



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

Producción Microbiana de Celulasas y su Utilización
en la Sacarificación de Materiales Celulósicos

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

OSCAR GARCIA KIRCHNER

México, D. F.

1983



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.

INDICE

	pág.
1) INTRODUCCION.	
1.1 Utilización de los microorganismos por el hombre.	1
1.2 Degradación de productos naturales por microorganismos.	1
1.3 Desarrollo de una tecnología de fermentaciones para el aprovechamiento de los recursos naturales.	2
1.4 Abundancia y características de la celulosa.	4
1.5 Potencialidad de utilización de la celulosa.	5
1.6 Importancia de las celulasas en la naturaleza .	6
1.7 Fuentes microbianas de celulasas y su utilización para una reacción de sacarificación.	7
1.8 Interés en la utilización de desechos agroindustriales como sustratos para un proceso de bioconversión.	9
2) ANTECEDENTES.	
2.1 Utilización de la celulosa por los microorganismos.	15
2.2 Microorganismos productores de celulasas extracelulares.	17
2.3 Definición del término celulasas.	21
2.4 Diversidad de las celulasas.	21
2.5 Mecanismo de acción de las celulasas.	23
2.6 Propiedades de las celulasas.	27
2.7 Estructura de la celulosa.	30
2.8 Influencia de la estructura de la fibra y su susceptibilidad a la degradación enzimática.	35

	pág.
2.9 Producción de celulasas.	40
2.10 Ensayos utilizados para medir la actividad de celulasas .	49
2.11 Determinación de la actividad celulolítica total.	50
2.12 Sacarificación enzimática de la celulosa.	54
2.13 Comparación entre la hidrólisis enzimática y la hidrólisis ácida.	54
2.14 Pretratamientos utilizados para incrementar la sacarificación enzimática de la celulosa:	58
Tratamientos químicos.	60
Tratamientos físicos.	61
Tratamientos microbiológicos y/o enzimáticos.	62
2.15 Obtención de cepas hiperproductoras de celulasas por mutagénesis.	65
2.16 Aplicaciones de las celulasas.	69
2.17 Celulasas comerciales.	70
2.18 El bagacillo de caña como modelo de material celulósico.	72
 3) MATERIALES Y METODOS.	
3.1 Reactivos.	77
3.2 Medios de cultivo.	78
3.3 Microorganismos.	79
3.4 Mantenimiento y preparación de los cultivos.	79
3.5 Aislamiento.	80
3.6 Aislamiento de hongos mesófilos con capacidad de degradar rápidamente celulosa de tipo cristalino.	80

	pág.
3.7 Aislamiento de hongos mesófilos que degraden rápidamente carboximetilcelulosa.	82
3.8 Producción de celulasas :	85
a) Preparación del inóculo.	85
b) Producción de la enzima.	85
c) Obtención de los filtrados.	86
3.9 Determinación de las actividades enzimáticas :	86
a) Actividad celulolítica total.	86
b) Actividad sobre carboximetilcelulosa.	87
3.10 Preparación del reactivo de DNS.	91
3.11 Determinación de proteína.	91
3.12 Reacciones de sacarificación :	
a) Sacarificación a tiempos cortos de reacción.	94
b) Sacarificación de diversos materiales celulósicos a tiempos largos de reacción.	94
3.13 Estabilidad de la enzima.	95
 4) RESULTADOS Y DISCUSION.	
4.1 Producción de actividad celulolítica utilizando celulosa microcristalina como fuente de carbono.	97
4.2 Producción de actividad celulolítica utilizando bagacillo de caña como fuente de carbono.	103
4.3 Comparación de los filtrados producidos en base a la actividad celulolítica excretada al medio de fermentación con celulosa microcristalina o bagacillo de caña.	129

	pag.
4.4 Sacarificación de diferentes sustratos a tiempos de hidrólisis cortos.	136
4.5 Sacarificación de diversos materiales celulósicos por los filtrados producidos en el medio de fermentación con celulosa microcristalina o bagacillo de caña.	152
4.6 Pruebas de estabilidad a 50°C de la actividad celulolítica de los filtrados con los que se efectuó la reacción de sacarificación.	167
5) CONCLUSIONES.	176
6) BIBLIOGRAFIA.	179

INTRODUCCION.

Utilización de los microorganismos por el hombre.

Algunos microorganismos han sido útiles en el desarrollo histórico del hombre. El estudio de los mismos y de los procesos microbiológicos han contribuido con una serie de beneficios como es el caso de los procesos de fermentación por medio de los cuales es posible obtener alimentos, bebidas, medicinas y reactivos químicos para consumo humano.

Bajo condiciones normales y aún en el caso de restricciones económicas, la contribución potencial de los microorganismos es muy atractiva para la resolución de problemas específicos como son la carencia de alimentos, recuperación y reutilización de recursos naturales, crisis energética y eliminación de la polución y aunque algunos procesos microbianos no tienen un uso inmediato, su alcance y diversidad sirven como indicador de la realidad potencial para su aplicación en un futuro.

Degradación de productos naturales por microorganismos.

Aunque hace ya muchos millones de años que las plantas verdes sintetizan compuestos orgánicos a partir de anhídrido carbónico, ninguno de estos compuestos ha llegado a acumularse en cantidades considerables. En condiciones aeróbicas, todos los compuestos formados biosintéticamente son degradables. Para cada compuesto por complicado que este sea, existe un microorganismo capaz de degradarlo total o parcialmente y los fragmentos resultantes de igual forma son a su vez utilizados por otras especies.

Se ha estimado que los microorganismos contribuyen con un cuarto de la biomasa del peso de organismos vivos en la Tierra; la mayoría de ellos habitan el suelo, donde son responsables de la actividad biológica que predomina en el mismo. Gran parte de ellos son esenciales para el mantenimiento de ciclos biológicos de los que depende la vida del planeta.

Desarrollo de una tecnología de fermentaciones para el aprovechamiento de los Recursos Naturales.

En contraste a su larga historia, la fermentación fué considerada hasta hace algunos años como un arte, más que una tecnología. No fué sino hasta el siglo XX que se utiliza para otros fines además de la producción de vino, cerveza, pan y queso. A partir de entonces se han vislumbrado otras áreas para posibles aplicaciones de la tecnología de fermentaciones entre las que figuran:

Conversión de recursos naturales en energía, productos químicos y alimentos.

Aprovechamiento de desechos agroindustriales.

Producción de metabolitos microbianos como antibióticos, reguladores metabólicos y enzimas.

En la tabla 1, se puede apreciar las características y usos dados a los microorganismos de donde resulta conveniente resaltar la importancia que tienen los hongos en la utilización y aprovechamiento de la celulosa.

TABLA 1. CARACTERISTICAS, PROBLEMAS Y USOS DE LOS MICROORGANISMOS.

MICROORGANISMO	CARACTERISTICAS	PROBLEMAS	USOS
BACTERIAS: Schizomicetos o protistas.	Unicelulares, formas esferoidales, alargadas y de espiral. La mayoría saprófitos.	Algunas son patógenas para plantas, animales y el hombre.	Descomposición de la materia orgánica contribuyendo a la fertilidad del suelo, producción de biogas, fuente de antibióti- cos y otros agentes químicos.
HONGOS. (carentes de clorofila)	Variedad de formas; microscópicos, mohos.	Pudrición de textiles, cuero, cosechas y otros productos. Causan enfermedades en plantas y animales.	Contribuyen al reciclamiento de la celulosa, lignina y otros productos de la industria quí- mica farmacéutica.
ALGAS. Tallophitas. (plantas no diferenciadas)	Unicelulares, colonias o filamentos con cloro- fila u otro pigmento - característico; sin ho- jas y raíces verdaderas. Acuáticas.	Cubren la superficie de estanques formando película y un olor y sabor desagradables en el agua; algunas pro- ducen toxinas.	Las algas rojas y cafés son importantes en alimentación en Asia y Polinesia. Las rojas pro- ducen agar y algunas azul-ver- des fijan N ₂ . Son el alimento de los peces en el océano.
PROTOZOARIOS. (animales microscópicos)	Unicelulares, se encuen- tran en aguas frescas o de mar, en el suelo y co- mo parásitos de plantas, animales y el hombre.	Responsables de varias enfermedades serias en animales y el hombre.	Contribuyen a la descomposi- ción de la materia orgánica y de celulosa en la digestión ruminal.
VIRUS. Formas submi- croscópicas, con- siderados como intermediarios entre lo vivo y lo inerte.	Agentes infecciosos, se multiplican sólo so- bre células vivas. Compuestos de proteína y ácido nucleico.	Causan una variedad de enfermedades en humanos así como también en ani- males y en plantas.	Son importantes acarreadores de información genética. Causan enfermedades en inse- ctos.

Abundancia y características de la celulosa.

En la biosfera hay probablemente más cantidad de hidratos de carbono que de toda la materia orgánica junta lo que se debe en parte a la abundancia en el mundo de las plantas de dos polímeros de la D-glucosa, el almidón y la celulosa. El almidón es la principal forma de almacenamiento de combustible en la mayor parte de los vegetales mientras que la celulosa es el principal componente estructural de las paredes celulares rígidas de las plantas y de los tejidos fibrosos y leñosos de las mismas. La celulosa, un homopolímero lineal constituido por unidades de D-glucosa unidas por enlaces beta-1,4 glucosídicos con un peso molecular que puede ir desde 80 000 hasta 600 000 o más con un grado de polimerización de 500 a 3500 (Reese y Mandels, 1972) no se encuentra en forma pura como integrante de un recurso natural, aún el algodón, la forma más pura de la celulosa presente en la naturaleza contiene alrededor de 10% en peso de polisacáridos no celulósicos, proteínas y elementos naturales.

En la naturaleza, la celulosa se encuentra generalmente asociada con una gran variedad de polisacáridos como el almidón, la pectina, la hemicelulosa y la lignina. Las hemicelulosas y la lignina representan por lo mismo el segundo y tercer compuesto orgánico natural más abundante en la biosfera después de la celulosa ya que las hemicelulosas se encuentran presentes en la pared celular de las plantas, en una mayor concentración en las capas primarias y secundarias donde están íntimamente ligadas con la celulosa así como también como con la lignina.

Las cadenas lineales de celulosa se unen longitudinalmente para formar fibras estabilizándose mediante puentes de hidrógeno dando lugar a fibras

con cadenas medianamente ordenadas o bien a fibras con un alto grado de cristalinidad lo cual es mostrado por estudios realizados por difracción de rayos X.

Potencialidad de utilización de la celulosa.

Una gran cantidad de biomasa en forma de desechos agrícolas y forestales es acumulada cada año y a la cual es posible darle varios usos potenciales dentro de los cuales figuran entre otros su conversión biológica en alimentos o combustibles.

La celulosa es un vasto recurso natural renovable y por lo general subutilizado aunque representa una fuente potencial de azúcares y los microorganismos como sistemas enzimáticos organizados pueden con frecuencia realizar funciones más eficientes si las comparamos a procesos puramente químicos, por lo que podrían convertir ese potencial en una realidad.

La celulosa es continuamente reemplazada por efecto de la fotosíntesis, de acuerdo a una estimación realizada por Ghose en 1977; la producción neta de sustancias biológicas por efecto de este fenómeno natural es de 1.8×10^{12} tons y resulta por lo mismo normal que exista mucho interés en la utilización de los materiales celulósicos por acción de los microorganismos o bien de sus enzimas con fines industriales.

Biomasa en forma de celulosa, hemicelulosa y lignina, representa en forma significativa una forma de almacenaje de la energía solar por lo que estos materiales resultan un recurso importante no explotado en forma directa por lo que han sido planteadas varias estrategias que van desde los métodos térmicos directos como la pirólisis hasta el intento de métodos biológicos tales como la hidrólisis enzimática o la fermentación. Por otro

lado el contenido de humedad de la biomasa hace que sea menos posible utilizar algún tratamiento químico por lo que se ha pensado que el más efectivo por este motivo sería un proceso de tipo biológico.

A pesar de su natural abundancia sólo una insignificante porción de las 190 billones de toneladas métricas de celulosa disponible ha sido explotada con fines comerciales (Ghose, 1969); por lo que una alternativa para solucionar este problema sería el hacer uso de métodos microbiológicos o enzimáticos para el tratamiento y aprovechamiento de estos materiales.

Importancia de las celulasas en la naturaleza.

Las enzimas celulolíticas juegan un papel esencial en el ciclo de carbono de la Tierra. Los organismos fotosintéticos transforman el CO_2 atmosférico a materiales estructurales de las plantas. Estos materiales son la primera fuente de alimento de todas las formas de vida animal y de los combustibles fósiles que mueven la industria. Debido a que la cantidad de carbono en la Tierra es finita, este elemento debe de ser reciclado continuamente para el mantenimiento de la vida en el planeta. Los organismos que degradan la celulosa reciclan alrededor de 85 billones de toneladas métricas de carbono anualmente. Si estos organismos detuvieran su actividad mientras que la fotosíntesis prosiguiera a su paso original, la vida en el planeta tal y como la conocemos podría detenerse en un lapso de 20 años debido a la falta de dióxido de carbono (Cowling y Winford, 1977), pero la biodegradación de la celulosa es lenta debido a su naturaleza insoluble y a que no puede entrar en la célula, lo que hace necesario que los microorganismos capaces de degradarla excreten sus enzimas celulolíticas

al medio y de esta forma ya puedan utilizarla. Algunas bacterias, sin embargo poseen celulasas intracelulares como en el caso de Ps. fluorescens (Suzuki, et al 1969).

La capacidad de producir enzimas celulolíticas está ampliamente esparcida entre los microorganismos por lo que la selección de un microorganismo productor depende del propósito para el cual las enzimas sean requeridas.

Fuentes microbianas de celulasas y su utilización para una reacción de sacarificación.

A pesar de la abundancia de los microorganismos que pueden utilizar la celulosa como fuente de carbono solo unos pocos producen las enzimas con suficiente actividad celulolítica para degradar celulosa organizada hasta azúcares solubles, otros a pesar de crecer sobre celulosa producen filtrados con muy poca actividad lo que se debe a que no se encuentran presentes todos los componentes activos para degradar celulosa cristalina a glucosa (Mandels, 1975). Con miras al establecimiento de algún proceso industrial para el aprovechamiento de los materiales celulósicos deben de ser seleccionados los más eficientes productores; para estudios de desarrollo u otros propósitos de laboratorio, la cantidad de celulasas puede ser menos significativa. Las enzimas fungales ofrecen las mejores posibilidades para una explotación comercial (Mandels y Weber, 1969) ya que crecen rápidamente sobre un medio simple sobre el cual son excretadas las enzimas lo cual favorece su posterior recuperación. Además se ha podido establecer (Selby, 1967) que los hongos producen y secretan el número de enzimas -

necesario dependiendo de la fuente de carbono sobre la que crezcan y producen enzimas adicionales de acuerdo a sus necesidades de digestión de otros materiales. Cuando crecen sobre mezclas de sustratos, varias enzimas aparecen secuencialmente y aún en el caso de un sustrato como la celulosa, los componentes del sistema celulasas aparecen a tiempos diferentes..

De hecho, las celulasas ya son empleadas en la industria farmacéutica y textil así como en la transformación de alimentos (Pathak y Ghose, 1973; Johnson, 1977; Kulp, 1975) sin embargo el principal interés al futuro consiste en poder utilizarlas en la conversión de materiales celulósicos de desecho en azúcares solubles (Mandels, 1975) de importancia industrial, por lo que la disponibilidad de preparaciones de celulasas altamente activas es un prerequisite para la producción industrial de glucosa a partir de celulosa.

Un problema básico en la hidrólisis de la celulosa es que al contrario del almidón, la celulosa no es un carbohidrato de reserva que pudiera ser fácilmente convertido a glucosa cuando fuera requerido. Por el contrario, la celulosa es parte integrante de la firme estructura responsable de la tensión y rigidez existente en las plantas. Aún más, el grueso de la estructura ha sido asegurado con una goma eficiente, la lignina.

Entre los sistemas de celulasas más activos en la sacarificación de la celulosa organizada se han reportado los de Trichoderma viride (Mandels, 1975; Mandels, et al 1976), T. koningii (Halliwell, 1965), Fusarium solani (Wood, 1972) y Sporotrichum pulverulentum (Erikson y Rzedowski, 1969)

pero se sabe que aún la conversión de celulosa a glucosa no es eficiente para llevarla a un proceso comercial que resulte económico. Sin embargo dentro de las posibles aplicaciones señaladas para las celulasas ésta, además del uso directo de las preparaciones enzimáticas para el desarrollo de tecnologías dentro del área alimenticia y farmacéutica es una de las más importantes puesto que la glucosa derivada de la hidrólisis enzimática podría ser utilizada como sustituto de la dextrosa procedente del almidón de maíz en la industria de alimentos, como sustrato de fermentaciones industriales, para producción de proteína unicelular o bien para la producción de etanol por fermentación.

Interés en la utilización de desechos agroindustriales como sustratos para un proceso de bioconversión.

Se designa como materiales celulósicos a aquellos subproductos generados de actividades agroindustriales que no tienen empleo posterior alguno y por el contrario contribuyen a la contaminación ambiental. Entre los materiales celulósicos de desecho que se han estudiado, los mayores esfuerzos de investigación y desarrollo de algún proceso biotecnológico se han concentrado en el bagacillo de caña (Osman, 1972; Bellany, 1974; Srinivasan, 1974; Rockwell, 1976).

Sin embargo no existen procesos a gran escala que utilicen dicho sustrato ya sea como fuente de carbono en fermentación o bien como un sustrato en una reacción de hidrólisis, debido a que se requiere de un pretratamiento físico y químico para que la celulosa se encuentre más asequible. Aunque los pretratamientos son técnicamente factibles, a la fecha no han demostrado ser económicamente viables (Rockwell, 1976).

En nuestro País se producen cerca de 30 millones de toneladas de caña de azúcar que a su vez producen 12.5 millones de toneladas de bagazo cuyo contenido en celulosa es de aproximadamente un 51% (Campos Castillo, 1977). El bagazo es el residuo fibroso del tallo de la planta, consiste de fibras, agua y pequeñas cantidades relativas de sólidos solubles. Está formado por una fracción fibrosa y otra conocida como médula, pulpa o bagacillo; por lo general se compone de 70% de fibra y 30% de parénquima. El bagacillo como desecho agroindustrial se produce en el proceso de extracción del jugo o bien durante la fabricación de papel como subproducto de la obtención de furfural. La composición promedio de este material es la siguiente:

Composición relativa del bagazo de caña de azúcar.

Componente	Bagazo entero (%) (B. S.)	Fibra (%)	Médula (%)
Celulosa	46.00	56.60	55.40
Hemicelulosa*	24.50	26.11	29.30
Grasas y ceras	3.45	2.25	3.55
Ceniza	2.40	1.30	3.02
Lignina	19.95	19.15	22.30
Sílica	2.00	0.46	2.42

* Se incluyen arabanos, galactanos y xilanos.

Referencia : Osman (1975).

Composición comparativa entre bagacillo tratado con ácido sulfúrico y bagacillo no tratado.

Componente	Sin tratamiento (%)	Con tratamiento (%)
Cenizas	6.95	5.76
N(Kjeldahl)	1.78	3.82
Fibra cruda	45.01	39.01
Extracto etéreo	0.77	0.74
Carbohidratos digeribles.	45.49	50.07

Fuente : LANFI.

Referencia: Campos Castillo,(1977).

