adicionan 3.0 ml. del reactivo DNS, se coloca el tubo en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se desarrolla una curva estándar de glucosa tratada de la misma manera que la muestra ( concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/ml. ). Se lee la absorbancia a 550 nm con un blanco de agua destilada, se hace una gráfica en cuyas ordenadas se anota la absorbancia leída y en las abscisas la concentración de glucosa. Se debe de obtener una línea recta cuya intersección en el eje de las abscisas se encuentre en 0.04 mg de glucosa que representa la glucosa perdida por oxidación.

-5 DETERMINACION DE ACTIVIDAD CELULOLITICA

Reactivos: 4 dets.

Carboximetil celulosa 50 HT al 1 %

Solución reguladora de citratos 0.05 M pH 4.8

Timerosal al 1 %

Esta determinación de actividad se basa en la degradación del sustrato ( CMC ) con una solución de enzima con respecto al tiempo, en condiciones favorables de temperatura y pH para que actúe, utilizando el timerosal como preservador.

Procedimiento:

*Ayui* — Se disuelven 10 g de carboximetil celulosa en 800 ml. de agua caliente ( 80 a 90°C ), se adicionan 100 ml. de la solución reguladora de citrato y 10 ml. de timerosal, se diluye a 1 litro; se conserva en refrigeración y antes de usarse se calienta a 50°C.

Determinación de actividad:

En un tubo de ensayo se colocan 0.5 ml. de la solución de enzima y 0.5 ml. de carboximetil celulosa al 1 %, se mezclan perfectamente y se incuban durante 30 minutos a 50°C, transcurrido este tiempo se adicionan 3 ml. del reactivo DNS para detener la reacción, se calientan los tubos en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos y se determinan azúcares reductores como glucosa. Se desarrolla una curva estandar en las mismas condiciones que la muestra utilizando una solución madre de glucosa en solución reguladora de citrato.

Cálculos para la determinación de actividad:

$$\text{Unidades de actividad/ml.} = \frac{\text{mg. de glucosa} \times 0.185}{\text{ml. de enzima}}$$

De acuerdo con la Unión Internacional de Bioquímica, una unidad enzimática es igual a 1 micromol de sustrato hidrolizado por minuto. Para la celulasa se basa en los enlaces hidrolizados, esto es micromoles de glucosa desprendida por minuto, un micromol de glucosa es igual

a 0.180 mg.

Para un análisis de 30 minutos, 1 mg. de glucosa equivale a 0.185 unidades, es decir  $\frac{1}{30 \times 0.180}$

\*  $\rightarrow$  DETERMINACION DE BIOMASA ( Método Kjeldahl, para de - terminación de proteínas ) 23 detts.

Reactivos:

Acido sulfúrico concentrado

Mezcla Reactiva de Selenio

Solución concentrada de NaOH ( 1:1 )

Acido Bórico al 4 %

Acido Clorhídrico 0.1 N

Indicador ( Tochiro )

Las proteínas y demás materias orgánicas son oxidadas por el ácido sulfúrico; el nitrógeno que se encuentra en forma orgánica se fija como sulfato de amonio. Al hacer reaccionar esta sal con una base fuerte se desprende amoníaco que se destila y recibe en un volumen conocido de ácido. Por titulación del ácido no neutralizado se calcula la cantidad de amoniaco desprendido y así la cantidad de nitrógeno de la muestra.

La cantidad de amoniaco obtenido se multiplica por el factor 6.25 para obtener el valor de las proteínas.

Procedimiento:

Se filtran 50 ml. de caldo de fermentación y se seca el papel filtro conteniendo el micelio, se introduce en un matraz Kjeldahl; se agrega un gramo del reactivo de selenio como catalizador y 25 ml. de ácido sulfúrico concentrado y se añaden perlas de vidrio para regular la ebullición, se coloca en el digestor hasta que la solución quede completamente clara lo que nos indica la total destrucción de materia orgánica. Enfriar y diluir con 200 ml. de agua --- destilada.

Añadir una solución concentrada de sosa (1:1) que -- también ha sido enfriada, haciéndola resbalar lentamente - por la pared del matraz hasta que se estratifiquen las dos soluciones. Conectar inmediatamente el matraz a la alargadera de Kjeldahl, unida al refrigerante, que a su vez va - conectado a una alargadera que va introducida en la solución de ácido bórico (50 ml). Se agita para mezclar las - dos capas e inmediatamente se calienta. Al ácido bórico - se le adiciona 3 gotas del indicador.

Destilar aproximadamente 200 ml. Suspender la destilación, retirando primero el matraz con el destilado antes de retirar el mechero para evitar que se haga sifón. Titular el destilado con ácido clorhídrico 0.1 N.

Corregir mediante una determinación en blanco de los reactivos usados empleando sacarosa (1g) en lugar de --- muestra.

$$\% \text{ nitrógeno} = \frac{(\text{ml. blanco} - \text{ml. problema}) \times N \times 0.014 \times 100}{\text{g. de muestra}}$$

$$\% \text{ proteínas} = \% \text{ nitrógeno} \times 6.25$$

#### DETERMINACION DE TIEMPO DE HIDROLISIS

Se preparan 7 tubos conteniendo cada uno 0.5 ml. de solución de carboximetil celulosa al 1 % y 0.5 ml. de caldo de fermentación previamente centrifugado, estos tubos se incuban a 50°C y se saca un tubo de la incubadora cada 5 minutos para determinar azúcares reductores por el método DNS. El octavo tubo se utiliza como blanco de referencia y contiene 0.5 ml. de agua destilada y 0.5 ml. de solución de carboximetil celulosa al 1 %.

## 9.0 PARTE EXPERIMENTAL

El desarrollo de la parte experimental para la producción de celulasa se lleva a cabo en varias etapas:

### 9.1 MANTENIMIENTO DEL MICROORGANISMO

En un tubo inclinado con medio gelosa glucosa papa, se conserva la cepa del hongo Trichoderma viride el cual se resiembrar por la técnica de estría e incuba durante 72 horas a 30°C; después de este tiempo se conserva en refrigeración a 4°C, resemebrándose mensualmente.

### 9.2 CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO

Para el crecimiento de Trichoderma viride se prepara una suspensión de esporas a partir del tubo inclinado, se adicionan 10 ml. de agua estéril y se remueve el micelio con un asa estéril, con objeto de dejar en libertad a las esporas.

Se preparan 3 matraces que contienen cada uno 50 ml. del medio de crecimiento, se esterilizan durante 15 min. a 121°C y se dejan enfriar a 30 - 38°C inoculándose con 5 ml. de la suspensión de esporas, se incuban con agitación a 200 rpm y 30°C durante 5 días, posteriormente se efectúan resiembras consecutivas manteniendo las mismas condiciones, determinando nitrógeno proteico en el quinto día de inoculados.

### 9.3 INDUCCION DEL COMPLEJO ENZIMATICO

Una vez desarrollado el hongo se preparan 5 matraces, cada uno con 50 ml. del medio de inducción, el cual contiene 1.0% de carboximetil celulosa; se esterilizan y se inoculan con 5 ml. del microorganismo desarrollado en glucosa, se incuban a 30°C y 200 rpm. La fermentación es seguida - determinando cada 24 horas el nitrógeno producido y los -- azúcares reductores por el método DNS, una vez interrumpida se determina sobre el caldo de fermentación la capacidad hidrolítica.

### 9.4 PRODUCCION DE CELULASA

La producción del complejo enzimático se lleva a cabo en un fermentador ~~New Brunswick~~, variándose algunos parámetros tales como pH, oxígeno disuelto y manteniéndose -- constante la temperatura, el sustrato y la cantidad de inóculo. *Ctes. pH, T, sustrato y cant. de inóculo Var. act. celulol. d/mo.*

En todas las fermentaciones se sigue la misma técnica: Se preparan 3.5 l. del medio con carboximetil celulosa al 1.0% en una jarra de fermentación de 5 l. de capacidad, se adicionan 0.5 ml. de antiespumante, se cierra la jarra -- herméticamente y se colocan algodones en los orificios de entrada y salida de aire, se esteriliza con calor húmedo y se enfría a una temperatura de 30 - 38°C, inoculando posteriormente al 10% con el hongo desarrollado en el medio de-

inducción a nivel matraz; se coloca la jarra en el soporte del fermentador, conectándose las mangueras de entrada y salida de aire y agua y los termistos para el control de la temperatura, regulándose la aireación y la agitación para obtener una solución homogénea del cultivo.

### Primera Fermentación

Se observa la influencia del pH en la hidrólisis del sustrato, determinándose la glucosa producida, teniendo como condiciones iniciales las siguientes: Temperatura 30°C, agitación 400 rpm, aireación 9 l/min y pH 4.5. Cada 24 horas se reduce el pH añadiendo ácido clorhídrico 0.1 N ajustándose el primer día a 4.5, el segundo a 3.5, el tercero a 2.5 y el cuarto a 1.5; después de 24 horas se conserva con el mismo pH y al quinto día se interrumpe la fermentación.

Para el control de la fermentación se toma una muestra de 50 ml. cada 24 horas y se determinan azúcares reductores como glucosa y en el último día actividad enzimática.

### Segunda Fermentación

Se determinan las condiciones de la fermentación, incrementándose el pH y teniendo como condiciones iniciales: Temperatura 30°C, agitación 400 rpm, aireación 7 l/min y pH 4.5. Cada 24 horas se aumenta el pH, añadiendo ---

hidróxido de sodio 0.1 N, ajustándose el primer día a 5.5, el segundo a 6.0, el tercero a 6.5 y el cuarto día a 7.0; al quinto día se interrumpe la fermentación determinándose diariamente azúcares reductores por el método DNS y actividad enzimática el primer y último día de la fermentación.

### Tercera Fermentación

El pH se mantiene constante durante el transcurso de la fermentación, siendo las condiciones iniciales: Temperatura 30°C, agitación 500 rpm, aereación 7 l/min y pH 4.5; el control del pH se lleva a cabo por medio de la adición de ácido clorhídrico 0.1 N e hidróxido de sodio 0.1 N. Se toma una muestra de 50 ml. diariamente, determinándose azúcares reductores como glucosa y la actividad enzimática.

### Cuarta Fermentación

En base a las condiciones de la primera, segunda y tercera fermentaciones, se efectúa la última con las siguientes condiciones: Temperatura 30°C, agitación 600 rpm, aereación 10 l/min y pH 4.5. Se determinan cada 24 horas azúcares reductores, actividad enzimática y pH, dejando que este último siga el curso de la fermentación sin adición de ácido o base.

FIG 4

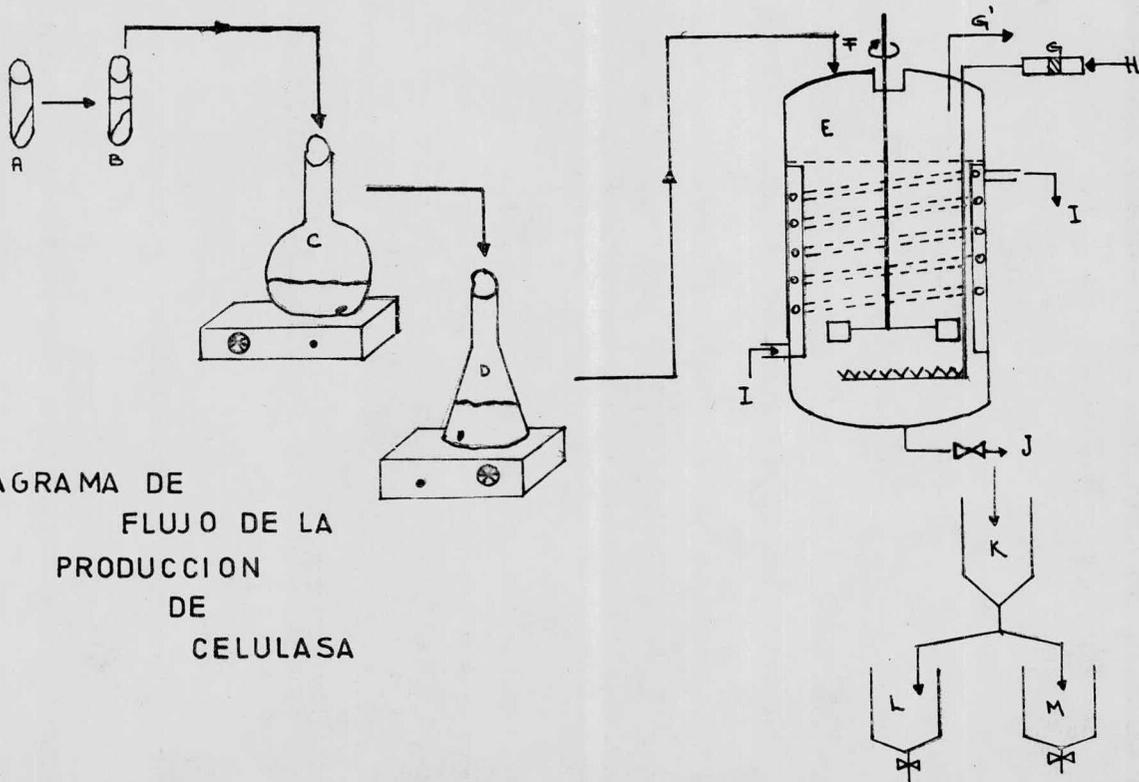


DIAGRAMA DE  
FLUJO DE LA  
PRODUCCION  
DE  
CELULASA

51  
- 72 -

- v
- A CULTIVO INCLINADO DE T. VIRIDE
  - B SUSPENSION DE ESPORAS
  - C CRECIMIENTO
  - D INDUCCION
  - E FERMENTADOR
  - F ALIMENTADOR
  - G FILTRO DE AIRE
  - G SALIDA DE AIRE
  - H COMPRESOR DE AIRE
  - I LINEA DE AGUA
  - J COLECTOR DE MUESTRA
  - K FILTRACION
  - L MICELIO
  - M ENZIMA EN SOLUCION

2 10.0 RESULTADOS

Los cálculos y resultados obtenidos en las diferentes fases de la producción de celulasa son los siguientes:

5 Etapa de Crecimiento:

En esta primera parte del desarrollo se efectuaron -- cinco resiembras, determinando nitrógeno proteico al quinto día. Los valores se presentan en la Tabla Núm III

Cálculos para la determinación de nitrógeno proteico:

$$\text{Nitrógeno proteico} = \frac{V \times N \times 0.014 \times 100}{\text{alícuota}}$$

Donde:

V = Volúmen en ml. del ácido

N = Normalidad del ácido

0.014 = Millequivalente del nitrógeno

T A B L A    I I I

Incremento de Biomasa en la  
Etapa de Crecimiento

<u>Resiembra</u>	<u>Nitrógeno Proteico</u>
	<u>%</u>
<u>Primera</u>	<u>0.040</u>
<u>Segunda</u>	<u>0.050</u>
<u>Tercera</u>	<u>0.053</u>
<u>Cuarta</u>	<u>0.061</u>
<u>Quinta</u>	<u>0.062</u>

### Etapa de Inducción

Durante esta fase se realizan varias resiembras en el medio de inducción descrito en la Sección 8.5; durante el transcurso de la fermentación se determinan azúcares reductores directos totales como glucosa por el método DNS, nitrógeno proteico y el tiempo de generación, para lo que es necesario conocer la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) ( Tablas Núm IV, V y VI y Gráficas Núm 1, 2, 3 y 4 ).