Como se observa, el bagacillo de caña reúne ciertas características que lo hacen un material adecuado para ser utilizado como sustrato para producción de celulasas o en su caso para procesos de sacarificación, éstas son : a) Disponibilidad, b) Buen contenido de celulosa (por lo menos alrededor del 50%), c) Está siendo subutilizado y d) Es un residuo contaminante. Pero a pesar de los intentos realizados para utilizar las celulasas con fines de integrar el aprovechamiento de algún material celulósico como el bagacillo de caña, no existe en la actualidad un proceso industrial de sacarificación enzimática de la celulosa; esto se debe principalmente a limitantes en la producción de celulasas que degraden en forma eficiente la celulosa organizada y a los pocos trabajos que utilicen este material con fines de producción de estas enzimas (García Martínez, 1974) por lo que dentro de las posibles soluciones planteadas para lograr un proceso adecuado para la utilización de la celulosa más efectivo, se han propuesto entre otras las siguientes:

__Selección de microorganismos y/o mutantes en base a la producción de algún componente en especial del sistema enzimático de las celulasas utilizando como sustrato para la misma el material celulósico que posteriormente se piensa hidrolizar.

__Contar tanto para la producción así como para la reacción de sacarificación con algún material que haya recibido algún pretratamiento previo tal y como sería el caso del bagazo de caña después de la obtención de furfural (Linko, 1977) dado que los pretratamientos eficientes conocidos físicos y químicos resultan muy costosos.

Por lo mismo resulta conveniente pensar que aún existen microorganismos que no hayan sido probados en cuanto a la producción de celulasas extracelulares activas para la obtención de una hidrólisis de cuando menos un 4% de conversión sobre papel filtro bajo las condiciones establecidas por Mandels (1976) y que pudieran presentar características ventajosas a fin de ser utilizadas para la producción de celulasas ya que la disponibilidad de enzimas que posean una actividad alta es la base para tener un proceso que resulte adecuado para la conversión enzimática de la celulosa. A la fecha, el hongo Trichoderma viride ha resultado ser la mayor fuente de celulasas pero es importante tomar en cuenta que existen otros microorganismos que aunque en menor grado poseen actividad celuloítica por lo que resultaría conveniente intentar obtener a partir de los mismas preparaciones con mayor actividad mediante variaciones de las condiciones de cultivo o bien del medio utilizado para la producción.

En la mayoría de los trabajos sobre producción de celulasas se utiliza celulosa pura en el medio de crecimiento sin embargo, con miras a lograr la aplicación práctica sería conveniente realizar la producción utilizando materiales como el bagazo de caña (Srinivasan y Han, 1969) y la paja (Feitersen, 1975) ya que para integrar un proceso comercial a gran escala se requiere contar con bastante cantidad de sustrato por lo que utilizar un subproducto agroindustrial en lugar de un sustrato puro sería menos costoso ya que se abatiría uno de los principales costos durante la producción el cual es lo concerniente a las materias primas, ya que evaluaciones recientes sobre el proceso de sacarificación enzimática de la celulosa han revelado que el costo mayor del mismo se centra en la producción de la enzima, siendo este de un 40-60% (Joglekar, et al 1983).

Por otro lado, se sabe que dichos subproductos por lo general contienen varios tipos de carbohidratos y cuando las enzimas son producidas para la hidrólisis de un material en particular es deseable el uso del mismo como fuente de carbono para inducir la síntesis de las enzimas apropiadas para su hidrólisis (Enari y Markkanen, 1977). Además, la mayoría de estos materiales están siendo subutilizados ya sea para la elaboración de compostas o bien son incinerados siendo este último método el más común, sin embargo las descargas de partículas resultantes y el humo que queda en la atmósfera contribuyen substancialmente al aumento de la contaminación en el medio ambiente por lo que contar con métodos alternos como serían los microbiológicos y/o enzimáticos para el tratamiento de estos materiales de desecho sería de gran importancia.

En México se cuenta con lugares en los que en condiciones tropicales durante muchos años se han procesado cultivos que producen grandes cantidades de materiales celulósicos de desecho como sucede con el bagacillo de caña de azúcar donde seguramente han ocurrido procesos de selección natural de microorganismos productores de celulasas, por tal motivo intentar el aislamiento de nuevas cepas adaptadas a las condiciones naturales existentes en la región donde se encuentra tal material, es una posibilidad que es necesario examinar. Además, entre los principales subproductos de la industria azucarera en nuestro País, figuran el bagazo y el bagacillo de caña los cuales por lo general son subutilizados como se mencionó anteriormente a pesar de su abundancia, disponibilidad y bajo costo resultando por lo mismo potenciales para su utilización sobre todo este último en la producción de azúcares, proteína unicelular y enzimas.

Debido a los puntos expuestos, el interés de este trabajo se encuentra enfocado inicialmente a la búsqueda de nuevas fuentes de celulasas mediante el aislamiento de hongos activos en la degradación de celulosa cristalina y amorfa a partir de muestras de suelo de cañaveral y de bagacillo de caña para posteriormente evaluar su utilización como sustrato tanto para la producción de celulasas así como para la obtención de azúcares solubles mediante una reacción de sacarificación con los filtrados obtenidos de su fermentación. Así mismo determinando los factores que puedan aumentar la reacción de sacarificación de la celulosa por medio del sistema celulasa producido por los microorganismos seleccionados y efectuar una comparación con respecto a los resultados obtenidos con una cepa de colección (T. viride) que ya ha sido utilizada para fines similares.

ANTECEDENTES.

Utilización de la celulosa por los microorganismos.

Las bacterias y los hongos son los dos principales grupos de microorganismos que pueden degradar la celulosa, aún cuando existen algunas especies de algas como Tolypothrix byssoidea (Jurazek, 1976) que también pueden hacerlo. Algunas especies celulolíticas implicando bacterias, actinomicetales y hongos son: a) Bacterias: Sporocitophaga myxococcoides (Charpentier, 1963, 1965); Cellvibrio fulvus (Bengt, et al 1972); Cellvibrio gilvus (Storvick, 1960); Cellulomonas sp. (Han y Srinivasan, 1968); Clostridium sp. (Lee, et al 1975).

b) Bacterias anaerobias del rumen como Ruminococcus albus (Leatherwood, 1965), Ruminococcus flavefaciens, Bacteroides succinogenes, Butyvirbio fibrisolvens (Bryant, 1963); Pseudomonas fluorescens var. Cellulosa (Ueda, et al 1952).

c) Actinomicetos entre los que se encuentran Streptomyces antibioticus (Enger y Sleeper, 1965), termofilicos como Thermomonospora fusca (Forbes, 1969) y Streptomyces thermodiastaticus (Crawford y McMoy, 1972)

d) Hongos: Rhizopus sp. (Imada et al 1962), diversas especies de Penicillium, P. variable (Pal y Ghosh, 1965), P. pusillum (Mandels, 1969), P. italicum (Mandels, 1975); Trichoderma viride QM6a (Mandels y Reese, 1964), mutantes de T. viride QM 9123 y QM 9414 (Mandels et al, 1971, 1972, 1975), NG 14 (Montenecourt y Eveleigh, 1977), MCG 77 (Gallo, et al 1978), RUT C-30 (Tanguy, et al 1981); T. koningii (Halliwell, 1965); Myrothecium verrucaria (Selby, 1963); Humicola grisea QM 228, Hormiscium sp. QM 1192 (Mandels 1975); Aspergillus fumigatus (Loginova, et al 1965); A. terreus (Pathak, et al 1973); A. wentii (Husemann, et al 1976); Pyrenochaeta terrestris (Horton

y Keen, 1966); Irpex lacteus (Kawai, et al 1978); Sclerotium rolfsii (Sadana, et al 1978); hongos micorrizales (Ritter, 1964); hongos termofilicos (Fergus, 1969), Sporotrichum thermophile (Semeniux, 1966), Chaetomium thermophile var. coprophile, Thermoascus aurantiacus (Romanelli, 1975), Aspergillus aculeatus Murao, 1977). Un hongo superior: Fomes annosus (Lyr y Schanul, 1964) .

Las celulasas presentes en los jugos digestivos de varios invertebrados en la mayoría de los casos parecen estar relacionadas con la presencia de una microflora celulolítica ya que aunque la celulasa presente en el pez silvestre (Ctenolepsinalineata), los caracoles (Helix pomatia) y ciertas termitas son probablemente producidas por el propio organismo, existe duda con respecto a su origen (Reed, 1975).

Dentro de los protozoarios que pueden utilizar la celulosa se pueden mencionar los siguientes: Enoploplastrum triloricatum, Eudiplodinium magii, Diploplastrom affine, Epidinium scandatum, Diplodinium monocanthum y Diplodinium pentacanthum (Coleman, et al 1976).

El ataque de la celulosa por las enzimas de los microorganismos depende de varios factores como son la humedad, la temperatura, disponibilidad de nutrientes y del pH, además del grado de cristalinidad de la celulosa y el tipo y grado de asociación que tenga con otros compuestos.

A pesar de la abundancia de los microorganismos que pueden utilizar la celulosa como fuente de carbono sólo unos pocos producen las enzimas con suficiente actividad celulolítica para degradar celulosa organizada hasta

azúcares solubles. Entre estos se encuentran T. viride, T. lignorum, T. koningii, Cryosporium lignorum, C. prusinosum, P. funiculosum, P. i-riensis y Fusarium solani (Mandels, 1975). Otros a pesar de crecer en celulosa producen filtrados con muy poca actividad, lo que se debe a que no se encuentran presentes todos los componentes activos para degradar celulosa cristalina a glucosa (Mandels, 1975). En el caso de algunas bacterias que crecen sobre celulosa, se ha detectado en el medio de cultivo actividad celulolítica diferente a la intracelular (Suzuki, et al 1969) pero hasta la fecha no ha sido reportada la obtención de filtrados activos que pudieran ser empleados con fines prácticos.

Microorganismos productores de celulasas extracelulares.

La capacidad de producir enzimas celulolíticas está ampliamente esparcida entre los microorganismos. La selección de un microorganismo productor depende del propósito para el cual las enzimas sean requeridas. Para la producción industrial, los más eficientes deben de ser seleccionados ya que la disponibilidad de preparaciones de celulasa altamente activas es un requisito en el caso de querer intentar obtener industrialmente glucosa a partir de materiales celulósicos. Trichoderma viride parece ser la mejor fuente disponible de celulasas extracelulares, ya que algunos microorganismos secretan sólo endoglucanasas (C_x) o beta-glucosidasa y por lo mismo son incapaces de hidrolizar celulosa cristalina nativa; sólo los verdaderos microorganismos celulolíticos poseen actividad de exoglucanasa (C_1) que puede llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa nativa.

Existe mayor cantidad de hongos y bacterias que producen celulasas que

degradan celulosa pretratada o bien a la carboximetilcelulosa, pero no a la celulosa cristalina (Suzuki, 1975; Enari, et al 1975). Esto se debe a el hecho de que las celulasas son un complejo de enzimas y no todos los componentes enzimáticos del sistema celulasa se encuentran presentes en el filtrado del cultivo después del crecimiento de todos los microorganismos. Por lo mismo, un crecimiento rápido y la degradación de celulosa y/o la producción de niveles altos de enzimas capaces de hidrolizar a los derivados solubles de celulosa, no son criterios adecuados para la selección de microorganismos para ser utilizados como fuente de celulasas.

En años recientes, también han sido estudiados microorganismos termofílicos. El ascomiceto Chaetomium thermophile var dissitum, es un hongo termofílico típico capaz de producir un sistema celulolítico para la descomposición de la celulosa nativa (Goksoyr, et al 1975). Chaetomium thermophile, Sporotrichum thermophilium y Thermoascus auranticus crecen y/o degradan celulosa muy rápidamente, pero la actividad de los filtrados de cultivo es baja (Mandels, 1975). El interés en los microorganismos termofílicos ha sido estimulado por la búsqueda de celulasas termoestables, sin embargo las celulasas de termófilos no son necesariamente más estables al calor que las celulasas de mesófilos (Mandels, 1975).

El centro de desarrollo de la armada de Natick EUA, posee en su colección 14 000 hongos celulolíticos (Augustine, 1976); sin embargo aunque el número es muy grande sólo unos cuantos producen niveles altos de enzima capaz de hidrolizar en forma extensiva sustratos cristalinos in vitro, ya que la mayoría degrada sólo rápidamente regiones amorfas de celulosa -

o bien derivados solubles de la misma (Mandels, 1975). Entre los microorganismos celulolíticos reportados, el hongo Trichoderma viride en la actualidad clasificado como Trichoderma reesei (Simmons, 1977) ha mostrado ser el que mayor actividad celulolítica extracelular produce y también es con el que se ha trabajado en la mayoría de las investigaciones existentes sobre celulasas.

Ahora bien, la secreción de las enzimas al medio de cultivo no es el único medio para utilización de la celulosa; la producción de proteína unicelular por el cultivo directo de los microorganismos sobre los materiales celulósicos puede ser en un futuro cercano tan importante como la producción de celulasas extracelulares y de hecho algunos hongos capaces de producir celulasas como el ascomiceto C. cellulolyticum resultan ser más adecuados para la producción de proteína unicelular (Moo-Young, et al 1977).

Entre los hongos utilizados para la producción de proteína unicelular a partir de materiales celulósicos figuran Aspergillus, Penicillium, Rhizopus, Trichoderma, Myrothecium, Formes, Paria, Polyporus. Recientemente ha sido sugerido el uso de Aerobasidium pullulans (Han, et al 1976) y Fusarium sp (Christias, et al 1975) utilizando residuos agrícolas. A. pullulans es un hongo levaduriforme con una velocidad de crecimiento y tamaño mayor a C. utilis.

Se han utilizado combinaciones de dos o más microorganismos para fermentación de celulosa. T. viride y C. utilis (Peitersen, 1975); Cellulomonas y Alcaligenes (Han, et al 1971); Sporotrichum pulvelulentum y C. utilis (Eriksson, 1975) los cuales han sido utilizados juntos para la

producción de proteína unicelular. El primer microorganismo es por lo general celulolítico y el segundo no lo es, el primero degrada la celulosa y el otro crece utilizando los productos de la misma aumentando la masa celular.

Definición del término celulasas.

Celulasas es el nombre trivial dado a las enzimas cuyo nombre sistemático es beta-1,4-glucan 4-glucohidrolasas (E.C. 3.2.1.4.) (Dixon y Webb, 1964). Estas enzimas rompen los enlaces beta-1,4 glucosídicos de la celulosa así como también de los materiales celulósicos y en los productos derivados de la celulosa tales como las celodextrinas y la celobiosa. (Reed, 1975).

El concepto celulasa puede aplicarse a todas las enzimas capaces de degradar celulosa a azúcares suficientemente pequeños para que puedan pasar a través de la membrana celular. Se ha visto que el proceso de la degradación de la celulosa es complejo y es realizado por la acción sinérgica de varias enzimas. Actualmente está bien establecido que hay al menos tres tipos diferentes de actividad celulolítica: exo-beta-1,4 glucanasa (E.C. 3.2.1.), endo-beta-1,4 glucanasa (E.C. 3.2.1.4.) y beta glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) (Leena, et al 1981).

Un efecto sinérgico bastante fuerte ha sido observado entre las exo y las endoglucanasas para hidrolizar celulosa cristalina (Avicel) pero no cuando se trata de celulosa hinchada con ácido (Streamer, et al 1975). La beta-glucosidasa hidroliza celobiosa y oligosacáridos de cadena corta hasta glucosa, pero no tiene ningún efecto sobre la celulosa (Bucht y Eriksson, 1965).

Diversidad de las celulasas.

En los microorganismos donde se ha caracterizado el sistema celulasa se ha encontrado que para cada uno de ellos el sistema varía en cuanto al número de isoenzimas que conforman cada tipo de actividad (Bergert y Petterson, 1973, 1975, 1976; Eriksson, et al 1975; Streamer, et al 1975; Wool,

1968, 1969, 1971, 1975). Wood y McCrae, (1975) separaron el complejo celulasa producido por Trichoderma koningii en ocho componentes puros utilizando la filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y electroenfoque. Esos componentes fueron una exo-beta-1, 4 glucanasa, cinco endo-beta-1, 4 glucanasas y dos beta-glucosidasas de donde se entiende que el complejo contiene varias isoenzimas. Los mismos autores (1978) aislaron y caracterizaron 4 diferentes endoglucanasas de los filtrados del cultivo de T. viride y T. koningii y establecen que más que ser isoenzimas son enzimas diferentes con un peso molecular distinto y composición de aa y carbohidratos distinta en cada una de ellas, así como también en su especificidad para el sustrato. De igual forma, en los cultivos de Trichoderma viride crecidos sobre un medio con 6% de celulosa se ha obtenido en los análisis de los filtrados para proteínas enzimáticas efectuados por cromatografía líquida de gran afinidad que el 85% de la proteína excretada corresponde a celulasa y la distribución de los componentes en el sistema ha sido muy similar encontrándose al menos la presencia de una beta-glucosidasa, 2 exo-beta-glucanasas (70 -80% de la proteína total) y 5 endo-beta-glucanasas (20-30% de la proteína total) (Mandels, et al 1981). Pero aunque un microorganismo buen degradador de celulosa como T. viride puede poseer 11 diferentes enzimas, sólo tres reacciones básicas se llevan a cabo de acuerdo a alguno de los mecanismos propuestos para tal fin.

Mecanismo de acción de las celulasas.

La acción enzimática sobre celulosa insoluble es una de las más difíciles reacciones de explicar, se sabe que es un proceso multienzimático y también que aunque ciertos microorganismos pueden digerir rápidamente la celulosa, sus extractos libres de células sólo la atacan débilmente.

Alrededor del año 1950 Reese, Sin y Levinson presentaron su concepto sobre los componentes C_1 y C_x el cual se basaba en que ciertos microorganismos son capaces de atacar celulosa nativa mientras que otros sólo atacan derivados solubles como la CMC; estos últimos deben por tanto carecer de una enzima presente en los primeros. Esta enzima fué designada como C_1 y es capaz de convertir celulosa nativa en cadenas lineares de anhidroglucosa las cuales entonces pueden ser hidrolizadas por la enzima C_x en oligosacáridos solubles. A los microorganismos que sólo pueden crecer sobre celulosa tratada y que son incapaces de crecer sobre celulosa nativa se les ha designado como pseudocelulolíticos (Wood, 1969). Estos microorganismos elaboran enzimas del tipo C_x las cuales degradan sólo formas de celulosa alteradas por la acción de algún tratamiento, mientras que los microorganismos celulolíticos verdaderos sintetizan una enzima adicional (C_1) la cual cuando actúa en sinergismo con las enzimas C_x permite la hidrólisis de sustratos cristalinos.

Sin embargo, el primer modelo sugerido para la hidrólisis enzimática de la celulosa ha sido extensamente cuestionado en particular el primer paso para la hidrólisis de celulosa nativa. Actualmente el punto de vista más aceptado es que la enzima denominada C_1 es una exoglucanasa. (Wood 1980). En el caso de T. viride y T. koningii el componente C_1 purificado

ha mostrado ser una celobiohidrolasa (Eriksson, 1975). De igual forma existe una teoría alterna sobre C_x (endoglucanasa) que hace notar que actúa al azar sobre la cadena de celulosa extendiéndola y permitiendo la acción subsecuente de las enzimas C_1 (exoglucanasas) sobre las cadenas terminales expuestas.