Una vez que finaliza esta fermentación en mesa agitada se determina en el filtrado libre de células la capacidad hidrolítica del complejo enzimático mediante el empleo de carboximetil celulosa al 1.0% en solución reguladora de citratos con pH 4.8 ( Tabla Núm VIII, Gráfica Núm 6 ).

Para la determinación de la capacidad hidrolítica se desarrolla una curva patrón de glucosa en solución reguladora de citratos con pH 4.8 según el método descrito en la Sección 7.5.2 ( Tabla Núm VII, Gráfica Núm 5 ).

Cálculos para la determinación de actividad enzimática:

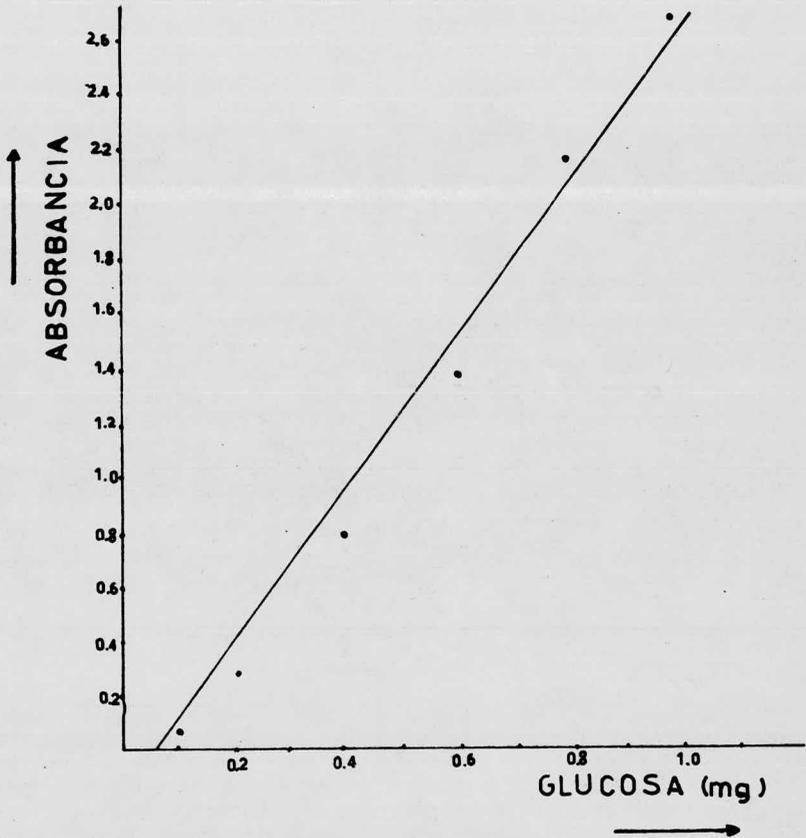
$$\text{Unidades/ml} = \frac{\text{mg. de glucosa} \times 0.185}{\text{ml. de enzima}}$$

T A B L A    I V

Curva Patrón de Glucosa

Glucosa mg/ml	Transmitancia %	Absorbancia
0.1	80.9	0.07
0.2	50.3	0.28
0.4	15.2	0.78
0.6	4.4	1.34
0.8	0.7	2.15
1.0	0.2	2.65

GRAFICA 1  
CURVA PATRON DE  
GLUCOSA



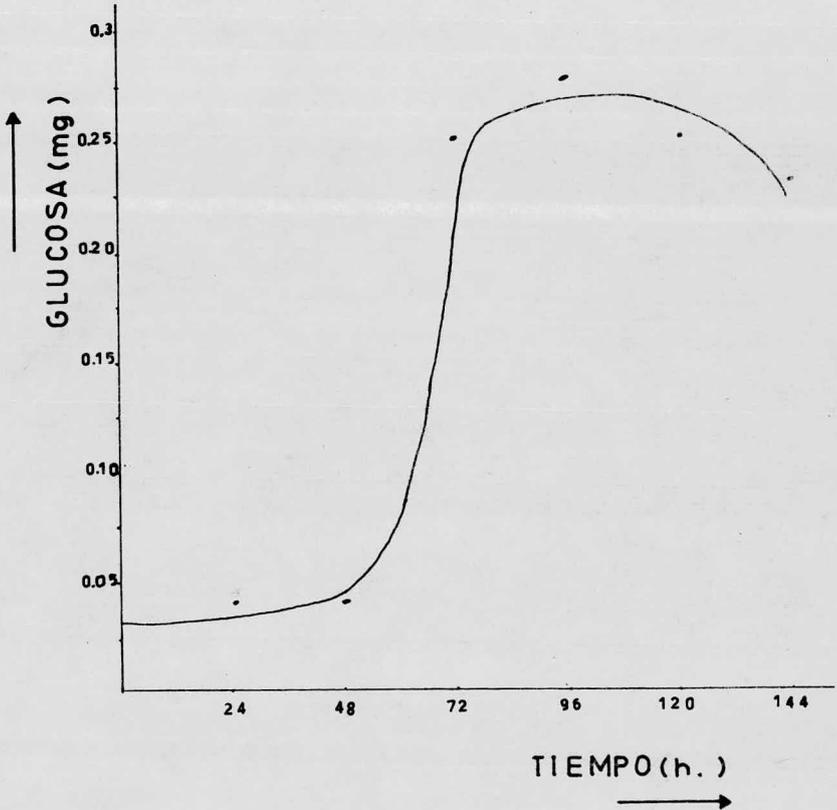
T A B L A V

Reductores Directos que se Producen Durante  
la Fermentación en Mesa Agitada

Glucosa	Tiempo
mg/ml	h.
0.032	0
0.041	24
0.042	48
0.250	72
0.280	96
0.250	120
0.230	144



GRAFICA 2  
AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS  
PRODUCIDOS  
DURANTE LA FERMENTACION  
EN MESA AGITADA



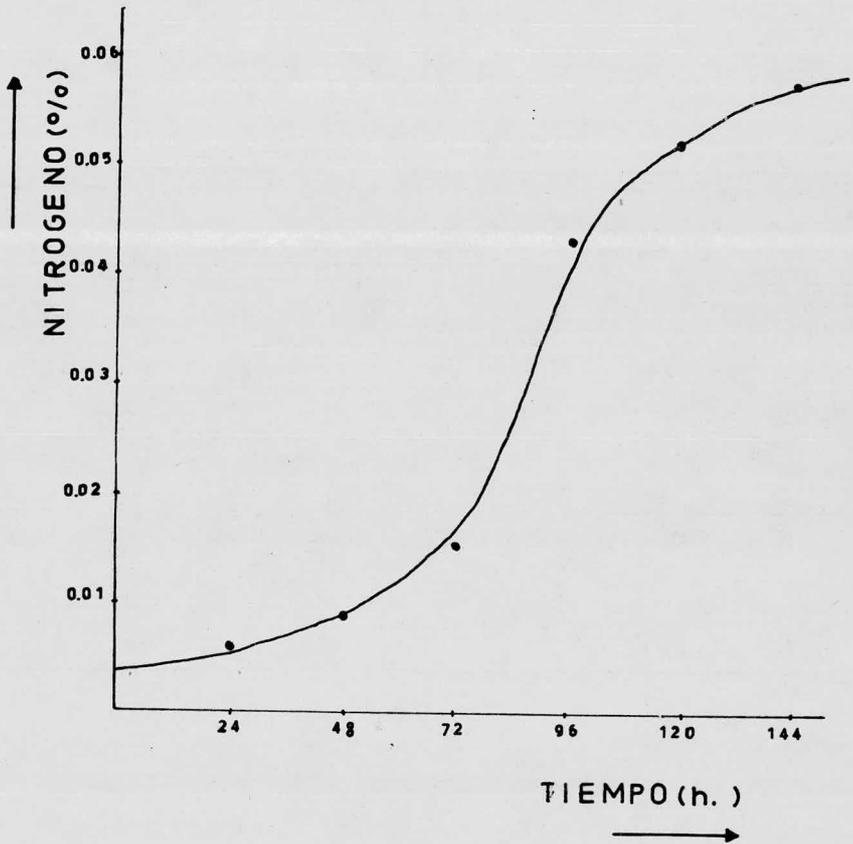
T A B L A VI

Incremento de Biomasa

Tiempo	Nitrógeno Proteico
h	%
0	0.0043
24	0.0065
48	0.0087
72	0.0150
96	0.0430
120	0.0520
144	0.0580