Wood (1975) estudió las propiedades de los componentes C_1 y C_x puros reconstituyéndolos en las proporciones presentes originalmente en el filtrado de cultivo de T. koningii y fué observado que la recombinación del componente C_1 con algún C_x o con beta-glucosidasa no es efectiva tal y como lo es la recombinación de todos y que los cinco componentes encontrados deben de estar presentes en sus proporciones originales para realizar la actividad de solubilización del algodón con el filtrado del cultivo no fraccionado. Resultados similares sobre el efecto sinérgico de estos componentes junto con la celobiasa han sido reportados para que se exprese la manifestación de actividad máxima en el caso de las celulasas de T. viride (Pettersson, 1975; Selby, 1967); P. funiculosum (Selby, 1958) y F. solani (Wood, 1977). Por lo mismo es aparente que la degradación de la celulosa es un proceso complicado que requiere que exista un efecto sinérgico entre las exo y endoglucanasas y que también la beta-glucosidasa es necesaria para remover la celobiosa la cual, en algunos casos inhibe la acción de la exoglucanasa. Lo que es necesario considerar es que ya es tiempo de reemplazar el viejo concepto sobre C_1 - C_x por el uso de un término más preciso como podría ser la acción conjunta de las endo-glucanasas y exo-glucanasas. Sin embargo en lo que respecta

al componente C_1 existe confusión al reemplazarlo en su totalidad por el término exoglucanasa dado que existen exo-glucanasas que no atacan la celulosa insoluble (Shibata y Nisizawa, 1975). Por otro lado es también recomendable señalar que el mecanismo de acción del complejo celulasa en otros microorganismos puede ser diferente (Mandels y Weber, 1969). Sin embargo Reed (1975) existen tres posibles explicaciones sobre el modo de acción del factor llamado C_1 para la hidrólisis de celulosa de tipo cristalino: a) El factor C_1 distorsiona la estructura del sustrato de forma suficiente para que las moléculas de agua hidraten segmentos de la cadena que no se encontraban inicialmente expuestos al ataque, b) C_1 protege a las celulasas de la desnaturalización o de una absorción irreversible, c) C_1 posee actividad enzimática hidrolítica. De esas posibilidades la última era por lo general dudosa hasta que fué demostrado (Wood y McCrae, 1972) que tal componente es una beta 1, 4 glucan celobiohidrolasa.

En lo que respecta al sistema enzimático completo se puede considerar el siguiente mecanismo sobre la degradación enzimática de la celulosa descrito por Petterssen (1975) el cual sugiere que : a) Las regiones de baja cristalinidad en la fibra de celulosa son atacadas por endoglucanasas y son formadas cadenas terminales libres.

b) Las exo-glucanasas principian la degradación de las cadenas terminales por la remoción hidrolítica de celobiosa.

c) La celobiosa es hidrolizada a glucosa por la acción de la beta-glucosidasa.

Este mecanismo fué sugerido inicialmente por Eriksson en 1969 pero

ahora se entiende que la endo-glucanasa actúa al azar sobre la cadena de celulosa y las exoglucanasas actúan sobre las cadenas terminales expuestas removiendo celobiosa (Wood, 1975) o bien glucosa (Eriksson, 1974); existiendo una acción sinérgica bastante fuerte entre las endo y exoglucanasas (Wood, 1977). Esta hipótesis que cuenta con un apoyo considerable es justamente la inversa de la hipótesis propuesta por Reese en 1950. En la figura 1 se puede apreciar una representación esquemática sobre este mecanismo.

Aunque el sinergismo entre las exo y endo-glucanasas se encuentra claramente establecido, un descubrimiento reciente establece que la exo-glucanasa actúa sinérgicamente sólo con ciertos tipos de endoglucanasas (Wood, 1980; Wood y McCrae, 1979) lo cual sugiere la posibilidad de que mayor cantidad de áreas cristalinas son solubilizadas sólo con la acción secuencial - rápida de aquellas exo y endo-glucanasas que son capaces de formar un complejo enzima-enzima sobre la superficie de las cadenas de celulosa.

En resumen es posible establecer que la tendencia más aceptable es considerar al sistema celulasa como sigue:

1. - Endo-beta 1, 4 glucan glucanasas (las enzimas C_x a las que se refiere Reese) se encuentran presentes en forma de diferentes componentes variando entre ellos el grado de actividad al azar. Uno de ellos puede ser la enzima que actúa primero sobre celulosa cristalina o bien en celulosas altamente organizadas.

2. - Exo-beta 1, 4 glucanasas, se encuentran presentes en dos formas :

a). - Beta 1, 4 glucan celobiohidrolasas (CBH) que remueven unidades de celobiosa a partir de la porción final no reductora de la cadena de celulosa. Esta CBH es frecuentemente comparada con la vieja enzima C_1 .

b). -Beta 1, 4 glucanglucohidrolasa que remueve unidades de glucosa de la porción final no reductora de la cadena.

3. -Celobiasa, beta-glucosidasa la cual convierte a la celobiosa y otras celodextrinas en glucosa.

Propiedades de las celulasas.

En la tabla 2 son ennumeradas algunas de las propiedades de la celulasa de T. viride pero con respecto a los pesos moleculares puede decirse que para el caso de las exo y endoglucanasas de T. viride, T. koningii, Fusarium solani y Penicillium funiculosum estos se encuentran en el rango de 40 000 a 75 000 exceptuando el de los componentes de bajo peso molecular de T. koningii y T. viride que están en el rango de 12 500 a 13 000 (Eriksson, 1975; Wood, 1975).

La termoestabilidad es una de las propiedades técnicas más importantes de las celulasas ya que la hidrólisis de la celulosa procede en forma más rápida a temperaturas altas. Las endoglucanasas son muy estables más de 4 hrs a 60°C y pH 5.0. La beta-glucosidasa y la exoglucanasa de T. koningii son semejantes en lo que a su estabilidad se refiere a la temperatura, a 60°C pierden alrededor del 80% de su actividad original en 4 hrs y un pH de 5.0 (Wood, 1975).

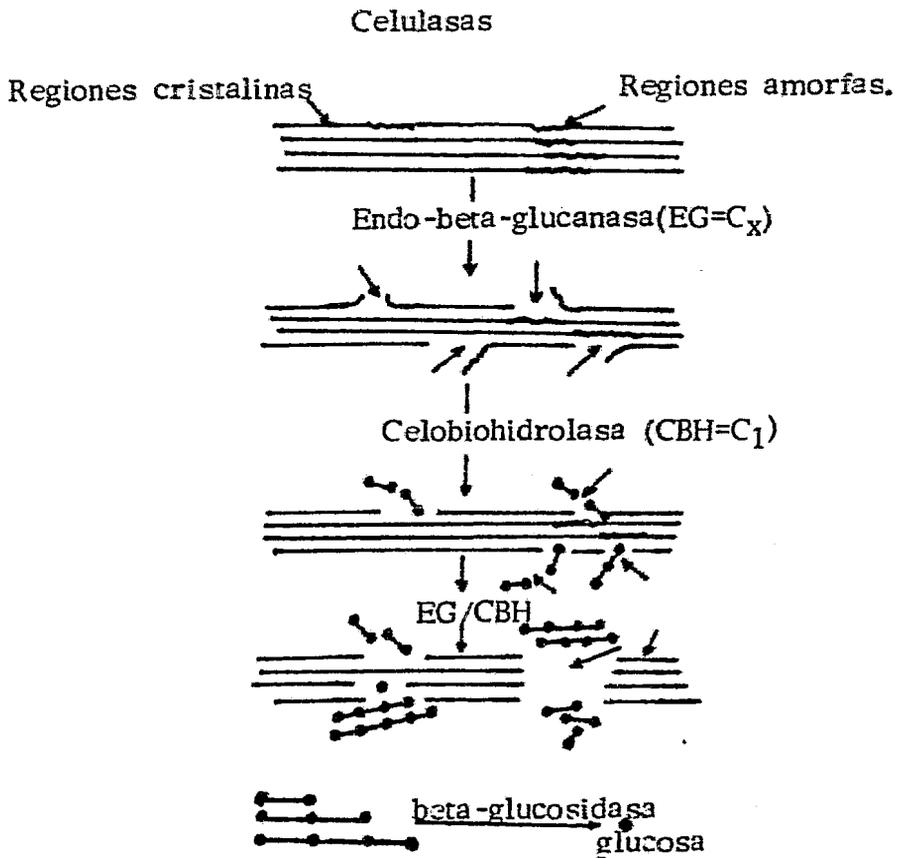


Fig. 1 Representación esquemática de la acción sinérgica de las celulasas durante la celulólisis.

Ref. Wood, T.M. and McCrae, S.I. (1977).

Tabla 2. Algunas propiedades de las enzimas celolíticas aisladas de Trichoderma viride.

Tipo de enzima	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico	Contenido de Carbohidratos (%)	Actividad hacia diferentes sustratos.			
				CMC	Celulosa Microcrist.	Celulosa Reprecipitada	Celotetraosa
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	-	-	-	+

Referencia. -Pettersson L. G. (1975).

Estructura de la celulosa.

De manera de entender mejor al sistema celulosa es conveniente discutir también la estructura del sustrato sobre el que actúa, la celulosa.

La celulosa es el principal componente estructural de los vegetales constituyendo la tercera parte de su peso seco por lo que es el carbohidrato más abundante en la naturaleza. Químicamente es un polímero lineal de peso molecular elevado compuesto de residuos de D-glucosa unidos por enlaces beta-1, 4 glucosídicos. Pero la celulosa, no se encuentra pura en la naturaleza, ya que por lo general se encuentra asociada con otros polisacáridos como el almidón, las hemicelulosas y la pectina.

Las hemicelulosas incluyen polímeros o heteropolímeros de galactosa, manosa, xilosa, arabinosa y otros azúcares así como sus ácidos urónicos.

Además casi toda la celulosa se encuentra interaccionando fisicoquímicamente con la lignina que es un polímero complejo con unidades fenólicas.

Por lo mismo, en lo que a abundancia se refiere la lignina y la hemicelulosa serían el segundo y tercer material respectivamente.

En la celulosa nativa, las cadenas están formadas por más de 10 000 - residuos de D-glucosa, su peso molecular varía entre 60 000 y 1 500 000 (Fan, et al 1979). El número de veces que la unidad $C_6H_{10}O_5$ se repite en la cadena, se denomina grado de polimerización. En la celulosa de pulpa y de papel filtro el grado de polimerización se encuentra en el rango de 500 a 2 100 a lo que corresponde un peso molecular aproximado entre 80 000 y 500 000 (Reese, et al 1972).

La celulosa se encuentra generalmente en forma fibrosa y presenta una

resistencia a la tensión muy grande, es insoluble en agua fría al igual - que en la caliente.

La celulosa además de ser insoluble en el agua, lo es en solventes orgánicos neutros como la gasolina, alcohol, benceno, éter, cloroformo y tetracloruro de carbono. También es casi insoluble en soluciones acuosas diluidas de ácidos y álcalis. Se disuelve en ácido sulfúrico al 72-75% y en ácido clorhídrico al 44% pero a menos que la temperatura de esas soluciones se mantenga baja, pronto tienen lugar cambios químicos con degradación de la celulosa. Es también soluble en ácido fosfórico al 85% en el cual la degradación es menos notoria. Un solvente característico para la celulosa es el hidróxido de cuproamonio así como también la cuprietilen-diamina utilizándose ambos para el caso que se requiera determinar la viscosidad de las soluciones de celulosa y para estimar el número de veces que la unidad de glucosa se presenta en una preparación de celulosa.

La relación entre la celulosa y la glucosa ha sido establecida mediante la hidrólisis ácida para lo cual esta debe de realizarse completamente ya que si esta hidrólisis es incompleta se pueden aislar una serie de carbohidratos además de la glucosa.

En una primera etapa de una hidrólisis ácida moderada, si la celulosa es secada sin lavarse, comienza a perder su resistencia a la tensión, las fibras se vuelven frágiles y al secarse se desmoronan muy rápidamente. Este material parcialmente hidrolizado se llama hidrocclulosa y el GP promedio de este compuesto es mucho más bajo que el de la fibra original. Una hidrólisis más drástica da lugar a celodextrinas y posteriormente a diversos

oligosacáridos. Además de glucosa, los oligosacáridos intermedios más sencillo que se encuentran al hidrolizar completamente la celulosa por vía ácida son la celobiosa y la celotriosa.

Cada unidad estructural en la celulosa contiene tres grupos hidroxilo alcohólicos en los átomos de carbono 2, 3 y 6. Los dos primeros son secundarios y el otro es un grupo hidroxilo alcohólico primario, esto ha sido puesto en evidencia al introducir grupos metilo obteniéndose una celulosa metilada.

Ahora bien, en cada pared secundaria de las plantas, la celulosa y otros constituyentes de la pared celular se encuentran agrupados en forma de paquetes delgados y largos denominados microfibrillas. Las microfibrillas son entidades en las que las moléculas de celulosa se entrecruzan de una microfibrilla a otra. Dentro de cada microfibrilla, las moléculas lineares de celulosa se encuentran asociadas en varios grados de paralelismo: las regiones que contienen moléculas altamente orientadas son llamadas cristalinas mientras que aquellas de un orden menor son denominadas paracrystalinas o regiones amorfas.

En las zonas cristalinas los grupos de una molécula de celulosa se aproximan entre sí por fuerzas de valencia secundaria algunas de las cuales se atribuyen a fuerzas de Van der Waals y otras a puentes de hidrógeno.

Aunque esas fuerzas son mucho más pequeñas que las que involucran la presencia de valencia primaria como la ligadura glucosídica, a ellas se

debe en parte las propiedades de resistencia a la tensión de las fibras de celulosa.

Las microfibrillas, miles de las cuales se presentan en una fibra de celulosa se encuentran orientadas de diversas formas, en las zonas amorfas de éstas se hace evidente la reactividad química de la celulosa. Las zonas cristalinas de las fibrillas son quizá la causa de la tenacidad de la fibra: a las áreas amorfas se les puede atribuir la elasticidad y la capacidad de hinchamiento características de la celulosa.

Se sabe que la celulosa, se encuentra en varias formas polimórficas, (Bellengsen y Tomnensen, 1971) las cuales han sido designadas como celulosa I, II, III, IV (Honeyman, 1959) las cuales pueden ser distinguidas de acuerdo a sus características presentes en estudios de difracción de rayos X. La celulosa denominada como celulosa I, es la forma más polimórfica que se encuentra presente en los materiales celulósicos nativos como el algodón y la pulpa de madera. La celulosa II es una modificación cristalina representativa de las formas de celulosa regenerada como pueden ser el algodón y la pulpa de madera que han sido tratados con hidróxido de sodio así como también los derivados saponificados siendo el rayón el ejemplo más típico de este tipo de celulosa. La celulosa III y IV son formadas por el tratamiento con etilendiamina anhidra y por la acción de temperaturas altas respectivamente.

De acuerdo con el método que se utiliza para su extracción, la celulosa ha sido clasificada en varios tipos: celulosa cruda se llama al complejo que forman la alfa-celulosa, la lignina y materiales asociados

que son solubles en agua, alcohol o éter. Holocelulosa, es la porción libre de materiales solubles en agua, alcohol o éter y está formada por alfa-celulosa, lignina y hemicelulosa. Alfa-celulosa, es celulosa libre de lignina y hemicelulosa, la cual es insoluble en sosa al 17.5% y consta principalmente de cadenas largas de glucosa superpuestas.

Sin embargo, como se mencionó con anterioridad, la celulosa en la naturaleza no se encuentra constituyendo el 100% del material orgánico de las plantas siendo variable su proporción; así por ejemplo: el pasto contiene 20% de celulosa, el bagazo de caña de azúcar alrededor de 48% (Miller, 1973), el algodón con 91%, los árboles en general tienen 40-50%. Por lo mismo es conveniente conocer también el contenido de hemicelulosa y de lignina la cual varía de acuerdo al material celulósico, así por ejemplo tenemos:

	(% en peso seco.)			
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Total
Madera	43.0	25.75	25.0	93.75
Bagazo	42.6	31.25	22.0	95.85
Olotos	38.6	34.00	18.2	90.80

La hemicelulosa contiene principalmente entidades de azúcares diferentes a la glucosa siendo por lo general la unidad predominante la xilosa aunque con frecuencia se encuentran presentes unidades de manosa. Las hemicelulosas contienen también invariablemente unidades de ácido urónico las cuales se encuentran unidas con unidades de xilosa de manera que cuando se hidroliza una hemicelulosa, se forma un disacárido modificado conocido -

como ácido aldobiurónico. A las fracciones de hemicelulosa que contienen unidades de xilosa y ácido urónico a menudo se les llama xilanas o más generalmente pentosanas, ya que la xilosa es la pentosa más común. La hemicelulosa no presenta porción cristalina, no son fibrosas y tienen un GP promedio de 150 ± 30 .

La lignina se puede definir como un complejo polímero tridimensional formado por unidades de alcohol coniferílico en el caso de las gimnospermas y en el caso de las angiospermas por unidades de alcohol coniferílico y siringílico.

Influencia de la estructura de la fibra y su susceptibilidad a la degradación enzimática.

La susceptibilidad de la celulosa como un sustrato para una conversión enzimática es determinada en gran parte por la accesibilidad que presente a las enzimas extracelulares o a otros metabolitos secretados por los microorganismos celulolíticos. Es necesario que exista un contacto físico entre esos agentes catalíticos y las moléculas de sustrato para que la hidrólisis se lleve a cabo.

Dentro de los aspectos estructurales de los materiales celulósicos que determinan su susceptibilidad a la degradación enzimática, se pueden citar:

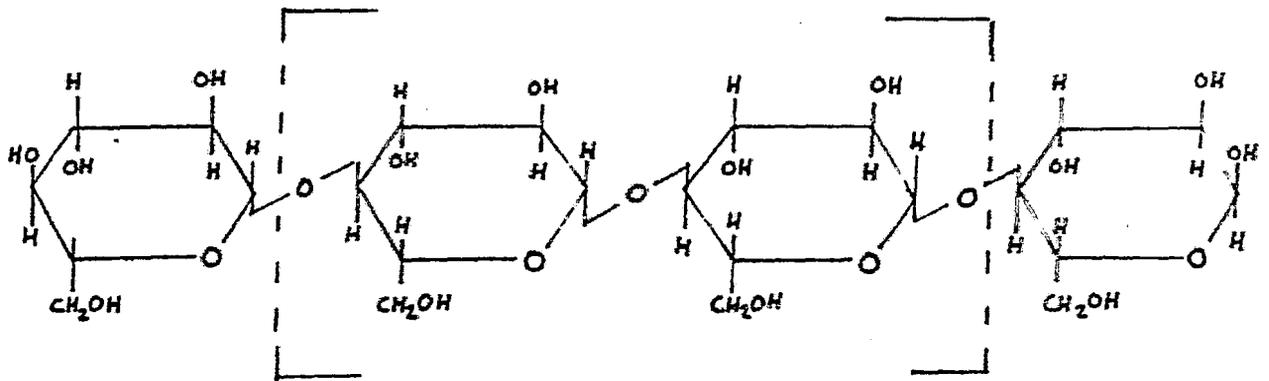
(1) Contenido de humedad de la fibra.

(2) Tamaño y poder de difusión de las moléculas de enzima, su relación al tamaño y superficie disponible de los capilares de las fibras así como los espacios entre las microfibrillas y las moléculas de celulosa en las regiones amorfas.

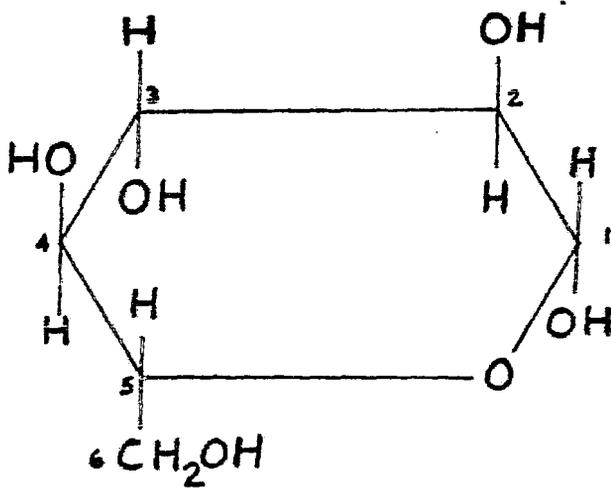
- (3) El grado de cristalinidad de la celulosa.
- (4) Las dimensiones de la unidad celular.
- (5) Conformación y rigidez estérica de las unidades de anhidroglucosa.
- (6) El grado de polimerización de la celulosa.
- (7) La naturaleza de las sustancias con las cuales está asociada la -
celulosa.
- (8) Naturaleza, concentración y distribución de los grupos substituyen-
tes.

Por lo mismo la cristalinidad y la lignificación son los más importantes determinantes de la susceptibilidad que presenten los materiales celulósicos para su conversión enzimática. Así es necesario poner más énfasis en el desarrollo de métodos de pretratamiento efectivos para los materiales celulósicos naturales.

Fig. 2



CELULOSA (beta-1.4)



beta - D - Glucosa

FIG. 3 ESTRUCTURA CRISTALINA DE LA CELULOSA.

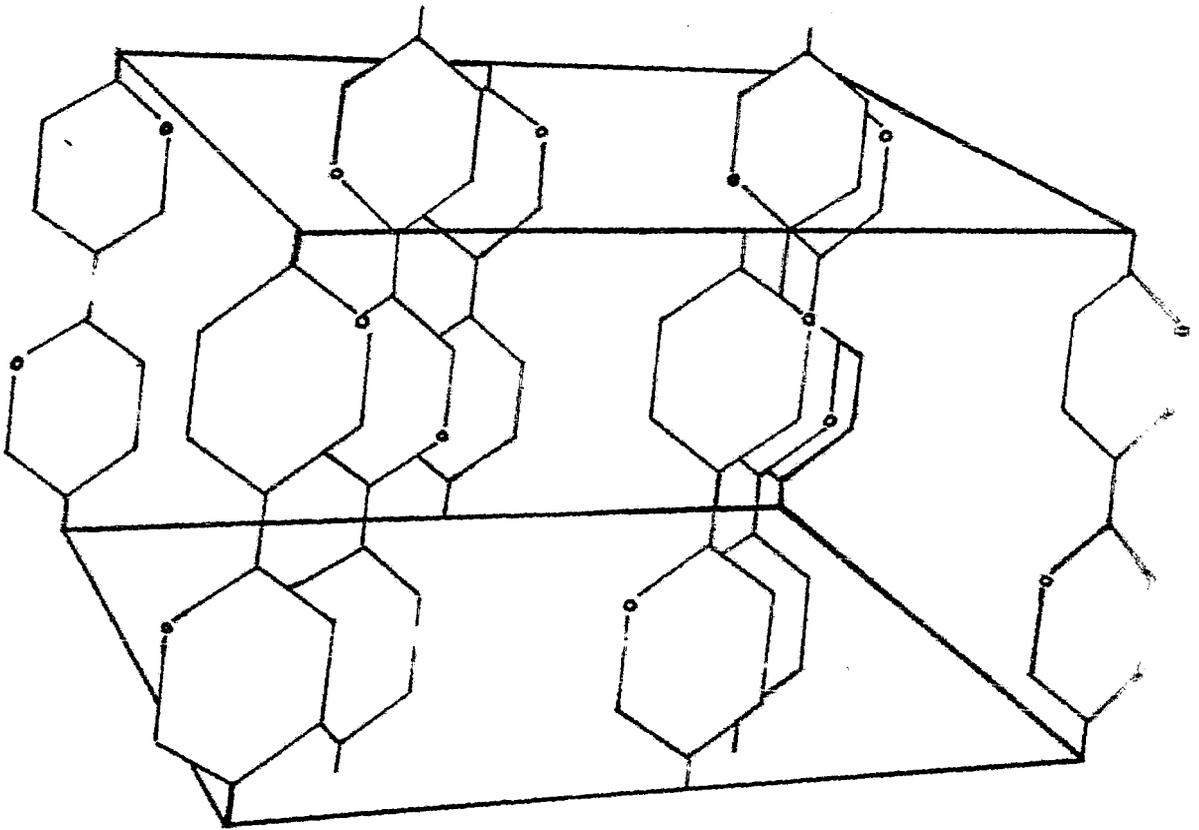
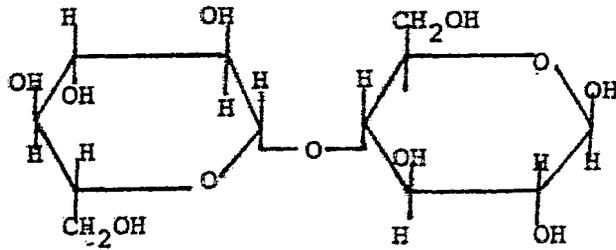
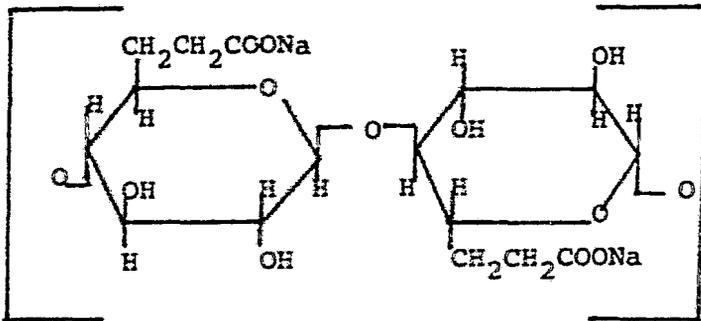


FIG. 4 SÚSTRATOS SOLUBLES.



CELOBIOSA



CARBOXIMETILCELULOSA

Producción de celulasas.

La producción de celulasas en forma económica depende de la selección y caracterización adecuada de cepas y/o del desarrollo de métodos y medios de cultivo de fermentación. Una dificultad comúnmente presente es la baja productividad de los cultivos y el largo tiempo necesario para su crecimiento. Esta baja hiperproducción de las celulasas comparada con la hiperproducción de otras enzimas como las amilasas y proteasas puede ser resultado del mecanismo de inducción particular de las celulasas. La represión catabólica es otro mecanismo regulatorio por medio del cual la concentración de celulasas sintetizadas puede variar.

No se ha encontrado una correlación directa entre la velocidad de crecimiento de un microorganismo y el tipo de actividad celulolítica presente. La razón de contar con un número grande de microorganismos celulolíticos como fuente de enzimas, es que podría ser factible el determinar cual carece de los componentes no deseados o viceversa y existe por lo mismo la posibilidad de modificar las condiciones de crecimiento a favor o en contra de la predominancia de alguno de los componentes en especial ya que se ha visto que algunas enzimas desaparecen durante períodos largos de incubación y también que la adición de algún metabolito o inhibidor puede realizar el mismo efecto. Además mediante el uso de estos procedimientos sería posible eliminar subsecuentes procedimientos de purificación.

Entre los microorganismos que producen celulasas extracelulares el mejor productor reportado es Trichoderma viride, que por lo mismo es el microorganismo con el que se han llevado a cabo la mayoría de los trabajos sobre los diversos factores que afectan la producción de estas enzimas.

Mandels (1975) reportó las condiciones óptimas para la producción de celulasas por este microorganismo usando como sustrato solka flock SW-40, a pH de 5.5 y a una temperatura de 29° C. La mayor actividad de celulasa se encontró a los 15 días aproximadamente siendo ésta de 3.68 mg/ml/hr. La producción de esta actividad se realizó en matraz.

El medio contiene en su formulación sulfato de amonio y urea como fuentes de nitrógeno, los demás minerales son los típicos encontrados en la formulación de medios de cultivo para hongos. La adición de cobalto y calcio no es necesaria para el crecimiento pero se sabe que aumentan la producción de celulasas (Mandels y Reese, 1957). Su acción parece deberse a un efecto de permeabilidad de la pared celular (Reese y McGuire, 1968, 1972).

La fuente de nitrógeno resulta esencial para la producción adecuada de celulasas ya que con una fuente de nitrógeno inorgánica se logra un buen crecimiento, pero si se adiciona proteosa peptona además de la urea como fuentes orgánicas se logra la máxima producción de actividad (Mandels y Weber, 1969; Gupta, 1972). La proteosa peptona es adicionada con el fin de disminuir la fase lag durante el crecimiento del microorganismo y la producción de enzima. Es adicionada generalmente a una concentración correspondiente a un décimo de la concentración de celulosa utilizada.

Un componente que es necesario también tomar en cuenta en la formulación del medio de cultivo para la producción de celulasas es el empleo de agentes surfactantes; Holme y Stranks (1970) establecen que el aumento en la producción de celulasas cuando se utiliza Tween 80 como un componente más del medio de cultivo, palmitato o ésteres de palmitato podría deberse a un lento desarrollo del microorganismo causado por una limitación en

el suplemento de oxígeno ya que el microorganismo es forzado a desarrollarse por medio de un metabolito limitado; otros reportes establecen que la causa de esta acción puede ser debido a un efecto sobre la permeabilidad celular (Reese y MaGuirre, 1969, 1971).

Por lo que uno de los factores que afectan la actividad celulolítica producida de forma primordial es la composición del medio de cultivo (Saddler, 1982).

Otro factor que influye directamente sobre la producción de las celulasas es la variación del pH en el transcurso de la misma, el pH óptimo para el crecimiento de T. viride es de alrededor de 4.0 y el de producción enzimática es de 3.0. Abajo de este pH las celulasas son inactivadas y el crecimiento se detiene abajo de pH 2.0 por lo que el control del pH en el rango de 3-4 es bastante importante para lograr la máxima producción de enzima (Dewey, et al 1980).

Siguiendo el curso de producción de celulasa y el perfil del pH durante la misma en un cultivo en matraz inoculado con esporas es observado que después de una fase lag de 2 días de duración, la enzima comienza a aparecer en el medio de cultivo al mismo tiempo que el pH disminuye rápidamente. El pH permanece alrededor de 2.8 durante la fase de crecimiento y comienza a aumentar después de uno o dos días antes de que la celulosa sea completamente consumida. Los modelos seguidos en la producción de proteína son similares.

Se ha observado que la actividad de beta-glucosidasa permanece baja durante el estadio de acumulación de celulasa y no aparece hasta que el pH comienza a subir. Después de que la celulosa disponible se consume, la

producción de enzima cesa.

Es necesario considerar que la actividad específica de la celulasa es mucho menor que la de otras glicosidasas que hidrolizan sustratos solubles, de esta forma se necesitan grandes cantidades de proteína para liberar azúcares de la celulosa. Debido a que el crecimiento y la síntesis de proteína requieren de que exista hidrólisis enzimática de la celulosa y asimismo la hidrólisis de la celulosa requiere de síntesis de proteína, el crecimiento y la producción de enzima están íntimamente relacionados.

Se llega a represión en el caso de las celulasas cuando la velocidad del catabolismo de los carbohidratos excede al requerido para la biosíntesis celular llegándose en este caso a una disminución o a un paro total de la síntesis de enzima. Tal mecanismo de control se denomina efecto de la glucosa o represión catabólica, la cual es un fenómeno generalizado en los sistemas vivos.

Mientras que la represión catabólica puede explicar la disminución o el cese de la producción de la actividad enzimática, la estabilidad de la actividad celulolítica extracelular se debe a otros factores. Se sabe igualmente que la mayor cantidad de celulasa es producida en el caldo de fermentación después de que la concentración de azúcares reductores residuales cae debajo del nivel crítico de 0.1 mg/ml y cuando el crecimiento alcanza la máxima concentración de células (Dewey, et al 1980).

Se sabe que la glucosa a una concentración del 1% reprime la producción de actividad (Nisizawa, 1972) ya que se ha visto que creciendo al hongo en glucosa, el crecimiento es rápido pero los niveles de enzima extracelular son casi nulos. Si al cultivo se le adiciona glucosa a una concentración del

1% ya sea al inicio o durante cualquier fase de la fermentación, la producción de la enzima se detiene hasta que toda la glucosa es consumida (Mandels, 1975). El papel de la celobiosa como inductor es complejo, pues a bajas concentraciones induce y a otras aproximadamente entre 0.5 y 1% reprime la síntesis (Mandels, 1969). Se ha visto que la lactosa también induce la producción de celulasas; a una concentración de 0.5% se produce aproximadamente un 30% de la actividad producida en celulosa (Mandels, 1975).

Debido a que la celulosa es insoluble y no puede entrar a la célula, se ha propuesto que un producto soluble de la celulosa es el actual inductor (Mandels y Reese, 1959). De acuerdo a esta hipótesis, una pequeña cantidad de celulosa se produce constitutivamente y solubiliza un poco de la celulosa iniciándose el proceso de inducción. Estudios realizados con T. viride establecen que una substancia debe alcanzar el sitio de síntesis enzimática para que sea considerada como inductor y de acuerdo a estos reportes (Mandels y Reese, 1957, 1963), la celobiosa, un dímero producto de la hidrólisis de la celulosa ha resultado en algunos casos el verdadero inductor de estas enzimas. Otros compuestos que poseen enlaces beta-glucosídicos como la lactosa, la salicina y otros oligosacáridos pueden también actuar como agentes inductores aunque se ha visto (Mandels, 1972) que la sacarosa es 200 veces más activa que la celobiosa y se encuentra presente en la glucosa grado reactivo como una impureza. Se presenta también como contaminante en la glucosa preparada por la hidrólisis del almidón.

Otro factor que es necesario considerar en la producción de celulasas es el de la preparación del inóculo ya que desempeña un papel esencial

en la fermentación para la producción máxima de tales enzimas (Saddler, 1982). Una preparación adecuada del material de partida para producción puede reducir el tiempo necesario para el crecimiento de un rango de 5-13 días hasta 4-5 días (Peitersen, 1975; Ghose, 1969). Se ha visto que el uso de inóculos con un tiempo grande de incubación en los que ya es posible detectar actividad celulolítica disminuyen los rendimientos de productividad tal vez debido a que los valores de azúcares iniciales en el caldo de fermentación reprimen la formación de enzima (Mukhopadhyay y Ghose, 1969). Cuando se utiliza un inóculo de esporas, la fase lag existente en la producción de celulasas es muy grande. Esta fase puede ser eliminada inoculando con un 10% del cultivo crecido sobre celulosa por lo que en este caso el inóculo consiste de celulosa y micelio inducido. Con un 10% de inóculo de micelio la producción máxima es lograda a los 4-5 días comparados con 7-8 días cuando se utiliza un inóculo de esporas.

Los métodos utilizados para el cultivo de microorganismos productores de celulasas son :

- (1) Cultivo estacionario en medio líquido.

- (2) Cultivo sumergido en medio líquido.

- (3) Proceso Koji, en el cual el microorganismo es crecido en un medio húmedo sólido, del cual son extraídas las enzimas posteriormente.

Se ha producido celulasa tanto en lote (Mandels, 1975) como en forma con tínua (Mitra, 1975). A pesar de las ventajas potenciales que ofrece el cultivo continuo, a la fecha los resultados han sido poco satisfactorios debido principalmente a que se taponan con micelio los conductos de entrada y

salida (Mandels, 1975).

La producción de enzima en fermentaciones en lete se ve favorecida cuando son utilizadas altas concentraciones de celulosa en el medio de cultivo y la fermentación se realiza bajo condiciones de riguroso control del pH, temperatura, etc utilizando para ese fin fermentadores automatizados (Joglekar, et al 1983).

Actualmente las celulasas son producidas por métodos de cultivo de superficie pero el alto precio de las enzimas limita su utilización en la industria biotecnológica. Los trabajos recientes desarrollados para llevar a cabo la producción industrial de celulasas utilizando fermentación sumergida han sido probados únicamente a nivel piloto ya que la producción no resulta económica, pero el actual desarrollo dentro de esta área en lo que respecta a nuevos cultivos o bien la optimización de los procesos existentes pueden ayudar a resolver el problema en un futuro cercano (Enari y Markkanen, 1977).

Los componentes del medio de cultivo que resultan importantes desde el punto de vista económico son la fuente de nitrógeno y la fuente de carbono.

Se ha obtenido buen crecimiento de T. viride con nitrógeno inorgánico, pero una buena producción de enzima se realiza sólo con peptona u otras fuentes de nitrógeno orgánico, las cuales por lo general resultan muy costosas. Reciclando el micelio se podría reducir el costo de producción alrededor de 10% ya que se podría reemplazar parcialmente la fuente de nitrógeno (Nystrom y Allen, 1976) y se lograría un tiempo de fermentación corto. Con respecto a la fuente de carbono algún material celulósico de desecho podría ser utilizado, pero sería más ventajoso si no se utilizaran -

pretratamientos físicos o químicos. Es posible mencionar a manera de ejemplo que una celulasa de T. viride con una actividad de 1.01 U/ml capaz de producir de 23 a 307 toneladas de azúcar requiere de una cantidad de material celulósico de desecho que va de 52 a 429 toneladas.

También se ha intentado mejorar la producción de celulasas por medio de la selección de nuevas cepas y de mutagénesis de las ya existentes (Montencourt, 1977; Bailey, 1981; Nevalainen, 1981) y por la optimización de los medios de cultivo así como de las condiciones de fermentación (Mandels, 1976; Stenberg, 1979; Vilela, 1977).

Por todo lo anteriormente expuesto es necesario continuar el desarrollo para la obtención de cultivos adecuados para tales procesos de hidrólisis así como a la optimización propia del proceso con el fin de lograr la utilización de la enorme cantidad de materiales celulósicos de desecho disponibles como sustratos potenciales para la industria de fermentación.

TABLA 3. Mecanismos bioquímicos que controlan la síntesis de celulasas y su actividad en T. reesei.

ENZIMA	Producto final inhibidor.	Represor	Inductor
Celobiohidrolasa	Celobiosa	Glucosa o metabolitos de la glucosa.	Celulosa
Endo-glucanasa	Celobiosa	"	Soforosa.
Celobiasa	Glucosa	"	Celobiosa.

Ref. Montenecourt, B. S. and Eveleigh, D. E. (1979).

Ensayos utilizados para medir la actividad de las celulasas.

La determinación de la actividad de las enzimas celulolíticas es complicada debido a la gran cantidad de sustratos celulósicos así como a la multiplicidad de las enzimas presentes en el sistema celulasa ya que es necesaria la acción sinérgica de las mismas para lograr niveles significativos de hidrólisis. Los sustratos utilizados son en su mayoría macromoléculas lo cual hace que resulte difícil su estandarización. El sustrato ideal podría ser aquel de bajo peso molecular además de que fuera lo suficientemente específico, desafortunadamente sólo para el caso de la beta-glucosidasa el sustrato reúne tales características.

Existen principalmente tres tipos de ensayos: (1) Los basados en la determinación de la viscosidad de las soluciones de los derivados solubles de celulosa (CMC, HEC) durante la reacción enzimática (Husemann y Werner, 1963; Ericksson, 1969; Hulme, 1971; Almin, et al 1975; Guignard y Pilot, 1976).

(2) Ensayos en los que se sigue el incremento del poder reductor durante la reacción enzimática hacia carboximetilcelulosa por medio de la determinación de azúcares reductores (Shoemaker y Brown, 1978; Wood y McCrae, 1977; Mandels, et al 1975).

(3) Por medio del poder reductor como el punto anterior pero utilizando sustratos celulósicos insolubles, no substituidos (Mandels, et al 1975; Shoemaker y Brown, 1978).

Los ensayos viscosimétricos son muy sensitivos y específicos para las enzimas de tipo endo y han sido aplicados para monitorear la actividad

de otras endo-polisacaridasas (Desveaux y Percheron, 1973).

Los métodos que basan su determinación en el aumento del poder reductor miden tanto la actividad celulolítica endo como exo. En estos procedimientos las propiedades químicas y físicas de los sustratos utilizados pueden eventualmente conferir alguna especificidad a la prueba enzimática. De esta forma, la CMC soluble resulta ser adecuada para el ensayo de la actividad de endoglucanasa mientras que los sustratos insolubles como el algodón y el papel filtro son adecuados para la determinación en conjunto de las actividades endo y exo.