### GRAFICA 3

#### CUANTIFICACION DE NITROGENO PROTEICO



15 Cálculos para la determinación del tiempo de generación:

Para calcular el tiempo de generación y velocidad de crecimiento de los resultados de nitrógeno obtenidos en la etapa de inducción, las ecuaciones generales empleadas son las siguientes:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \dots \dots a)$$

Donde:

$t_d$  = tiempo de generación en horas

$\mu$  = velocidad de crecimiento

$$t = \frac{2.3}{\mu} \frac{\ln x_f}{x_i} \dots \dots b)$$

$$m = \frac{2.3}{\mu}$$

Donde:

$t$  = tiempo en horas

$\mu$  = velocidad de crecimiento

$x_f$  = % de nitrógeno proteico final

$x_i$  = % de nitrógeno proteico inicial

$m$  = pendiente de la recta

$$m = \frac{t_f - t_i}{\frac{\ln x_2}{x_i} - \frac{\ln x_1}{x_i}}$$

Tomando la ecuación b, se desarrolla la gráfica número 4, considerando el tiempo en las ordenadas y  $\ln \frac{x_f}{x_i}$  en las abscisas; para determinarse la pendiente de la recta -- ( 2.3 ) es necesario emplear el método de mínimos cuadrados

Cálculos:

$$y = a + bx \dots\dots \text{ecuación de la recta ( 1 )}$$

Donde:

$$b = m$$

$$y = t$$

$$x = \ln \frac{x_f}{x_i}$$

De la ecuación b:

$$\sum y = na + b \sum x \dots\dots\dots ( 2 )$$

$$xy = a \sum x + b \sum x^2 \dots\dots\dots ( 3 )$$

Donde:

$$n = \text{número de frecuencia} = 6$$

y	x	xy	x <sup>2</sup>
24	0.41	9.84	0.16
48	0.70	33.60	0.49
72	1.24	89.28	1.53
96	2.30	220.80	5.29
120	2.48	297.60	6.15
<u>144</u>	<u>2.59</u>	<u>372.90</u>	<u>6.70</u>
$\Sigma 504$	$\Sigma 9.72$	$\Sigma 1024.02$	$\Sigma 20.32$

Sustituyendo:

$$\text{en la ecuación ( 2 )} \quad 504 = 6a + 9.72b$$

$$\text{en la ecuación ( 3 )} \quad 1024.02 = 9.72a + 20.73b$$

$$4898.88 = 58.32a + 94.47b$$

$$6144.12 = 58.32a + 121.92b$$

$$\text{Eliminando términos:} \quad 1245.24 = 27.45b$$

$$\therefore b = 45.36$$

Sustituyendo el valor de b en la ecuación ( 2 ):

$$504 = 6a + (45.36) (9.72)$$

$$\therefore a = 10.51$$

Se sustituyen los valores de a, b en la ecuación ( 1 )

$$\text{Si } y_i = 48$$

$$48 = 10.51 + 45.36x$$

$$x = 0.826$$

$$\therefore P_i (48, 0.82)$$

$$\text{Si } y_f = 144$$

$$144 = 10.51 + 45.36x$$

$$x = 2.94$$

$$\therefore P_f (144, 2.94)$$

De la ecuación ( c )

$$m = \frac{144 - 48}{2.94 - 0.8} = \frac{96}{2.12}$$

$$m = 45.29$$

$$\text{Como } m = \frac{2.3}{\mu}$$

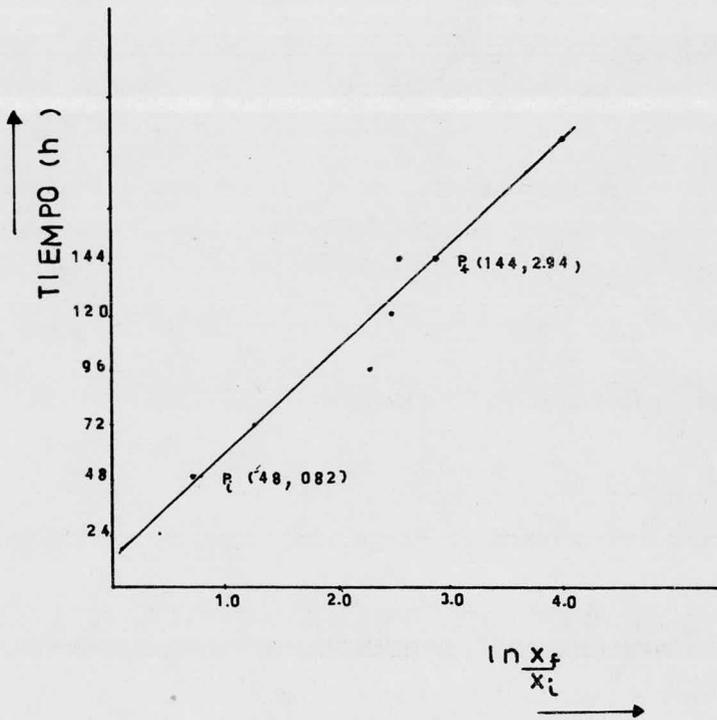
$$= \frac{2.3}{45.29} = 0.05 \text{ h}^{-1}$$

De la ecuación ( a )

$$t_d = \frac{0.69}{0.05 \text{ h}^{-1}}$$

$$t_d = 13.8 \text{ h}$$

GRAFICA 4  
VELOCIDAD DE  
CRECIMIENTO DE  
TRICHODERMA VIRIDE

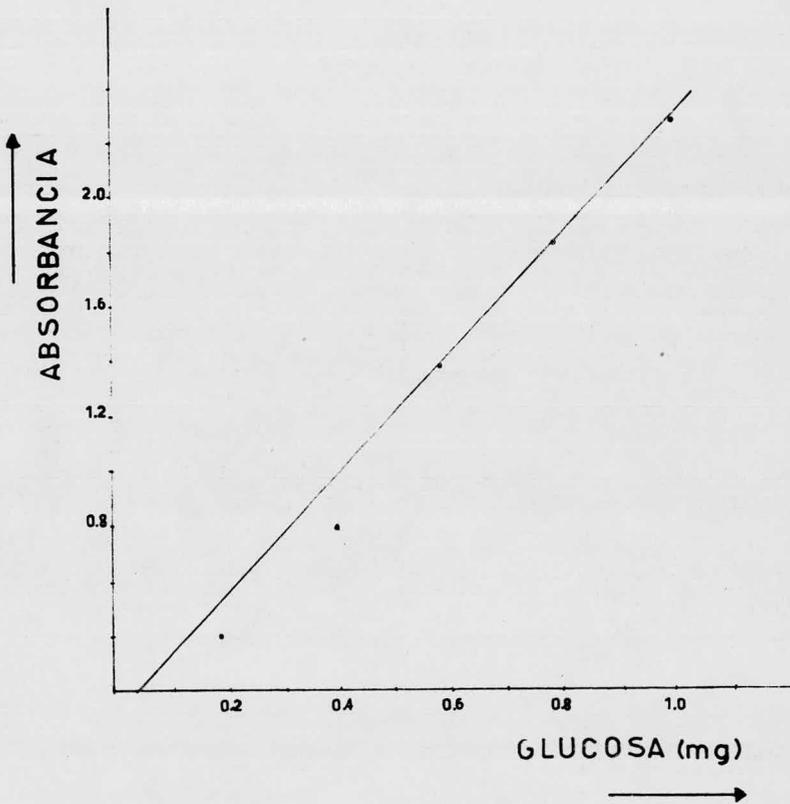


T A B L A VII

Curva Patrón de Glucosa en Solución  
Reguladora de Citratos pH 4.8

Glucosa	Transmitancia	Absorbancia
mg/ml	%	
0.2	64.1	0.19
0.4	25.6	0.59
0.6	8.4	1.08
0.8	2.6	1.59
1.0	1.2	1.93