La dificultad en desarrollar métodos para detectar las actividades en forma individual es que es necesario conocer cuales enzimas son las responsables de la degradación de la celulosa completamente, por lo que sería necesario para el desarrollo de tales métodos una gran cantidad de datos bioquímicos así como de técnicas específicas para cada caso. En la tabla 4 se puede observar la gran variedad de ensayos existentes para la determinación de la actividad celulolítica.

Determinación de la actividad celulolítica total.

En todas las determinaciones de la actividad celulolítica, el sustrato debe ser semejante al utilizado para un proceso práctico de hidrólisis de materiales celulósicos; por ejemplo: debe de ser un material insoluble que no sea fácil de hidrolizar, debe ser un material que pueda ser estandarizado. Otro factor importante que es necesario considerar es el tiempo de reacción, dado que el sustrato es un material insoluble fibroso por lo que es necesario considerar el tiempo requerido para que la enzima pueda difundir

dentro de la fibra así como también el necesario para que los productos de hidrólisis difundan al exterior de la misma. Otra dificultad presente es la variación de la accesibilidad a los enlaces glucosídicos en diferentes regiones de la fibra, por lo que para lograr un resultado adecuado; los ensayos requieren de un tiempo de reacción suficientemente largo para permitir la hidrólisis de una fracción apreciable de los enlaces menos accesibles al ataque.

El ensayo que resulta bastante satisfactorio para medir el sistema completo es el de papel filtro, además de que es bastante reproducible y se realiza en un tiempo corto. Por lo mismo este método es adecuado en el caso de que se pretenda determinar niveles de producción enzimática para la selección de nuevas cepas, mutantes o bien en fermentaciones monitorizadas.

También es posible establecer que la actividad en papel filtro se encuentra asociada a la actividad de beta-glucosidasa (Joglekar, 1983). Por lo mismo, el papel filtro ha resultado ser un sustrato satisfactorio para medir la actividad celulolítica total y el ensayo está basado sobre la reacción de las enzimas solamente sobre las regiones más susceptibles del sustrato.

Además, la actividad de exo-beta-D-glucanasa medida por la hidrólisis de papel filtro representa una de las formas más convenientes para poder establecer la utilidad de una preparación celulolítica para una sacarificación práctica.

Con respecto a las endoglucanasas es posible mencionar que el mejor sustrato para la medida de su actividad es el derivado soluble de la celulosa, la CMC. Este sustrato ha sido empleado tanto para medir la disminución de la viscosidad o bien para la producción de azúcares reductores.

pero las enzimas sólo rompen los enlaces entre unidades de glucosa no substituídas siendo la hidrólisis lineal sólo en un 12% (Mandels, et al - 1969). La presencia de las exo-glucanasas no afecta este ensayo por lo mismo resulta adecuado para la evaluación de preparaciones crudas.

Para la determinación de la beta-glucosidasa existen pocos problemas ya que esta enzima hidroliza tanto a la celobiosa como a los beta-1,4 - oligosacáridos hasta glucosa. Por lo general es determinada utilizando a la celobiosa como sustrato (Selby y Maitland, 1971) pero puede utilizarse también un pseudosustrato, el para-nitrofenil-beta-glucósido (Wood, 1968).

TABLA 4. ENSAYOS PARA MEDIR ACTIVIDAD
DE CELULASAS

ENZIMA	SUSTRATO	PRODUCTO MEDIDO.
CELOBIASA beta- glucosidasa	celobiosa celodextrinas salicina p-Nitrofenil-beta glucósido	glucosa saligenina p-Nitrofenol
ENDO-beta-1,4 GLUCA- NASA. Cx CMC'asa	carboximetil celulosa celulosa amorfa. celulosa Walseth celodextrinas.	disminución de viscosidad. azúcares reduc- tores.
EXO-beta-1,4 GLUCA- NASA. Glucocelulasa Celobiohidrolasa CBH C ₁	celulosa amorfa celulosa Walseth celulosa cristalina Avicel celodextrinas	glucosa celobiosa
CELULASA C ₁ + C _x Avicelasa Hidrocelulasa PF'asa	celulosa cristalina Avicel Hidrocelulosa papel filtro	pérdida de peso azúcares reductores reducción en la D.C azúcares reductores
MISCELANEOS Factor de hin- chamiento. celulasa	algodón papel filtro hilo celulosa teñida	absorción de álcali maceración. pérdida de resis <u>ten</u> cia. pérdida de color.

Sacarificación enzimática de la celulosa.

Se han hecho varios intentos para desarrollar una metodología que permitiera efectuar el escalamiento del proceso de sacarificación, pero existen varios factores que es necesario mejorar o cambiar antes de llevarla a cabo, entre ellos figuran los ya mencionados anteriormente pero además entre los más relevantes es posible mencionar los siguientes:

a). -Insolubilidad del sustrato.

b). -Suspensiones de celulosa a bajas concentraciones: uno de los mayores problemas que se presentan para lograr una buena eficiencia en la conversión de la celulosa, es lograr una suspensión inicial adecuada; se sabe que no es posible obtener una suspensión arriba del 5-10% y aún esta suspensión resulta muy espesa.

c). -La velocidad de hidrólisis disminuye cuando se alcanza cierto grado de hidrólisis; se ha visto en bagazo que ésta se retarda alrededor de un 30% de hidrólisis y llega a ser casi cero cuando se llega al 70% de hidrólisis, parece ser que este efecto es causado por una disminución de la susceptibilidad del sustrato causada por removimiento de la región lábil y no por la inactivación o inhibición del producto como se pensaba (García Martínez, et al 1974).

Comparación entre la hidrólisis enzimática y la hidrólisis ácida.

La hidrólisis de celulosa puede llevarse a cabo por la acción de ácidos o con enzimas obtenidas de los microorganismos celulolíticos. Las enzimas resultan más eficientes que los ácidos. Un estudio comparativo efectuado con tres sustratos celulósicos (CMC, celulosa Walseth y fibras de algodón) demostró que alrededor de 10^5 más cantidad de ácido es necesaria para lograr

el mismo grado de hidrólisis comparado con las enzimas (Reese, 1956). A nivel molecular es mayor la disparidad entre los dos métodos, ya que el peso molecular del HCl es 36 y el de una celulosa de aproximadamente 63 000 por lo que alrededor de 10^8 moléculas de HCl son necesarias para efectuar el trabajo de una simple molécula de enzima bajo condiciones definidas (Whitaker, 1954).

De igual forma, la hidrólisis enzimática es una reacción más específica ya que el ácido ataca enlaces 1,4;1,6;1,2 o 1,3 y las enzimas celulolíticas conocidas actúan únicamente sobre los enlaces beta-1,4 (Lin, 1967).

Los datos publicados sobre la hidrólisis son insuficientes ya que el mecanismo bioquímico aún es oscuro. De acuerdo a los reportes del modelo cinético de la hidrólisis de la celulosa parece no tomarse en cuenta la inhibición por producto existente. Varios trabajos sugieren que el grado de hidrólisis varía de acuerdo al tiempo de contacto entre las celulasas y la celulosa (Flora, 1964; Dixon y Webb, 1958). También ha sido mencionado que la velocidad de hidrólisis decrece cuando aumenta la cristalinidad del sustrato.

Una prueba entre la diferencia existente entre el mecanismo de la hidrólisis ácida y enzimática de la celulosa es que esta última causa una menor velocidad de despolimerización que la hidrólisis ácida. La razón más probable de tal diferencia parece estar relacionada con el tamaño relativo de los dos catalizadores y su capacidad de lograr permear la fina estructura de la celulosa. Moléculas largas (P.M. 25 000 - 67 000) son necesarias para penetrar dentro del espacio intercristalino existente y sólo a la gran

actividad catalítica presente, todas las cadenas de celulosa que puedan estar en contacto con la molécula de enzima son rápidamente hidrolizadas hacia azúcares solubles. Por otro lado, las relativamente pequeñas moléculas de ácido capaces de difundir dentro de los espacios reducidos de la porción intercrystalina pueden atacar enlaces glucosídicos que no se encuentran accesibles para las moléculas de enzima. Además la hidrólisis enzimática ofrece otro tipo de ventajas, como son:

La enzima hidroliza específicamente los enlaces beta-1,4 mientras que el ácido ataca todos los tipos de enlaces glucosídicos aún los de otros tipos de polisacáridos asociados a la celulosa.

Son necesarias altas temperaturas y altas concentraciones de ácido para que se pueda realizar la hidrólisis y se producen sustancias tóxicas por lo que los productos derivados de ella no serían útiles para fines alimenticios, ni aún para el inicio de otras fermentaciones.

En la tabla 5 se pueden observar las diferencias más significativas entre los dos tipos de hidrólisis.

TABLA 5. Tabla comparativa entre las diferencias existentes entre la hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática de materiales celulósicos.

	HIDROLISIS ACIDA	HIDROLISIS ENZIMATICA.
Pretratamiento	Puede ser necesario.	Necesario.
Velocidad de hidrólisis.	Rápida (minutos)	Lenta (horas).
Temperatura	Alta (200° C)	Baja (45° C).
Presión	Presurizada.	Presión atmosférica.
Productividad	Varía dependiendo del material utilizado y características del proceso.	Varía dependiendo del material utilizado y características del proceso.
Interferencia por productos.	Probablemente.	No necesariamente.
Proceso industrial utilizado actualmente.	Sí, (Unión Sovietica)	No, (sólo en planta piloto).
Factibilidad económica.	?	?

Ref. Linko, M (1975).

Pretratamientos utilizados para incrementar la sacarificación enzimática de la celulosa.

La celulosa nativa, es muy resistente a la hidrólisis enzimática; la estructura cristalina y la presencia de la lignina la protegen de forma efectiva contra el ataque de las celulasas, haciendo que el proceso de hidrólisis sea lento e incompleto. Para realizar un proceso hidrolítico práctico, es necesario tratar al material celulósico de alguna forma previa al uso por las enzimas.

Se ha visto que la velocidad y extensión de la sacarificación depende de la naturaleza y el pretratamiento dado al sustrato, así como de otros factores como la concentración de enzima y sustrato respectivamente (relación enzima/sustrato), inhibición por producto y estabilidad enzimática.

Ha sido posible obtener hidrolizados realizados a pequeña escala con rendimientos de hasta 30% de glucosa utilizando para ello concentraciones de enzima y sustrato pretratado (molido en un molino de bolas) elevadas (50%), así como un tiempo de reacción largo (14 días) (Katz y Reese, 1968).

Hasta ahora, la concentración de sustrato que ha resultado más económica es cercana al 10% (Toyama y Ogawa, 1975).

La mayoría de los sustratos utilizados en sacarificación requieren de un pretratamiento, se sabe que el molido en un molino de bolas reduce la talla de partícula incrementando la capacidad de hacer suspensiones de celulosa a altas concentraciones y también la superficie reactiva disponible para el ataque enzimático.

Los pretratamientos de los materiales celulósicos se encuentran orientados a lograr una pérdida de la estructura altamente cristalina de la celulosa y su posible extensión a las zonas amorfas; así como a la remoción de la lignina que resulta un paso esencial ya que la mayoría de los sustratos potenciales para ser usados en un proceso de bioconversión se encuentran bastante lignificados.

El aspecto esencial de un pretratamiento es lograr disminuir la asociación protectora entre la lignina y la celulosa, aunque se sabe también que no es necesario remover o alterar toda la lignina para lograr aumentar en forma significativa la susceptibilidad al ataque enzimático, aunque esto depende en gran parte del material celulósico en cuestión, pero parece ser que existe un rango del 20 a 65% de lignina que tiene que ser alterada para lograr aumentar en forma significativa los rendimientos.

En la tabla 6 se agrupan los métodos de pretratamiento más utilizados para tratar de aumentar la susceptibilidad a la hidrólisis de los materiales celulósicos y de acuerdo a esto puede decirse que existen tres tipos principales: los químicos

los físicos

o los biológicos.

Tratamientos químicos.

El tratamiento de celulosa nativa con soluciones de sosa arriba del 17% causa un hinchamiento extenso y separación de los elementos estructurales produciéndose fibras con diferente grado de cristalinidad. La celulosa tratada con álcali es hidrolizada por ácido un 40% más rápido que si se utiliza celulosa nativa (Millet, et al 1975). Otro tipo de pretratamiento que se ha incluido recientemente en este grupo lo constituye el de un tratamiento a alta presión de vapor, aunque no involucra por sí mismo una reacción de tipo químico, el rompimiento de los grupos acetilo que se logra hace que ocurra una acidificación del medio lo cual favorece la acción hidrolítica.

Los métodos convencionales de pulpeo tales como los procesos kraft y sulfito son tratamientos que entran dentro de esta clasificación, pero resultan muy costosos por lo que se ha pensado en otras posibilidades entre las que figuran:

Tratamiento gaseoso con dióxido de azufre, el cual no remueve la lignina pero incrementa marcadamente la digestibilidad.

Alcoholólisis de la lignina con metanol o etanol usando pequeñas cantidades de ac. clorhídrico, sulfúrico o fosfórico.

Extracción de la lignina con acetona, dioxano u otros solventes orgánicos en presencia de los mismos ácidos.

Lisis de la lignina bajo condiciones de ácidos débiles.

Pulpeo hidrotrópico con sales como benzoato de sodio o sulfonato de xileno.

Pulpeo con ac. nítrico,

Pulpeo con oxígeno y álcali en una sola etapa.

Con respecto al empleo de los ácidos es posible decir que existen limitantes en lo que se refiere a su uso ya que además de resultar costoso, el material tiene que ser lavado y neutralizado posteriormente, lo que ocasiona pérdida del material y da lugar a problemas asociados con la disposición del desecho como a efectos de toxicidad.

Tratamientos físicos,

La velocidad de hidrólisis de la celulosa está en función del área de superficie accesible a la enzima. Reduciendo la talla de partícula se puede exponer mayor superficie para el ataque por las enzimas.

La celulosa molida y calentada pierde su carácter cristalino natural casi completamente y se logra aumentar la susceptibilidad al ataque enzimático. (Katz y Reese, 1968). Una explicación de este efecto es que hay una superficie de exposición mayor debido al efecto de molido, al mismo tiempo que se produce un efecto combinado con los cambios oxidativos producidos por el calentamiento con lo cual se logra un aumento en la velocidad de hidratación del sustrato asociada con el incremento en su solubilidad (Ghose, 1969). Han y Callihan (1974) estudiaron el efecto del tamaño de partícula sobre la digestión del bagazo de caña y encontraron que cuando el tamaño de partícula fué reducido debajo de 60 mallas, la digestibilidad aumentaba notablemente pero concluyen que el molido no resulta económicamente práctico para la producción a gran escala.

El molido es efectivo para sustratos altamente cristalinos y bastante lignificados siempre y cuando el tamaño de partícula sea lo suficientemente

adecuado. Pero el inconveniente de este proceso radica en que utiliza mucha energía y por lo mismo es muy costoso.

Ahora bien, el efecto de la temperatura también ha sido estudiado a este respecto; el simple calentamiento de la celulosa a 200°C utilizando keroseno o aire seco aumenta también la velocidad de hidrólisis de los materiales celulósicos. Pero considerando que es necesario un período de calentamiento de cuando menos 30 hrs para lograr un aumento de velocidad de hidrólisis de alrededor de 35% y una producción de azúcares incrementada sólo un 25%, el tratamiento térmico deja de ser interesante para fines comerciales.

La radiación es otra clase de pretratamiento que se ha pensado podría ser empleado, rompe las moléculas de polisacárido, sin embargo a dosis altas ocasiona que los costos se eleven más para su posible aplicación industrial (Millet, et al 1975), ya que la velocidad de hidrólisis de celulosas altamente resistentes a la misma se incrementa marcadamente mediante reacciones arriba de 10^7 roentgens, lo que implica un costo cercano a 150 dólares por tonelada de sustrato.

Tratamientos microbiológicos y/o enzimáticos.

La delignificación biológica de la celulosa, es una posibilidad interesante de realizar; se han hecho intentos por este medio con el fin de descomponer la lignina e incrementar la digestibilidad del material pero los resultados obtenidos no han sido convincentes (Kirk y Moore, 1972; Han, et al 1975 b).

En la naturaleza, la madera es descompuesta por los hongos llamados de la pudrición de la madera, pertenecen a la familia de los Basidiomicetos.

Sobre la secuencia exacta de las reacciones necesarias para la solubilización y/o depolimerización, sólo se conoce algo al respecto: pero -

estudios recientes indican que la degradación llevada a cabo por los hongos de la descomposición de la madera implica tanto oxidación de las cadenas laterales como un rompimiento oxidativo del núcleo aromático del polímero.

Sin embargo, un pretratamiento natural conocido, es el realizado durante la formación y descomposición de la turba. La lenta, pero natural descomposición de este material, hace que la celulosa y hemicelulosa se vuelvan más susceptibles a la acción de la hidrólisis enzimática sin que sea realizado pretratamiento alguno. En este caso, los factores económicos dependen de dos elementos opuestos ya que la descomposición de la turba hace que la hidrólisis sea fácil de realizar pero también ocasiona una pérdida de celulosa y hemicelulosa.

TABLA 6

METODOS DE PRETRATAMIENTO UTILIZADOS PARA AUMENTAR
LA SUSCEPTIBILIDAD ENZIMATICA DE MATERIALES CELULOSICOS.

TIPO	VENTAJAS	DESVENTAJAS.
FISICO:		
Molino de martillos.	Poco costoso.	No es efectivo.
Molino coloidal.	Mejor manejo.	
Molino de bolas.	Efectivo.	Gasto de energfa intenso.
Molino de rodillos.	Se logra alta concentración en las suspensiones.	Costosa.
EXPLOSION DE VAPOR.		
220-240°C 600 lbs/psi ²	Efectiva y poco costosa.	Se logran bajas concentraciones en las suspensiones. No es efectiva para maderas blandas.
HINCHAMIENTO EN ALCALI.		
(NaOH)	Moderadamente efectivo y poco costoso.	Bajas concentraciones en las suspensiones. Se debe lavar a neutralidad.
DELIGNIFICACION:		
Pulpeo Químico.	Moderadamente efectivo.	Costoso, baja concentración en las suspensiones. Contribuye a la polución.
Biológica.	Ahorro de enzima y espacio en el reactor.	Lenta.
DISOLUCION Y PRECIPITACION:		
Hidracina. Tartrato férrico. Sosa. Cuproamonio. Acido concentrado.	Efectivo.	Baja concentración en las suspensiones. Costoso. Dificultad de manejo. Polución.

Obtención de cepas hiperproductoras de celulasas por mutagénesis

Mediante la obtención de cepas mutantes se ha logrado incrementar la actividad de celulasa, los reportes existentes sobre la producción de mutantes productoras de celulasas en las que se ha logrado incrementar la secreción de enzima han sido en Neurospora crassa y Trichoderma viride (Myers, et al 1966 y Mandels, 1971) .

Neurospora crassa posee un gene regulatorio para la actividad hacia cellobiosa y CMC (Myers, 1966) que es distinto del gene regulatorio para la actividad de beta-glucosidasa aunque se encuentran presentes los tres tipos de actividades en la cepa original (Jurasek, 1967). En el caso de T. viride los incrementos iniciales logrados en la producción enzimática fueron logrados optimizando las condiciones del cultivo (Reese, 1969), pero incrementos posteriores se consiguieron con la obtención de mutantes a partir de la cepa original QM6a (Mandels, 1971) mediante irradiación de conidias con un acelerador lineal designándose a la cepa obtenida como QM 9123 la cual produjo el doble de actividad en comparación a la cepa original. Un posterior tratamiento de esta cepa dió lugar a otra mutante, la QM 9414 con niveles de producción enzimática mucho más altos. (Mandels, 1971, 1972). Esta mutante posee además la capacidad de producir altos niveles de protefina la cual es rápidamente excretada al medio de cultivo. En la tabla 7 es posible observar la procedencia de todas las cepas de Trichoderma viride.