GRAFICA 5  
CURVA PATRON DE GLUCOSA  
EN SOLUCION  
REGULADORA DE CITRATOS  
pH 4.8

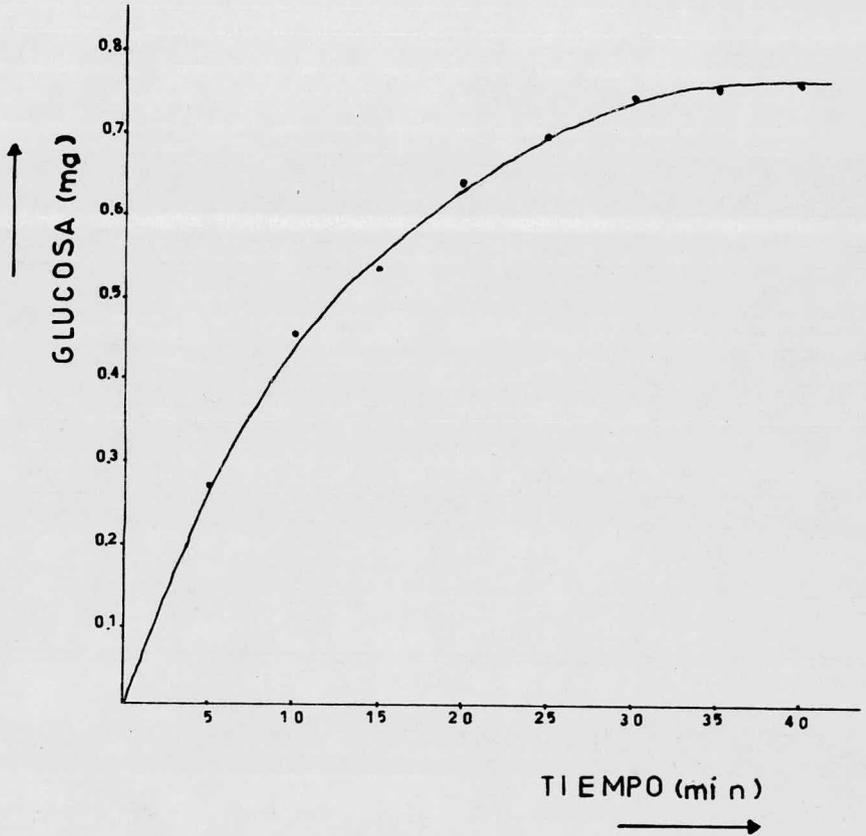


T A B L A VIII

Capacidad Hidrolítica del Filtrado  
Libre de Células

Tiempo de Incubación	Glucosa	Actividad
minutos	mg/ml	unidades/ml
5	0.28	0.10
10	0.46	0.17
15	0.56	0.20
20	0.66	0.24
25	0.71	0.26
30	0.75	0.28
35	0.76	0.28
40	0.76	0.28

GRAFICA 6  
CAPACIDAD HIDROLITICA  
DEL FILTRADO LIBRE DE  
CELULAS



Etapa de Producción de Celulosa

En base a los resultados obtenidos en la fase anterior, se lleva a cabo la producción de celulosa a nivel fermentador.

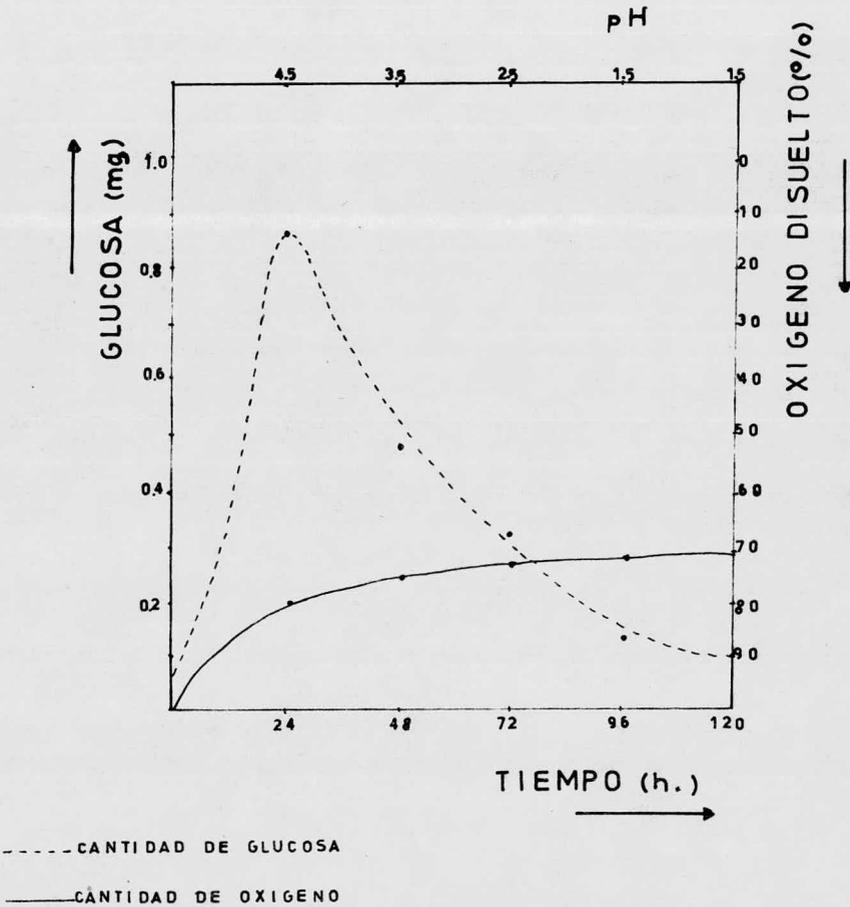
Las condiciones y resultados obtenidos de cuatro fermentaciones realizadas se encuentran en las Tablas Núm VIII, IX, X y XII y en las Gráficas Núm 7, 8, 9 y 10

T A B L A IX

Efecto de la Disminución del pH

Tiempo ( días )	Inicial	1	2	3	4	5
Oxígeno disuelto ( % )	100	80	76	74	73	71
pH	4.5	4.5	3.5	2.5	1.5	1.5
Temperatura ( °C )	30	30	30	30	30	30
Agitación ( rpm )	400	400	400	400	400	400
Aereación ( l/min )	9	9	9	9	9	9
Glucosa ( mg/ml )	0.04	0.87	0.48	0.32	0.13	0.10
Actividad Enzimática ( unidades/ml )		0.29				0.037

GRAFICA 7  
EFECTO DE LA DISMINUCION  
DEL pH



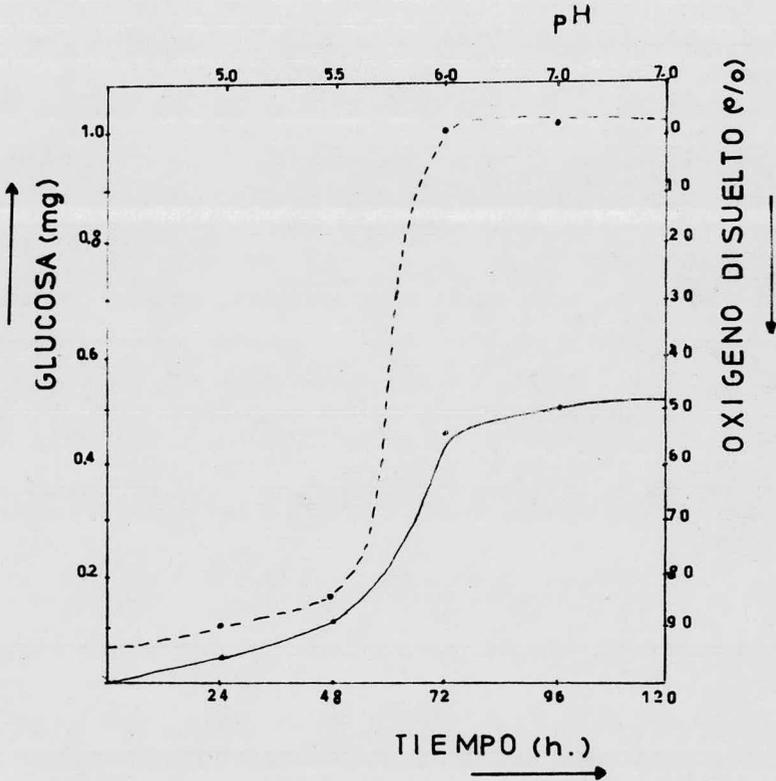
T A B L A X

Efecto del Incremento del pH

Tiempo ( días )	Inicial	1	2	3	4	5
Oxígeno Disuelto ( % )	100	95	89	55	50	48
pH	4.5	5.0	5.5	6.0	7.0	7.0
Temperatura ( °C )	30	30	30	30	30	30
Agitación ( rpm )	400	400	400	400	400	400
Aireación ( l/min )	7	7	7	7	7	7
Glucosa ( mg/ml )	0.07	0.11	0.15	1.10	1.20	1.15
Actividad Enzimática ( unidades/ml )		0.20				0.40

### GRAFICA 8

EFFECTO DEL  
INCREMENTO  
DEL pH



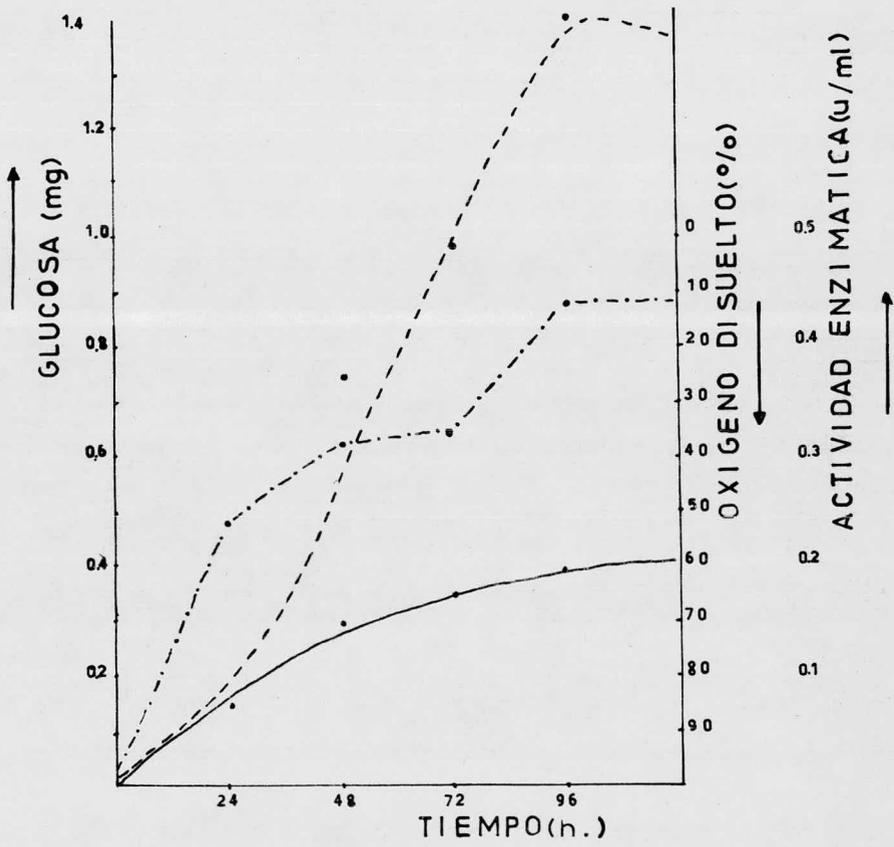
-----CANTIDAD DE GLUCOSA  
-----CANTIDAD DE OXIGENO

T A B L A X I

## Fermentación a pH Constante

Tiempo ( días )	Inicial	1	2	3	4	5
Oxígeno Disuelto ( % )	100	85	70	65	60	58
pH	4.5	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7
Temperatura ( °C )	30	30	30	30	30	30
Agitación ( rpm )	500	500	500	500	500	500
Aereación ( l/min )	7	7	7	7	7	7
Glucosa ( mg/ml )	0.026	0.18	0.75	0.98	1.40	1.35
Actividad Enzimática ( unidades/ml )	0.020	0.24	0.031	0.032	0.44	0.44

GRAFICA 9  
FERMENTACION  
A pH  
CONSTANTE (4.7)