Ahora bien, la síntesis de las celulasas es controlada por un mecanismo de inducción y represión catabólica. Las celulasas son un complejo inducible de enzimas en Trichoderma viride (Nisizawa, et al 1971; Mandels, 1957; Mandels y Reese, 1959), pero ha sido reportada como constitutiva en Pseudomonas -

fluoresens (Suzuki, 1975).

La razón de que sólo tres a cuatro veces haya sido posible incrementar la síntesis de celulasas en el caso de Trichoderma viride puede ser un índice de la carencia de un sistema de inducción para las celulasas (Stenberg, 1975; Mandels, et al 1971). Otra razón podría ser la cantidad de proteína enzimática necesaria para la realización de la hidrólisis de la celulosa. Los microorganismos hiperproductores secretan alrededor de 2 mg/ml de proteína (Nisizawa, et al 1972) lo cual es un criterio suficiente para eliminar la posibilidad de que ésta sea aumentada varias veces.

La celulosa es convertida principalmente a celobiosa y glucosa durante la hidrólisis enzimática; por lo que la celobiosa estimula la producción de celulasas si el crecimiento del hongo se encuentra restringido por el cultivo bajo condiciones subóptimas (Mandels y Reese, 1959) por lo que ha sido asumido que la celobiosa es en algunos casos el inductor natural para la síntesis de la celulosa. Pero, el inductor más eficiente hasta ahora conocido es la soforosa.

La soforosa, no es un producto de la degradación de la hidrólisis enzimática por lo que no representa un inductor natural ya que de otra forma debería de ser sintetizado durante la fase de inducción.

Las mutantes obtenidas con T. viride son representativas de un grupo de mutantes en las cuales las características fisiológicas en cultivo sumergido no son paralelas a las obtenidas en placas de agar (Montnecourt y Eveleigh, 1979). La cepa mutante NG 14 es sólo parcialmente resistente a represión catabólica, la cepa C 30 aislada por mutagénesis de la NG 14 es resistente a represión catabólica y produce casi la misma actividad en el pel filtro en presencia de glicerol al 5% como cuando es crecida únicamente

sobre celulosa. Es resistente a represión catabólica hasta concentraciones de 5% de glucosa. Ambas cepas, la C 30 y la NG 14 muestran un incremento de alrededor de 15 a 20 veces en la actividad celulólitica si son comparadas con la cepa salvaje (Andreotti, 1980) de igual forma producen alrededor de 20 mg/ml de proteína extracelular.

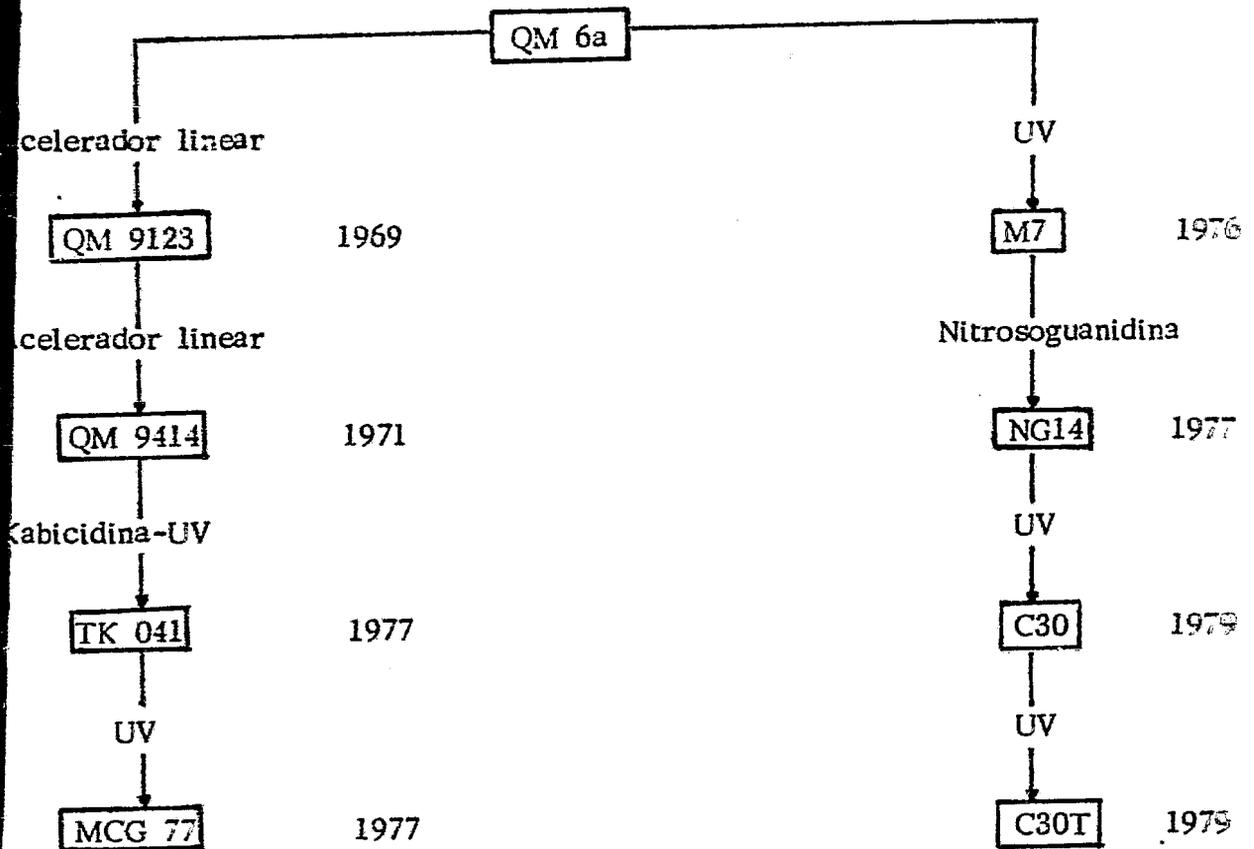
Stenberg (1975) establece cuales podrían ser los criterios a seguir en el caso de la realización de estudios sobre mutagénesis : Selección de mutantes controladas, tales como las que podrían estar presentes en productores constitutivos de celulasas.

Mutantes que reduzcan al mínimo la producción de otras proteínas que no sean celulasa, permitiendo mayor cantidad de precursores proteicos para la producción de estas enzimas.

Mutantes que hiperproduzcan algún componente del sistema celulasa en especial, con lo que podría obtenerse posteriormente un complejo enzimático más activo por la mezcla de diferentes filtrados de cultivo.

TABLA 7

Trichoderma reesei



Procedencia genética de las mutantes celulolíticas de *T. reesei*, in-

dicando el año de su aislamiento.

Ref. Montencourt, B. S. and Eveleigh, D. E. (1979)

Aplicaciones de las celulasas.

Aunque son varias las posibles aplicaciones de las celulasas, aún no existe un mercado mínimo en comparación a otras enzimas, pero la mayoría de éstas sería en áreas alimenticias y farmacéuticas, por lo que las aplicaciones de las celulasas pueden ser divididas en dos clases:

a) El uso directo en procesamiento de alimentos o en preparaciones alimenticias para animales, en procesos farmacéuticos y también en el control de la polución.

b) Hidrólisis de la celulosa para tener sustratos disponibles para otras fermentaciones con lo cual sería posible obtener una gran variedad de productos (Gaden, 1976).

Por lo general algunos usos mencionados para las celulasas se vienen aplicando en Japón, los otros usos potenciales aún no son aplicables ya que a la fecha no resultan económicos.

Dentro de las posibles aplicaciones potenciales de las celulasas y las que se les dan actualmente se pueden mencionar:

Procesamiento de alimentos:

__ Aumentar digestibilidad.

__ Producción de vegetales unicelulares.

__ Extracción de aceites, jugos, proteínas y saborizantes de frutas y vegetales.

__ Remover la cubierta de la semilla del frijol de soya.

__ Recuperación del agar.

__ Tratamiento de los granos de arroz para producción de sake.

__ Para lograr mayor solubilización de las materias primas en la elaboración de cerveza.

Alimentos Animales:

__ Aumentar la digestibilidad del forraje.

__ Procesamiento de los residuos de la madera como alimento.

Farmacéuticos:

__ Ayuda digestiva.

__ Eliminación de fibras indeseables.

Control de la Polución:

__ Digestión de residuos de excreción en fosas sépticas y drenaje.

__ Disminución de los desechos sólidos en los depósitos municipales.

Fermentación:

__ Producción de azúcares solubles para la síntesis de metano, etanol, glicerol, ac. cítrico, ac. láctico, vitaminas, antibióticos, proteína unicelular, etc.

Celulasas Comerciales.

Desde 1961, se producen industrialmente preparaciones enzimáticas a partir de T. viride y A. niger. De las dos, sólo la celulasa de Aspergillus está aprobada para fines de elaboración de alimentos.

La celulasa de A. niger contiene sólo pequeñas cantidades de exoglucanasa ya que en su mayoría está compuesta de endoglucanasas que tienen la propiedad de reducir rápidamente la viscosidad de gomas de celulosa soluble.

Esto ayuda en el incremento de las velocidades de filtración cuando son procesados diferentes materiales de origen vegetal.

La celulasa de T. viride ha encontrado aplicaciones en la industria procesadora de desperdicios, aquí formas altamente ordenadas de celulosa pueden ser reducidas a azúcares simples para ser utilizados por los microorganismos presentes en los mismos.

Las principales compañías manufactureras de celulasas son: Kinki Yakult Co Ltd, Nishinomiya factory, la cual produce la celulasa Onozuka a partir de T. viride y la PAN-celulasa BR también a partir de este microorganismo que es utilizada para la elaboración de sake; Agent Zennion Seikagaku Co Ltd, Nishinomiya factory, que produce Macerozyme a partir de Rhizopus sp; Meiji Seika Kaisha Ltd que produce la llamada Meicelasa a partir de T. viride para usos farmacéuticos. Ueda Chem Ind Co Ltd que produce la Cellosina a partir de A. niger que tiene diversos usos. (Toyama, 1970).

En los Estados Unidos de Norteamérica, Rohm & Hass Co, que produce celulasa a partir de T. viride, con fines farmacéuticos; Miles Laboratories - que produce una enzima bastante pura utilizando T. viride, esta enzima es el principal componente de una celulasa industrial desarrollada por Meiji-sika Kaisha Ltd (Faith W. T., et al 1971)

Las compañías alemanas Rohm & Hass, Boeniger Manheim producen celulasas para uso farmacéutico y mejoramiento de alimentos. De hecho han desarrollado un proceso basado en la separación de células por acción enzimática para producir pureé de zanahoria casi libre de fibras.

En el reino Unido la compañía ABM Ltd produce celulasas con fines farmacéuticos. (Faith, 1971).

El bagacillo de caña de azúcar como modelo de material celulósico.

Los materiales celulósicos son sintetizados en la naturaleza a razón de 70×10^9 toneladas anualmente (Reese, et al 1972). La suma de la cantidad de los materiales fibrosos de las plantas en el mundo es muy alta encontrándose entre los más importantes el bagazo de caña y algunas pajas, que corresponden a la clasificación de residuos agrícolas. En la tabla 8, es posible apreciar la disponibilidad de tales materiales.

Sóloamente en México, durante 1981 se produjeron 10 097.7 miles de toneladas de bagazo procedente de la extracción de azúcar con un 35.2% de caña molida (SPF, 1982). Aunque el bagazo se ha utilizado en la producción de energía y de pulpa de celulosa, el bagacillo en general es subutilizado, en el acondicionamiento de la fibra de bagazo para obtener pulpa, se producen aproximadamente 80 000 toneladas anuales de bagacillo.

Los usos que se le han dado al bagazo de caña en nuestro País, son entre otros: a) Elaboración de papel, en el cual participa sólo la fibra que es de mayor tamaño de partícula que la médula.

b) Obtención de furfural : parte del bagacillo es sometido a un proceso ácido para la obtención de furfural, el cual es un producto de los pentosanos que forman la hemicelulosa.

c) Como combustible : produciendo la tercera parte de energía, en comparación con el aceite, teniéndose que hacer uso de hornos especiales. Este es el uso que a la mayor parte del bagazo que se produce en un lugar se le da.

d) Forraje : mezclado con melazas.

e) Usos diversos : obtención de alfa-celulosa, plásticos y como acondicionador de suelos.

Dentro de los productos derivados de la fibra de bagazo figuran: la pasta de papel, tabla prensada y aislante, cartón y papel para corrugar así como el furfural. De hecho, sólo el 10% del bagazo producido es usado comercialmente, el resto se quema como combustible en los hornos de los ingenios según sea la eficiencia térmica de cada uno en particular, pero el promedio es de un 70% del bagazo el que se quema. Es importante resaltar que los objetivos perseguidos en la molienda de la caña además de la extracción de la mayor cantidad de sacarosa, otro es entregar del último molido, bagazo tan seco que pueda ser quemado eficientemente en las calderas del ingenio (UNPASA, 1978). Pero este uso, resulta muy poco eficiente puesto que una libra de bagazo produce generalmente 2.4 lbs de vapor a la presión usual de las fibras de azúcar. Una libra de petróleo para quemar, puede producir 14 lbs de vapor en condiciones eficientes de funcionamiento de las calderas. Se puede decir que una tonelada de bagazo de caña molido con un 40% de humedad es equivalente como combustible a 0.18 toneladas de aceite combustible, a 0.15 toneladas de gas natural o a 0.55 toneladas de madera seca. El valor calorífico del bagazo es en promedio de 2 340 Kcal/Kg en el caso del valor calorífico grueso y de 1 920 K cal/Kg para valor calorífico neto resultando esta última la más real del poder de calentamiento del combustible considerado. Si se compara este poder de calentamiento del bagazo con otros combustibles (Tabla 9) se puede observar que es de los más bajos.

TABLA 8

Disponibilidad Estimada de materiales celulósicos de plantas
fibrosas. (no maderables).

MATERIAL DE DESECHO	DISPONIBILIDAD POTENCIAL EN EL MUNDO DE ACUERDO A LOS METODOS DE RECOLECCION AC- TUALES. (1000 Tons. métricas).
Bagazo de caña	55 000
Diferentes tipos de paja (trigo, arroz, etc)	88 500
Fibras duras (jute, kenaf, arroz, etc)	6 099
Fibras de hojas (sisal, abaca, etc)	904
Junco.	30 000
Fibras de algodón.	13 500.

Ref. Virkola, N-E. (1975)

Tabla 9. Valores caloríficos de diversos tipos de combustibles.

TIPO DE COMBUSTIBLE	VALOR CALORIFICO GRUESO (Kcal/Kg)	VALOR CALORIFICO NETO (Kcal/Kg)
Aceite combustible	10 000	9 300
Gas natural	12 250	11 200
Madera (30% de humedad)	3 225	2 800
Madera (15% de humedad)	3 990	3 600
Bagazo de caña	2 340	1 920

Por lo mismo y dado que el consumo de materias fibrosas como el bagazo de caña en nuestro País fué de 377 000 toneladas métricas en 1982 y se estimaba que para 1983 sería de 404 000 toneladas métricas lo cual - representa tan sólo un 13.2% del total producido (SPP, 1982) se podría pensar en darle otros usos más eficientes el bagacillo de caña, entre los que podría figurar la producción de celulasas. Se han mencionado la disponibilidad, la biodegradabilidad, el uso no eficiente, la no toxicidad y el contenido de celulosa aprovechable entre las características principales que deben de ser satisfechas para que un sustrato pueda ser viable de utilización (Moo-Young, 1976; Humprey, 1974). Todas estas características se presentan en el bagacillo de caña de azúcar, por esta razón se pensó que este desecho - agroindustrial podría funcionar como un modelo de material celulósico tanto para la producción de enzimas celulolíticas así como para su posterior empleo como sustrato de una reacción de sacarificación con las enzimas - obtenidas a partir del mismo.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos:

Celulosa microcristalina, ácido 3,5 dinitrosalicílico, urea, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (E. Merck, Alemania); carboximetilcelulosa, papel filtro No. 1 (Whatman Biochemicals LTD, Inglaterra); reactivo de Folin Cicolteau, albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co., E. U. A.); KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $CaCl_2 \cdot H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $ZnCl_2$, $FeSO_4$, NaOH, Na_2CO_3 , dextrosa, tartrato de sodio y potasio, fenol, metabisulfito de sodio, citrato de sodio, ácido tricloracético, etanol (J. Baker, S. A. de C. V., México); proteosa peptona, bacto peptona, extracto de levadura, agar (Difco, EUA).

Bagacillo de caña no tratado molido y tamizado con un tamaño de partícula de 0.249 mm.

Bagacillo de caña tratado (residuo después de la obtención de furfural) molido y tamizado con un tamaño de partícula de 0.249 mm.

Bagazo de henequén molido y tamizado con un tamaño de partícula de 0.249 mm.

El bagacillo de caña fue obtenido del ingenio azucarero "Emiliano Zapata" de Zacatepec, Mor. y el bagazo de henequén de una planta desfibradora del municipio de Ixil, Yucatán.

Medios de Cultivo :

- 1) Medio completo : Extracto de levadura 1.0 g
 Glucosa 2.0 g
 Peptona 2.0 g
 Agar 1.5 g
 Agua destiladacbp..... ... 100 ml.

El ph se ajustó a 5.5 y se esterilizó en autoclave a 12 lbs de presión y 115°C durante 30 min.

- 2) Medio de Sabouraud y papa dextrosa agar (PDA) de Difco (E.U.A.)

3) Medio A (Medio Basal) : Reportado por Mandels y Reese (1963) contiene : KH_2PO_4 - 0.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.14%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.03%, CaCl_2 - 0.03% y 1.0 ml de una solución acuosa de elementos traza que contiene: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0.002 %, FeSO_4 - 0.0005%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0.00017%, ZnCl_2 - 0.0002%; celulosa microcristalina o carboximetilcelulosa 0.75% en agua destilada, pH del medio 5.5

4) Medio B : Este medio de cultivo se utilizó para la evaluación de la producción de actividad celulolítica por las cepas preseleccionadas, es el reportado para la producción de celulasas por T. viride (Mandels y Weber, 1969) y contiene : proteosa peptona - 0.075%, KH_2PO_4 - 0.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0.14%, urea - 0.03%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.03%, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0.03%, Tween 80 0.2%, 1.0 ml de una solución de elementos traza similar a la del medio A y 1.0 % de celulosa microcristalina o bien de bagacillo de caña no tratado, en agua destilada, pH del medio 6.0

Todos los medios de cultivo se esterilizaron 20 minutos a una temperatura de 121°C y a 2.5 atmósferas de presión.

Para el medio B los fosfatos fueron esterilizados por separado para evitar la precipitación de sales en el medio. La urea se esterilizó en un sistema millipore a través de una membrana estéril de 0.22 milimicras de poro.

Microorganismos.

El cultivo de Aureobasidium sp. con el que ya se contaba se aisló en nuestro laboratorio a partir de muestras de suelo de ingenio azucarero.

Las cepas de Trichoderma viride QM6a y QM 9414 fueron obtenidas de la ATCC, E. U. A.

Los demás microorganismos fueron aislados a partir de muestras de suelo de cañaveral y de bagacillo de caña en estado de descomposición.

Mantenimiento y preparación de los cultivos.

Las cepas fueron mantenidas y propagadas inicialmente en medio Sabouraud (Difco) posteriormente debido a que no fué posible adquirirlo con facilidad fué substituído por el medio designado como medio completo y por el medio de papa dextrosa agar (PDA) para la preparación del inoculo de los matraces de producción. En esta último la cantidad de esporas obtenidas fué mayor que con el medio completo.

Aislamiento.

Se llevaron a cabo dos etapas de aislamiento para tratar de obtener hongos mesófilos que aprovecharan rápidamente diversos tipos de celulosa.

Para la primera etapa se utilizó como sustrato el papel filtro ya que es un tipo de material constituido en gran parte por celulosa cristalina y es degradado únicamente por sistemas celulolíticos completos, lo cual es un índice bueno para efectuar la selección de microorganismos celulolíticos verdaderos.