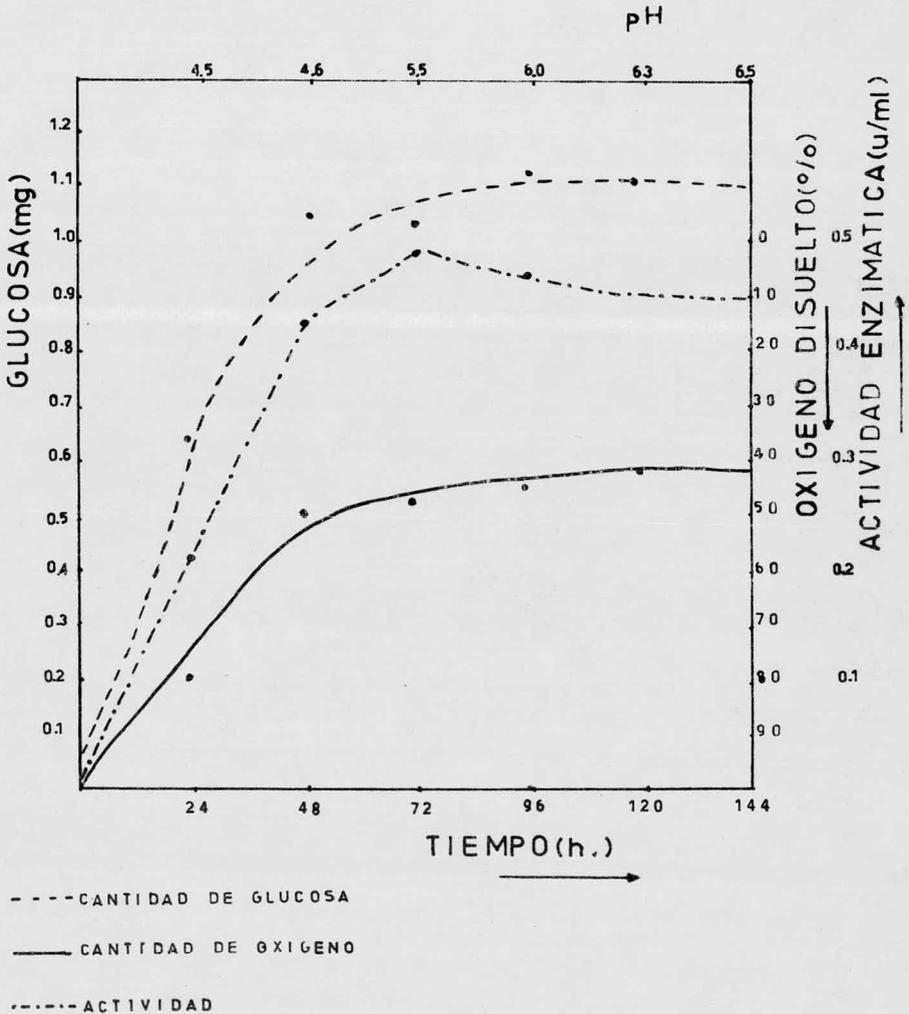
- CANTIDAD DE GLUCOSA
- CANTIDAD DE OXIGENO
- · - · ACTIVIDAD

T A B L A XII

Variación del Contenido de Oxígeno Disuelto con Variación de pH

Tiempo ( días )	Inicial	1	2	3	4	5	6
Oxígeno Disuelto ( % )	100	80	50	48	45	42	41
pH	4.5	4.5	4.6	5.5	6.0	6.3	6.5
Temperatura ( °C )	30	30	30	30	30	30	30
Agitación ( rpm )	600	600	600	600	600	600	600
Aereación ( l/min )	10	10	10	10	10	10	10
Glucosa ( mg/ml )	0.065	0.64	1.05	1.03	1.10	1.12	1.13
Actividad Enzimática ( unidades/ml )	0.024	0.21	0.43	0.49	0.47	0.45	0.45

GRAFICA 10  
VARIACION DE OXIGENO  
DISUELTO  
CON VARIACION DE pH



## DISCUSION

Para obtener el complejo celulolítico se presentan -- principalmente tres etapas: Crecimiento del microorganismo, Inducción y Producción del complejo enzimático. En la primera etapa, en donde es necesario obtener un desarrollo -- adecuado del micelio se inocular un medio rico en glucosa, nitrógeno orgánico y sales minerales, con una suspensión - de esporas provenientes de la cepa Trichoderma viride - mantenida en un tubo inclinado conteniendo gelosa glucosa-papa, a pH ácido. En ésta se logra el cambio de fase de esporulación a microorganismo metabólicamente activo, para lo cual es necesario un medio nutritivo rico en glucosa, - ya que si se agregase directamente carboximetil celulosa, que es el sustrato utilizado para la inducción y producción de la enzima, el microorganismo se desarrollaría precariamen- te y en consecuencia, la producción del complejo enzimático sería mínima.

Durante la etapa de crecimiento se determina nitrógeno proteico total en las diferentes resiembras efectuadas, en cuyos resultados no se observa una variación apreciable ( Tabla Núm III ), indicando que existe, además del desarrollo del micelio una adaptación del microorganismo al -- medio.

Posteriormente se inocular el medio en el que se ha - sustituido la glucosa por carboximetil celulosa con el --

objeto de que el microorganismo excrete el complejo celulolítico y a su vez aproveche como nutriente la glucosa liberada durante la hidrólisis del sustrato, siendo ésta la etapa de inducción.

Se efectúan varias resiembras hasta lograr un aumento en la actividad enzimática, así como reducción en el tiempo de hidrólisis del sustrato. Para el control de esta etapa se determinan azúcares reductores directos como glucosa y el nitrógeno proteico total. En la Tabla Núm V y Gráfica Núm 2 se muestran estos valores, observándose que durante las primeras 48 horas de fermentación se presenta la fase de latencia en la que el microorganismo se adapta al sustrato, seguida del crecimiento exponencial hasta las 96 horas; después de este tiempo sobreviene una disminución en la cantidad de glucosa disponible hasta las 144 horas, ya que el microorganismo comienza a consumirla.

Se presentan los valores de nitrógeno proteico en la Tabla Núm VI y Gráfica Núm 3, viéndose que en las primeras 72 horas hay un crecimiento constante ( 0.0022 unidades/24 horas ) y un crecimiento logarítmico hasta las 96 y 120 -- horas de iniciada la fermentación, entre las 120 y 144 horas el aumento no es considerable. La relación de las dos gráficas anteriores indica que: cuando disminuye la cantidad de azúcares reductores directos ( 120 horas ), el --- nitrógeno proteico sigue en aumento puesto que aún se desarrolla el microorganismo y hay consumo de la glucosa dispo

nible.

Al finalizar esta etapa se le determina al filtrado líbre de células el tiempo en el cual se hidroliza una cantidad conocida de sustrato ( 5 mg ), manteniendo pH, temperatura y concentración de enzima ( 0.5 ml ) constantes, observándose que a los 30 minutos se obtiene la mayor cantidad de glucosa y que se hace asintótica posteriormente ( Tabla Núm VIII, Gráfica Núm 6 ); esta cantidad es de 0.76 mg, lo que indica que no se hidroliza totalmente la carboximetilcelulosa, de donde se deduce que la cantidad necesaria de filtrado para hidrolizar 5 mg de sustrato debe de ser mayor

La etapa de inducción se considera una de las más importantes, ya que la producción del complejo celulolítico depende, principalmente, de la capacidad o habilidad del microorganismo para producir una enzima con actividad enzimática satisfactoria que va en aumento de resiembra en resiembra.

Una vez inducido Trichoderma viride se lleva a cabo la producción del complejo enzimático a nivel fermentador, en cuatro fermentaciones sucesivas.

En la primera fermentación se mantienen constantes la temperatura, aereación, agitación y concentración de sustrato; variándose el pH en forma decreciente ( una unidad por cada 24 horas ) como se indica en la Tabla Núm IX. En la Gráfica Núm 7 se observa que en las primeras 24 horas hay una disminución en la cantidad de oxígeno disuelto y aumen-

to de glucosa acelerados, lo que muestra que hay un crecimiento exponencial del microorganismo y la fase de latencia es mínima, ya que las condiciones le son favorables. A las 48 horas el oxígeno disuelto presenta una disminución mínima hasta las 120 horas, habiendo también disminución en la glucosa en forma acelerada hasta llegar a este mismo tiempo, que es cuando se interrumpe la fermentación; esto se debe a que el microorganismo se encuentra en condiciones de cultivo adversas y se desarrolla lentamente consumiendo la glucosa disponible.

Al determinar la actividad enzimática se observa que ésta es inhibida y llega a ser casi nula al finalizar la fermentación, la cual presenta un pH de 1.5

En la siguiente fermentación se mantienen las mismas condiciones que en la anterior, pero variándose el pH en forma creciente ( 0.5 unidades/24 h de fermentación ); en la Tabla Núm X se presentan los valores obtenidos en la Gráfica número 8 y se observa el efecto del pH, mostrándose que durante las primeras 48 horas hay un ligero aumento de glucosa y disminución de oxígeno disuelto, por lo que se tiene la fase de latencia en este lapso de tiempo ya que el inóculo proviene de la fermentación anterior en la que el microorganismo se encontraba en condiciones adversas, por lo que es necesaria una etapa de readaptación al medio. Entre las 48 y 72 horas se presenta una disminución considerable de oxígeno disuelto, de donde se deduce que en este

período se encuentra la fase exponencial de la curva de -- crecimiento microbiano, provocando una mayor hidrólisis -- del sustrato y como consecuencia, un incremento apreciable en la cantidad de glucosa disponible. A partir de las 72- horas hasta el momento en que se interrumpe la fermenta -- ción, la cantidad de glucosa decrece y el oxígeno disuelto disminuye lentamente, esto indica que el microorganismo ha llegado a la fase estacionaria. Por otro lado, la activi- dad enzimática aumenta durante el transcurso de la fermenta- ción, encontrándose que el rango de actividad está den- tro de estos valores de pH ( 4.5 - 7.0 ).