En la segunda etapa se buscó contar con hongos que aprovecharan rápidamente las porciones amorfas de la celulosa para lo cual se utilizó como sustrato la carboximetilcelulosa.

Aislamiento de hongos mesófilos con capacidad de degradar rápidamente celulosa de tipo cristalino.

Alrededor de un gramo de muestra de suelo de ingenio y/o bagazo de caña de azúcar fueron suspendidos en 50 ml de agua destilada, la suspensión resultante después de ser agitada fué filtrada a través de una gaza y con 5 ml del filtrado obtenido fueron inoculados varios matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio A y celulosa microcristalina como única fuente de carbono, los cuales fueron incubados a 29° C a una agitación de 180 rpm. También fueron inoculados en forma similar otros matraces con 0.5 g de muestra la cual fué previamente remojada sin filtrar, los cuales fueron tratados posteriormente de igual forma que los inoculados con filtrado. De cada matraz en incubación se tomaron alícuotas de 1 ml

cada 24 horas, las cuales fueron inoculadas a tubos de ensaye con 5 ml de medio A empleando como fuente de carbono tiras de papel filtro Whatman No. 1, para lo cual a los tubos se les sustituyó el tapón de plástico por otro de gaza y algodón al cual se le adaptó la tira de papel filtro de tal forma que su extremo terminal estuviese sumergido en el medio. Los tubos así inoculados se incubaron a la misma temperatura que los matra- ces, con agitación pero inclinados. De los tubos donde se observó disgre- gación o desmenuzamiento del papel filtro y crecimiento de micelio en la zona de interfase líquido-aire, después de tres días de incubación fué tomada una alícuota de 0.2 ml que se distribuyó uniformemente en placas con medio Sabouraud a fin de obtener colonias aisladas de los hongos que hubieran crecido en este medio. Los tubos en los que se detectaba la apa- rición de colonias brillantes lustrosas que pudieran indicar crecimiento bacteriano eran descartados.

Las colonias obtenidas, se volvieron a inocular a tubos con medio A y tiras de papel filtro para asegurar de esta manera que las aisladas en esta primera fase presentaban actividad celulolítica. Mediante resiembras sucesivas de tubo a placa y viceversa se lograron obtener 30 hongos par cialmente puros ya que en algunos casos existía una asociación muy es- trecha entre los mismos, para lo cual se realizó una purificación por el método de dilución terminal y una vez lograda, las colonias purificadas fueron probadas de nuevo en sistemas iguales de tubo con medio A y ti- ras de papel filtro para seleccionar aquellas que mostraran mayor dis- gregación del papel filtro en tiempos más cortos, pudiéndose de esta for- ma contar con 10 cepas las cuales fueron probadas para la producción

de celulasas extracelulares en el medio B con celulosa microcristalina como fuente de carbono midiéndose la actividad celulolítica en los filtrados libres de células y posteriormente medir también la producción de actividad celulolítica pero utilizando bagacillo de caña como fuente de carbono.

Aislamiento de hongos mesófilos que degraden rápidamente carboximetilcelulosa.

Se efectuó una suspensión de 1 g de las muestras de bagazo de caña no tratado y de bagazo de caña después de la obtención de furfural en 50 ml de agua destilada dejando que se humedecieran durante 2 hrs, se homogeneizó la misma antes de filtrarla utilizando para tal fin un pedazo de gaza para cada muestra por separado.

El filtrado se utilizó para inocular matraces con medio A y carboximetilcelulosa al 0.75%. El inóculo fué de 5 ml de filtrado para 50 ml de medio. Una vez inoculados en condiciones de esterilidad se incubaron a 29°C con agitación de 180 rpm durante una semana. Cada 24 horas después de haber sido inoculados se tomaron muestras de 1 ml con los cuales se inocularon tubos con medio A y carboximetilcelulosa al 1.0% con el fin de ir seleccionando paulativamente los microorganismos que crecieran en el mismo.

De aquellos tubos en los que el crecimiento de micelio era bastante notorio se tomaba una alícuota de 1 ml para inocularla de nuevo en medio fresco para continuar con la selección en forma natural por la técnica de cultivo de enriquecimiento. El tiempo que se estableció para tal

fin de tres días para tener desarrollo y cinco días como máximo.

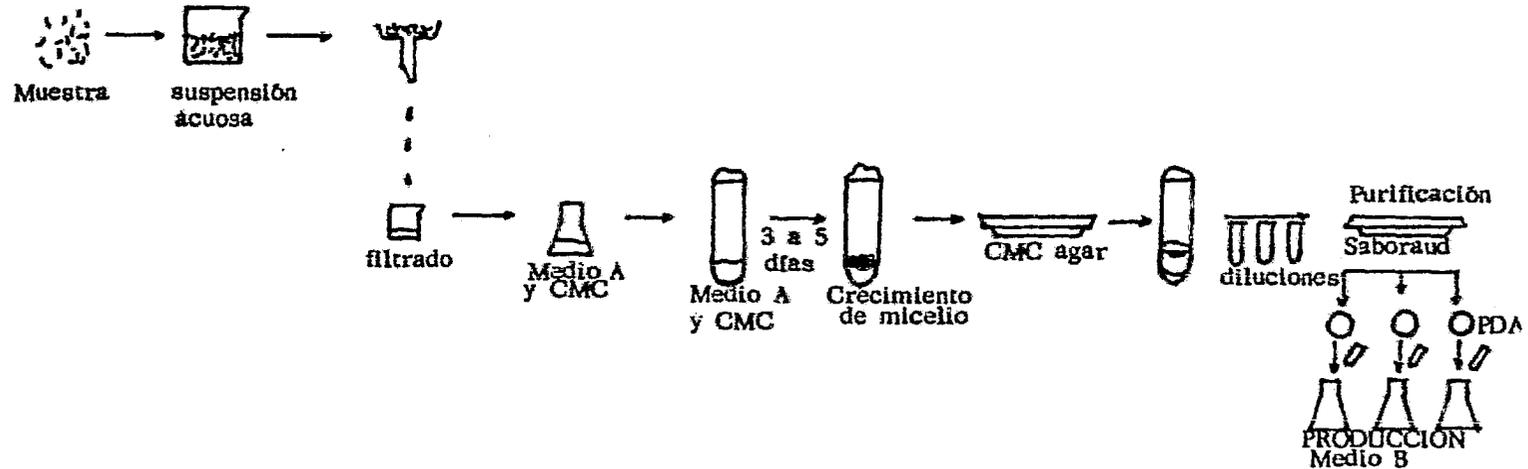
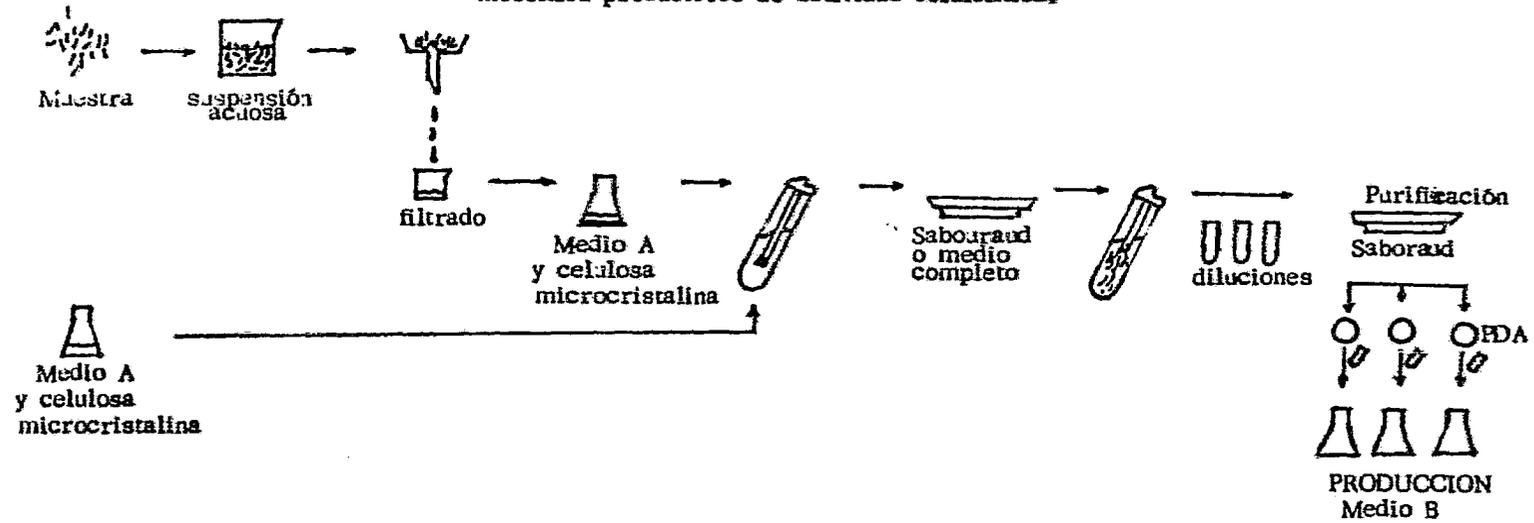
A partir de aquellos tubos seleccionados por crecimiento abundante en el lapso de tiempo considerado, se tomaba de nuevo una alícuota de 0.1 a 0.2 ml la cual era sembrada en placas de Petri con medio A con CMC al 1.0% y agar - 0.6%. Para evitar que la CMC se sedimentara, el medio salido de la autoclave se dejaba enfriar a temperatura ambiente antes de vaciarlo en placas de Petri para su solidificación.

Las placas así inoculadas se incubaron a 29°C hasta la aparición de crecimiento detectado a simple vista lo cual ocurría por lo general en un lapso de 5 a 7 días.

El crecimiento se manifestaba claramente por la aparición de colonias de hongos con filamentos ramificados alrededor de las cuales sobre fondo oscuro era notorio un débil halo o bien una ligera depresión en el agar-celulosa. En las placas que apareció crecimiento bacteriano asociado con; el de hongos únicamente fueron seleccionadas para su purificación las colonias de éstos últimos.

Las colonias seleccionadas ya fuera por mayor desarrollo o bien por la diferenciación en el halo de producción fueron picadas con la porción de agar correspondiente y colocadas en un tubo con agua estéril a partir del cual se hicieron diluciones seriadas. De las últimas diluciones efectuadas se tomó una alícuota de 0.1 ml la cual fué sembrada en placas de Petri con medio Sabouraud y a partir de las que apareció crecimiento se efectuó una selección en base a las características morfológicas coloniales de los hongos aislados obteniéndose de esta forma 5 cepas las cuales se probaron para la producción de actividad enzimática inicialmente

Fig.5 Esquema del procedimiento utilizado para el aislamiento de hongos mesófilos productores de actividad celuloítica.



en medio B y celulosa microcristalina como fuente de carbono y posteriormente una vez seleccionados los mejores productores medir la actividad producida pero ahora en bagacillo de caña.

Producción de celulasas.

a) Preparación del inóculo: Para este fin, los cultivos seleccionados y las cepas de T. viride así como la de Aureobasidium sp. fueron propagados en tubos inclinados con medio de PDA los cuales eran incubados a 29°C durante 72 hrs, tiempo necesario para la esporulación ya que a partir de la misma se efectuaba una suspensión con una porción de los 10 ml de medio B contenidos en el tubo de ensayo los cuales posteriormente eran incubados a 29°C y una agitación de 180 rpm durante 72 hrs después de las cuales eran vaciados al matraz de producción. En el caso de los cultivos que se caracterizaban por esporular sin presentar un desarrollo micelial abundante, se realizaba la suspensión raspando el micelio con una lanceta.

b) Producción de la enzima : Para la realización de esta etapa, eran inoculados matraces de 250 ml con 90 ml de medio de cultivo B con 10 ml del medio de los tubos de cultivo preparados como se describió anteriormente y eran puestos en incubación a 29°C con una agitación de 180 rpm durante 10 días siguiendo en el transcurso de los mismos el perfil de producción de las celulasas así como la proteína extracelular presente y la variación del pH en el medio de cultivo.

c) Obtención de los filtrados: A diferentes tiempos de fermentación, hasta completar un máximo de 240 hrs, se tomaron muestras de 5,0 ml eliminándose células y sólidos en suspensión por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos o bien filtrando la muestra proveniente del medio de cultivo a través de un filtro Swinex-25 millipore utilizando una membrana tipo HA de 0.45 milimicras de poro empleando una jeringa de plástico para contener la muestra efectuando el desplazamiento del émbolo lentamente - para evitar la formación de espuma en el filtrado resultante.

A los filtrados obtenidos por cualquiera de las dos formas se les agregó azida de sodio o merthiolate para evitar contaminación bacteriana y fueron almacenados a 4°C sin que existiera pérdida notable de la actividad.

La determinación de las diferentes actividades enzimáticas, así como la variación del pH con respecto al tiempo de producción y la proteína extracelular se realizaba con estos filtrados o bien con el sobrenadante.

Determinación de las actividades enzimáticas.

a) Actividad celulolítica total : Se determinó por el método reportado por Mandels (1976) el cual consiste en la cuantificación de los azúcares reductores producidos por la acción de las celulasas sobre 50 mg de papel filtro como sustrato de la enzima. Su utilidad se debe a que se trata de una celulosa organizada con la cual es posible manifestar la presencia de endoglucanasas y exo-glucanasas del sistema celulasa, así como la eficiencia hidrolítica de estas enzimas (Bailey, 1982). El sistema de reacción estuvo compuesto por 50 mg de papel filtro Whatman No 1 (tiras de 1 X 6 cm)

1 ml de amortiguador de citratos 0.075 M, pH 4.8 y 0.5 ml de la preparación enzimática. Después de incubar 1 hr a 50°C se detuvo la reacción adicionándole 3.0 ml del reactivo de DNS; se calentó a ebullición en baño con agua por 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se completó a un volumen de 20 ml con agua destilada y se leyó densidad óptica en un colorímetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb). La cantidad de azúcares reductores fué calculada utilizando una curva estándar utilizando glucosa como solución patrón, la cual es lineal hasta una concentración de 1.5 mg (Miller, 1959), (Figura 8).

b) Actividad celulolítica sobre carboximetilcelulosa: Para la caracterización de los filtrados celulolíticos de los hongos aislados en este material así como para poder establecer diferencias en la capacidad de degradar varios tipos de celulosa por los demás, también se montaron las condiciones de ensayo de actividad sobre CMC que es un tipo de celulosa soluble.

Para encontrar la concentración óptima para la realización del ensayo, se midió la actividad de un filtrado de la cepa Trichoderma viride QM 9414 utilizando diferentes concentraciones de CMC con el fin de obtener aquella en la cual la enzima actuara a su velocidad máxima.

Las concentraciones de CMC empleadas fueron 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 y 100 mg/ml, efectuándose la suspensión en buffer citratos 0.075 M, pH 4.8.

El sistema para medir actividad estaba compuesto por 0.5 ml del filtrado, 1 ml de la suspensión en buffer citratos de acuerdo a la cantidad requerida de CMC, incubando 1 hr a 50°C.

La actividad obtenida fué reportada como la concentración de azúcares

reductores (mg) por ml de filtrado en una hora de reacción, tomando a la glucosa como estándar.

De los resultados obtenidos presentados en la gráfica respectiva, se pudo establecer que la concentración con la que se llega a la V_{max} fué la de 75 mg/ml de CMC por lo que ésta fué la utilizada en todos los ensayos con este sustrato para los demás filtrados. Por lo que el sistema de reacción para esta determinación se encuentra compuesto por 1 ml de la suspensión de CMC al 7.5% en amortiguador de citratos 0.075 M, pH 4.8 y 0.5 ml del filtrado respectivo. El sistema era también incubado durante 1 hr a 50°C y los azúcares reductores producidos cuantificados por el método de DNS descrito. En todos los ensayos se incluyeron blancos de enzima sin sustrato y de sustrato sin enzima.

La actividad celulolítica en ambos casos fué reportada como la cantidad de azúcares reductores (mg) producidos por ml de filtrado por hora.

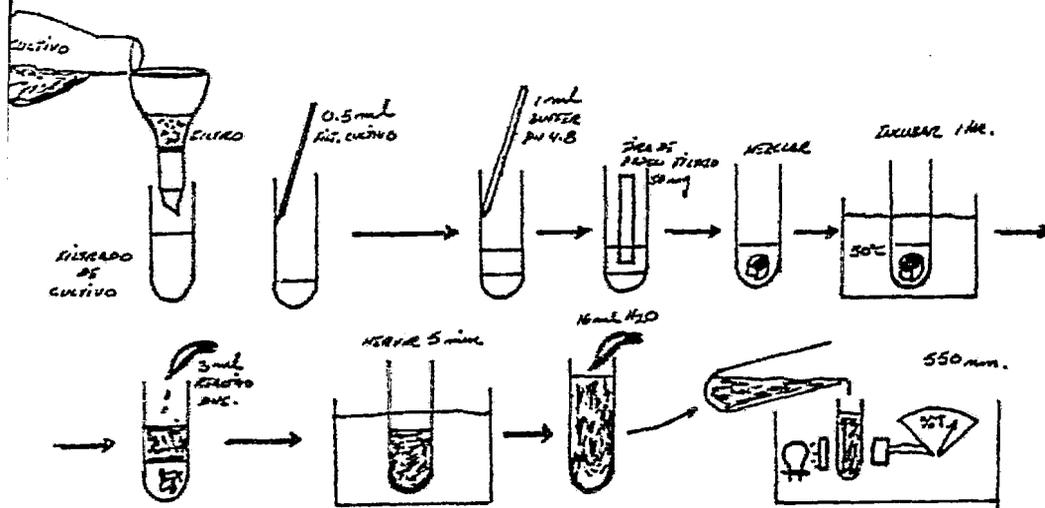


Fig. 5 Diagrama ilustrativo sobre el ensayo de papel filtro para la determinación de la actividad celulolítica, de acuerdo a Mandels (1976)

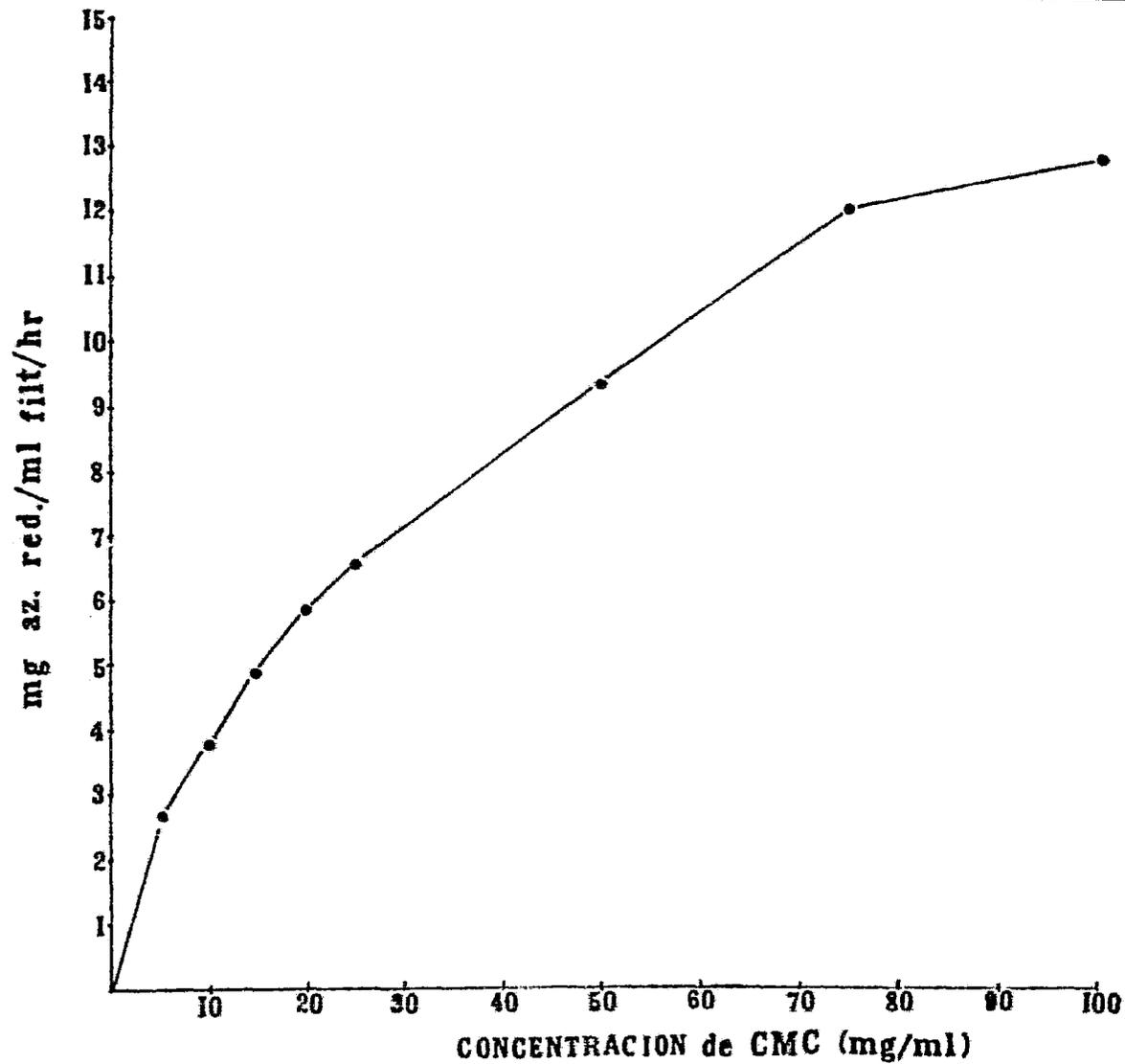


Fig. 7 Evaluación de la concentración óptima de carboximetilcelulosa para el ensayo de medición de actividad celololítica utilizando un filtrado de Trichoderma viride QM 9414.