Tomando como base los resultados de las dos primeras- fermentaciones, se efectúa una tercera manteniendo el pH - constante a 4.5 por presentarse en estas condiciones la me- jor hidrólisis del sustrato además del crecimiento adecua- do del microorganismo. En la Tabla Núm XI y Gráfica Núm 9 se muestran las condiciones y resultados de esta fermenta- ción, en donde la fase de latencia es menor que en la ante- rior puesto que se presenta en las primeras 24 horas debi- do a la inducción que tiene el inóculo proveniente de la - fermentación con incremento de pH. De las 24 a las 96 ho- ras existe un aumento progresivo de glucosa al mismo tiem- po que la disminución de oxígeno disuelto, aumentando la - actividad enzimática; en las siguientes 24 horas, la canti- dad de glucosa disponible y oxígeno disuelto disminuyen, - no así la actividad enzimática que permanece constante.

Se realiza una última fermentación permaneciendo el pH sin regulación y aumentando la agitación y la aereación para evitar la formación excesiva de espuma, de esta manera se aumenta la superficie de contacto entre el micelio y el sustrato. En la Tabla Núm XII y Gráfica Núm 10 se observa que hay una fase de latencia mínima, presentándose la fase logarítmica hasta las 72 horas, con pH entre 4.5 y 5.0 en donde principalmente se desarrolla el microorganismo, lo que se observa por la disminución de oxígeno disuelto; al tener pH de 5.5 se favorece el incremento en la actividad enzimática, punto en el cual el crecimiento del microorganismo es mínimo y se tiene aumento de glucosa por la actividad obtenida.

## CONCLUSIONES

- 1.- A partir del crecimiento del hongo Trichoderma viride se obtiene una exoenzima celulolítica a la que se le determina su actividad por métodos indirectos.
- 2.- La máxima actividad de la enzima obtenida se observa a los tres días de fermentación con pH de 5.5, que es el óptimo para la actividad enzimática reportado en la literatura.
- 3.- El tiempo de obtención de la enzima se redujo al lograr obtenerse la máxima actividad a los tres días de fermentación, siendo el valor reportado en la literatura especializada de cuatro días.
- 4.- Los resultados obtenidos sólo son válidos para las condiciones en que se efectuaron las fermentaciones, debiéndose continuar la investigación a fin de aumentar la actividad enzimática.
- 5.- De acuerdo a lo anterior, se recomienda que este estudio se continúe tomando en cuenta otra serie de variables entre las que se podrían mencionar sustrato, agitación, etc.

6.- Se enfatiza la necesidad de continuar este estudio de  
bido a las múltiples e interesantes aplicaciones que tiene  
la enzima obtenida.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Barker and Bourner. Enzymic Synthesis of Polysaccharide. Cuarta Edición. (London) Vol. 7 pp. 53-83 1953
- 2.- Enari, T. M. and Marckanen P. Production of Cellulolytic Enzymes by Fungi. Advances in Biochemical Eng. pp. 1-24 (1977)
- 3.- Eriksson, K. e. New Methods for the Investigation of Cellulases. Advances in Chemistry Series. Vol. 25 -- pp' 83-104 (1969)
- 4.- Faith, W. T., C. E. Neubeck and E. T. Reese. Production and Application of Enzymes. Advances Biochemical Eng. Vol. 1:24 pp. 77-110 (1971)
- 5.- Freizer W. C. Microbiología de los Alimentos. 2a. Ed. pp. 81-88 (1972)
- 6.- Freund, J. E., F. J. Williams. Elementos Modernos de Estadística Empresarial. Segunda Edición. U.S.A. pp. 296-316 (1972)
- 7.- Gupta, J. K., N. B. Dos and Y. P. Gupta. Effect of - Cultural Conditions on Cellulase Formation by -- Trichoderma viride. Agricultural Biol. Chem. pp. 1961-1967 (1972)
- 8.- Harrow B., A. Mazur. Bioquímica Básica. Novena Edición. Edit. Internacional, S. A. (1967)
- 9.- Honeyman, J., M.A.Ph.D. Recent Advances in the Chemistry of Cellulose and Starch. Primera Ed. Edit. -- Heywood Co. L.T.D. Londres (1959)
- 10.- Huang, A. Enzymatic Hidrolysis of Cellulose to Sugar Biotechnology and Bioengineering. Symposium No. 5 pp. 245-252 (1975)
- 11.- Jurasek, L. J. R. Calvin and Whitaker. Formation and Degradation of Cellulosic Fibers. Applied Microbiology. Vol. 9 pp. 131-168 (1962)
- 12.- Lehninger, A. L. Bioquímica. Edit. Omega, S. A. Primera Edición. pp.181-200 (1972)
- 13.- Linko, M. An Evaluation of Enzymatic Hidrolysis of Cellulosic Materials. Advances in Biochemical Engineering. pp. 25-48 (1977)

- 14.- Mandels, M., F. W. Parrish and E. T. Reese. Sophorose as an inducer of Cellulase in Trichoderma viride. Journal Bacteriology. Vol. 83 pp. 400-408 (1962)
- 15.- Mandels, M., Reese, E. T. Fungal Cellulases and the Microbial decomposition of Cellulosic Fabrics. Applied Microbiology. Vol. 17 pp. 5-20 (1969)
- 16.- Miller, G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry. Vol. 31: 3 pp. 426-428 (1959)
- 17.- Mitra, G. and C. R. Wilke. Continuous Cellulase Production. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 17 pp. 1-13 (1975)
- 18.- Nakayama, Tomita, Suzuki, Nisizawa. Partial Proteolysis of some Cellulase components from Trichoderma viride and the substrate specificity of the modified products. Journal Biochemistry. Vol. 79 pp. 955-966 (1976)
- 19.- Norkrans, B. Cellulose and Cellulolysis. Advances in Applied Microbiology. Vol. 9 pp. 91-130 (1967)
- 20.- Pathak, A. N. and T. K Ghose. Cellulases: Sources, Technology. Process Biochemistry pp. 35-38 (1973)
- 21.- Peitersen Nicolai. Production of Cellulase and Protein from Barley Straw by Trichoderma viride. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 17 pp. 361-374 (1975)
- 22.- Pérez, M., D. Peláez. Recent Advances in Microbiology. Symposium. X Congreso Internacional de Microbiología. Edit. Muñoz. México (1971)
- 23.- Reed, G. Food Science and Technology. A Series of Monographs. Academic Press. Edit. Acribia.
- 24.- Reese, E. T. and A. Maguín. Surfactants as Estimulants of Enzyme Production for Microorganisms. Applied Microbiology. Vol. 17 pp. 242-245 (1969)
- 25.- Rhodes, A., D. J., Fletcher. Principios de Microbiología Industrial. 1a. Edición. Edit. Acribia (1969)
- 26.- Ronald Ferrara C. Production and Applications of Cellulase Laboratory Outline. E.N.C.B., I.P.N. (1974)

- 27.- Schultz, H. W. Food Enzymes. 1a. Edición. AVI Publishing Co. Inc. West Port. Connecticut. pp. 60-61 (1960)
- 28.- Srinivanan, V. R. and M. B. Fleenor. Fermentative and Enzymatic Aspects of Cellulose Degradation. Symposium. Microbiological Aspects of Solids Wastes Disposal. pp. 47-53 (1975)
- 29.- Toyama, N. and K. Ogawa. Sugar Production from --- Agricultural Woody Wastes by Saccharification with Trichoderma viride Cellulase. Biotechnology and -- Bioengineering. Symposium No. 5 pp. 225-244 (1975)
- 30.- Wilke, C. R. Cellulose as a Chemical Energy Resource. Biotechnology and Bioengineering. Symposium No. 5 pp. 361 (1975)
- 31.- Whithaker, R. J. Principles of Enzymology for the Food Sciences. 1a. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. (1972)