Preparación del reactivo de DNS.

Este reactivo contiene:

NaOH	1.4 %
ácido 3,5-dinitrosalicílico	0.75 %
Tartrato doble de sodio y potasio ..	21.6 %
Fenol	0.56 %
Metabisulfito de sodio	0.59 %.

Se adiciona cada compuesto en el orden indicado en agua destilada, una vez disueltos completamente se afora y se guarda en frasco ámbar.

Determinación de Proteína.

En el caso de la proteína extracelular la determinación se realizó tomando alícuotas del filtrado entre 0.2 y 0.5 ml y se siguió una medición del método de Lowry (1956) para la cuantificación utilizando como estándar una solución de albúmina sérica bovina.

La determinación consiste en el desarrollo de la siguiente técnica:

Se preparan las siguientes soluciones:

- A) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% en agua destilada.
- B) Tartrato de sodio y potasio al 2% en agua destilada.
- C) Carbonato de Sodio al 2% en NaOH 0.1 N.
- D) 1 A + 1 B = 1 D.
- E) 1 D + 50 C = 1 E.

Reactivo de Folin Cicolteau diluido 1 : 1 en agua destilada.

Solución estándar de albúmina sérica bovina 500 microgramos/ml.

Las soluciones D, E y el reactivo de Folin-Cicolteau se preparan en el momento de utilizarse.

Técnica:

- 1) Colocar en un tubo una alícuota de 0.2 ml de la solución en la que se hará la valoración de proteína.
- 2) Llevar a 1 ml de volumen final con agua destilada.
- 3) Adicionar 5 ml del reactivo E y agitar vigorosamente.
- 4) Dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 5) Agregar 0.5 ml del reactivo de Folin y agitar.
- 6) Dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 7) Leer absorvancia a 590 nm comparándola contra una curva estándar de albúmina sérica bovina.

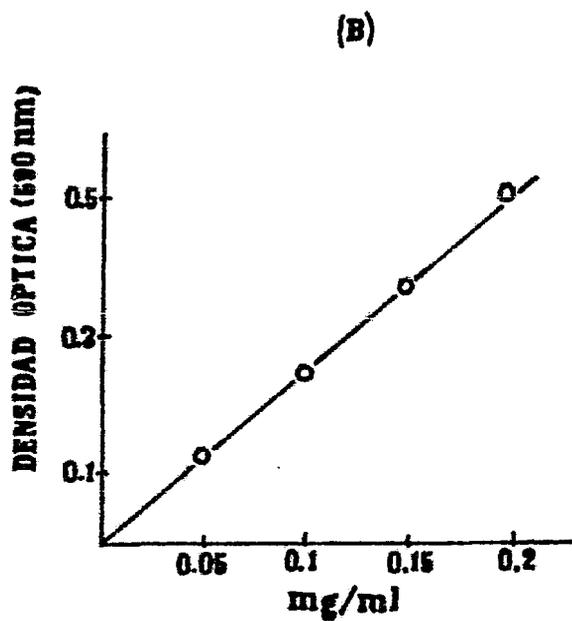
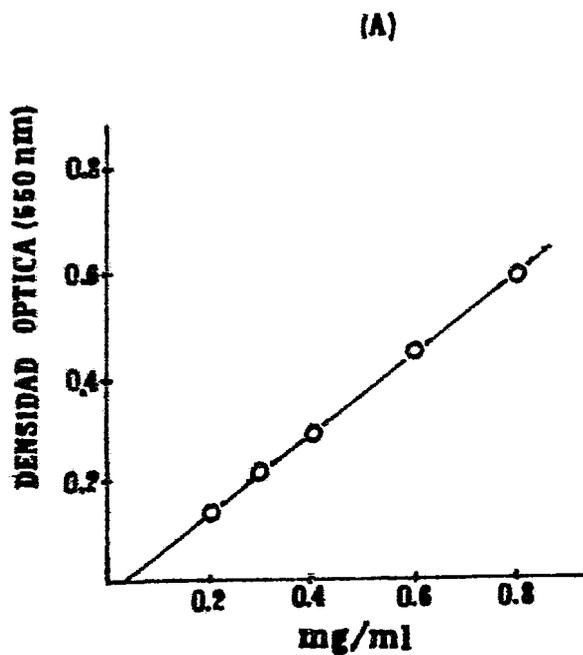


Fig. 8 CURVAS ESTANDAR PARA AZUCARES REDUCTORES Y PROTEINA.

- (A) GLUCOSA
(B) PROTEINA (ASB).

Reacciones de sacarificación.

Se realizaron dos tipos de sacarificaciones, una a tiempos cortos de reacción utilizando sustratos puros como la celulosa microcristalina, la carboximetilcelulosa y el papel filtro; la otra en tiempos largos de reacción, en la cual se incluyeron además otros materiales celulósicos como el bagazo de henequén y bagacillo de caña de dos tipos, el denominado tratado (que es residuo de la obtención de furfural) y el nativo o sea bagacillo de caña sin tratamiento químico alguno.

a) Sacarificación a tiempos cortos de reacción: El sistema de reacción consistió para papel filtro de 50 mg de material, 1 ml de buffer citratos 0.075 M, pH 4.8 y 0.5 ml de filtrado; para carboximetilcelulosa de 1 ml de una suspensión al 7.5% en buffer citratos 0.075 M, pH 4.8 y 0.5 ml de filtrado y para la celulosa microcristalina se usaron 50 mg de concentración o sea 1 ml de una suspensión al 5% en buffer citratos 0.075 M, pH 4.8 y 0.5 ml de filtrado. El filtrado utilizado fué el obtenido a los 10 días de fermentación. La reacción fué realizada en tubos de ensayo a una temperatura de 50° C. Los azúcares reductores producidos en los intervalos de de .15 min, 30 min, 1 hora, 90 min y 2 hrs de reacción fueron determinados con reactivo de DNS.

b) Sacarificación de diversos materiales celulósicos a tiempos largos de reacción: Para llevar a cabo esta reacción, el sistema consistió de 1 g en peso seco del material celulósico, 5 ml del filtrado producido a los 10 días de fermentación y 10 ml de una solución de buffer citratos 0.075 M

pH 4.8 en matraces Erlenmeyer de 125 ml con una velocidad de agitación de 150 rpm y una temperatura de incubación de 50°C. Los matraces fueron tapados con papel parafilm para evitar pérdidas por evaporación durante el transcurso de la sacarificación. El tiempo de incubación máximo fué de 48 hrs y durante este tiempo fueron sacadas muestras de 1 ml para la determinación de los azúcares reductores producidos por el método de DNS a las 6, 12, 24, 36 y 48 hrs respectivamente.

Estabilidad de la enzima.

Se realizó un experimento para determinar la estabilidad de la actividad celulolítica de los filtrados incubando a 50°C durante 48 hrs cada filtrado.

Se determinó la actividad en papel filtro y carboximetilcelulosa presente en cada filtrado a las 6, 12, 24, 36 y 48 hrs para lo cual se tomaron alícuotas de 0.5 ml incluyéndose un blanco de reacción con filtrado fresco para fines comparativos en las determinaciones de actividad enzimática efectuadas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se inició el trabajo con un programa extensivo de aislamiento de microorganismos, de tal forma que fuera posible seleccionar los mejores hongos productores de celulasas a partir de un depósito donde abundaran materiales con alto contenido de celulosa, como es el caso del bagacillo de caña de azúcar, ya que este material reúne las características que se consideran necesarias para su utilización biotecnológica en nuestro País.

De las muestras de suelo de cañaveral y bagacillo de caña fueron aislados numerosos microorganismos celulolíticos, a partir de los cuales fueron preseleccionados inicialmente 10 hongos aislados sobre celulosa microcristalina como fuente de carbono, en base a su mayor velocidad de disgregación del papel filtro. Estas cepas fueron designadas con la denominación TE-000 de acuerdo a un orden progresivo correspondiéndoles la numeración del 1 al 10 (TE-001 a TE-010).

Asimismo fueron preseleccionados también otros hongos diferentes, los cuales fueron aislados utilizando ahora como fuente de carbono a la carboximetilcelulosa (CMC), de acuerdo a la mayor velocidad de crecimiento que presentaron en este material. A estas cepas, respetando la designación utilizada para las anteriores, les correspondió la numeración del 11 al 15 (TE-011 a TE-015).

Para realizar la selección de estas cepas, fué necesario comparar la producción de celulasas extracelulares con cepas de referencia como son las de Trichoderma viride QM 6a y QM 9414 así como con una cepa de Aureobasidium sp la cual fué previamente seleccionada y caracterizada

en nuestro laboratorio y que fué aislada a partir de suelo de cañaveral.

En todos los casos se evaluó la producción de actividad celulolítica - extracelular utilizando inicialmente celulosa microcristalina y posteriormente bagacillo de caña de azúcar como fuentes de carbono cuantificándose los azúcares reductores producidos por los filtrados obtenidos del cultivo utilizando como sustratos de reacción el papel filtro y la carboximetilcelulosa con el fin de intentar establecer si existe mayor actividad de algún componente en especial o definición de un tipo de actividad hacia un material celulósico en particular. Por lo mismo, se consideró importante seguir el patrón de producción de actividad sobre este último - sustrato fácil de degradar, ya que contar con un índice de la actividad - de endoglucanasa presente en el filtrado resulta conveniente puesto que los materiales celulósicos principalmente los residuos de tipo agrícola cuentan con porciones amorfas en las que se manifiesta este tipo de actividad y la mayoría de los hongos aislados provienen de un material de este tipo.

Producción de actividad celulolítica utilizando celulosa microcristalina como fuente de carbono

La producción de celulasas por los microorganismos capaces de realizarla es lenta y difícil de incrementar (Ghose, 1979), se ha intentado mejorar la producción de actividad celulolítica por medio de la selección de nuevas cepas, mutagénesis (Montenecourt, 1977; Bailey, 1981; Nevaleaenen, 1981), de optimización de los medios de cultivo y condiciones de fermentación (Mandels, 1976; Stenberg, 1979; Vilela, 1977).

Por otro lado, la producción de celulasas depende de la naturaleza de la fuente de carbono utilizada en la elaboración del medio de cultivo - por lo que se decidió probar inicialmente a la celulosa microcristalina como sustrato de fermentación para realizar una evaluación más apropiada de la actividad celulolítica extracelular producida por los hongos preseleccionados.

Los filtrados obtenidos del cultivo de las diferentes cepas evaluadas poseen cantidades variables de los diferentes componentes del sistema enzimático de celulasas por este motivo fué medida la actividad presente tanto en papel filtro como en carboximetilcelulosa durante los 10 días en los que se siguió la producción de actividad puesto que la hidrólisis enzimática de la celulosa a glucosa, una de las finalidades de este trabajo requiere la participación de cuando menos tres componentes del sistema celulasas, los cuales son la endoglucanasa, exoglucanasa y beta-glucosidasa (Leena, et al 1981). También se midió la producción de protefna extracelular y la variación del pH para conocer su influencia en la manifestación de dicha actividad.

Los resultados obtenidos presentados en las figuras 9 a 20, reflejan que la variación de la actividad obtenida es paralela a la secreción de protefna extracelular y a variaciones significativas en el pH del medio de producción, correspondiendo por lo general las mismas al tiempo de producción de la máxima actividad celulolítica. Por lo mismo se puede considerar que la variación en el pH del medio, es significativa para la producción de esta actividad efecto muy notorio cuando se ha estudiado a Trichoderma viride ya que el pH óptimo para crecimiento es de alrededor de 4.0 y el de producción enzimática de 3.0. Abajo de este pH, las

celulasas son inactivadas y el crecimiento se detiene a valores menores a 2.0 por lo que el control del pH en el rango de 3-4 es bastante importante para lograr la máxima producción de enzima (Dewey, et al 1980).

Ahora bien, en lo que se refiere a la actividad obtenida se puede considerar que las cepas que produjeron alrededor de 2.0 mg de azúcares reductores por ml de filtrado actuando sobre papel filtro es considerada como buena ya que corresponde a un 4% de degradación de este sustrato en las condiciones establecidas por Mandels (1976). Para evaluar la producción de actividad sobre CMC se consideró el lapso de tiempo al cual se logró obtener un máximo de la misma considerándose buenas aquellas cepas en las que se producía a tiempos cortos de fermentación aunque no mostraran un nivel alto de actividad sobre papel filtro. Sin embargo, no todas las cepas evaluadas inicialmente sobre esta fuente de carbono mostraron actividad extracelular detectable, de esta primera evaluación fué posible descartar las siguientes : TE-003, TE-005, TE-007, TE-009, TE-012 y TE-015.

Con respecto al grado de producción de actividad sobre las cepas aisladas y las de referencia se puede establecer que si bien en todos los casos no fué posible igualar la actividad producida por la cepa de Trichoderma viride QM 9414 la cual fué parecida a la reportada en un trabajo de Mandels (1975), (3.7 mg az. red/ml filt./hr); sí se igualó o superó la actividad producida por la cepa silvestre QM 6a lo cual es un punto bueno de tomarse en cuenta ya que todas las cepas evaluadas no han sufrido ninguna manipulación genética para lograr aumentar su actividad. En lo que se refiere a la cepa de Aureobasidium sp el cual ya ha sido caracterizado en trabajos anteriores (Larios y Huitrón, 1982) se puede decir que esta -

cepa resulta más eficiente para la producción de actividad sobre papel filtro en tiempos cortos de fermentación ya que a las 72 hrs de incubación se ha logrado obtener una actividad sobre papel filtro de 2.25 mg de az. red./ml filt./hr la cual representa un 75% de la actividad producida por T. viride obtenida en este trabajo (Larios y Huitrón, 1982)- al tiempo de máxima producción de Aureobasidium sp comportamiento similar al obtenido en el desarrollo de este trabajo aunque después de este lapso de tiempo, la actividad producida por esta cepa no varía y su perfil de producción es semejante al de las demás.

En la tabla 10 se agruparon las cepas seleccionadas de acuerdo a su producción de actividad celulolítica en ambos tipos de sustratos, pero se bresalen de acuerdo a la actividad obtenida en este material las cepas TE-001, TE-002, TE-004, TE-008 las cuales fueron capaces de producir más de 2.0 mg de az. red./ml filt./hr a partir de papel filtro, aunque la actividad sobre carboximetilcelulosa es considerablemente más alta, lo que indica que la celulosa microcristalina es un buen inductor de ambos tipos de actividad.

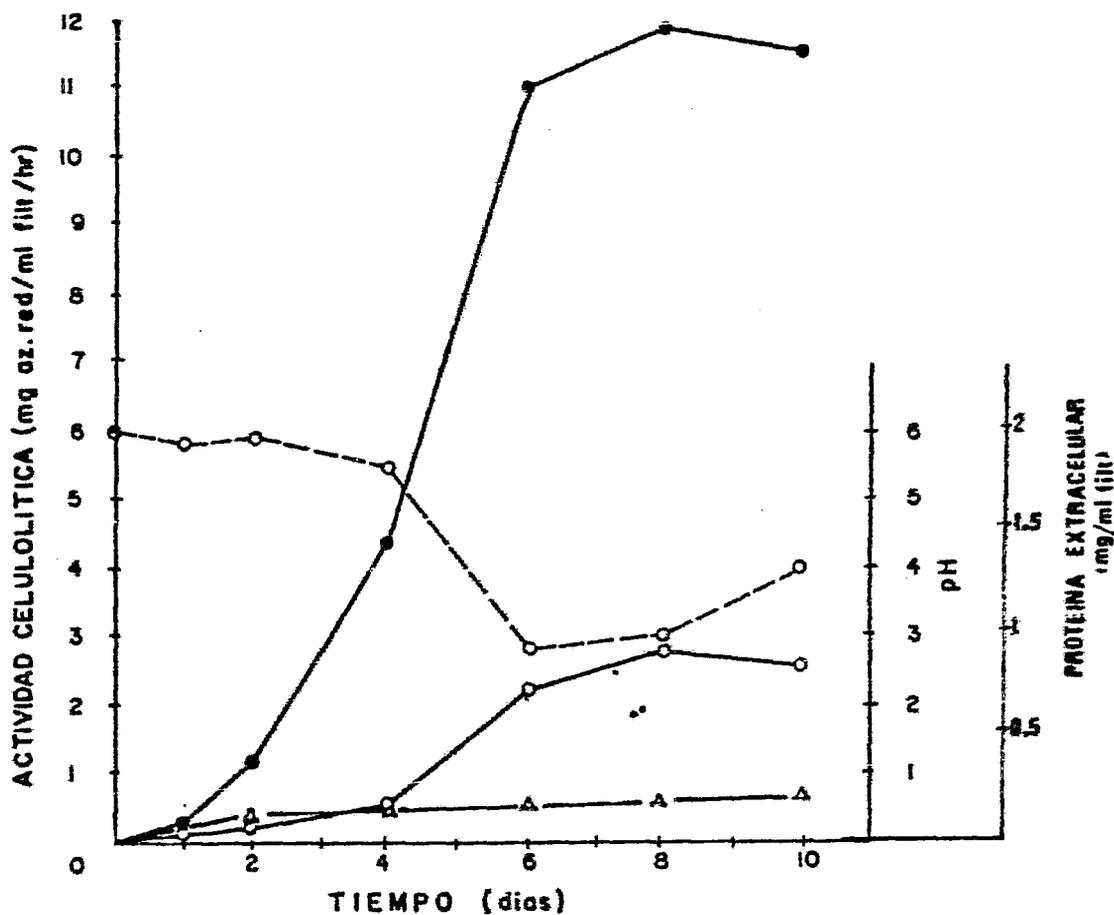


Figura 9 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-001 en medio B con celulosa microcristalina al 1% como fuente de carbono. (○) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (△) Proteína extracelular.

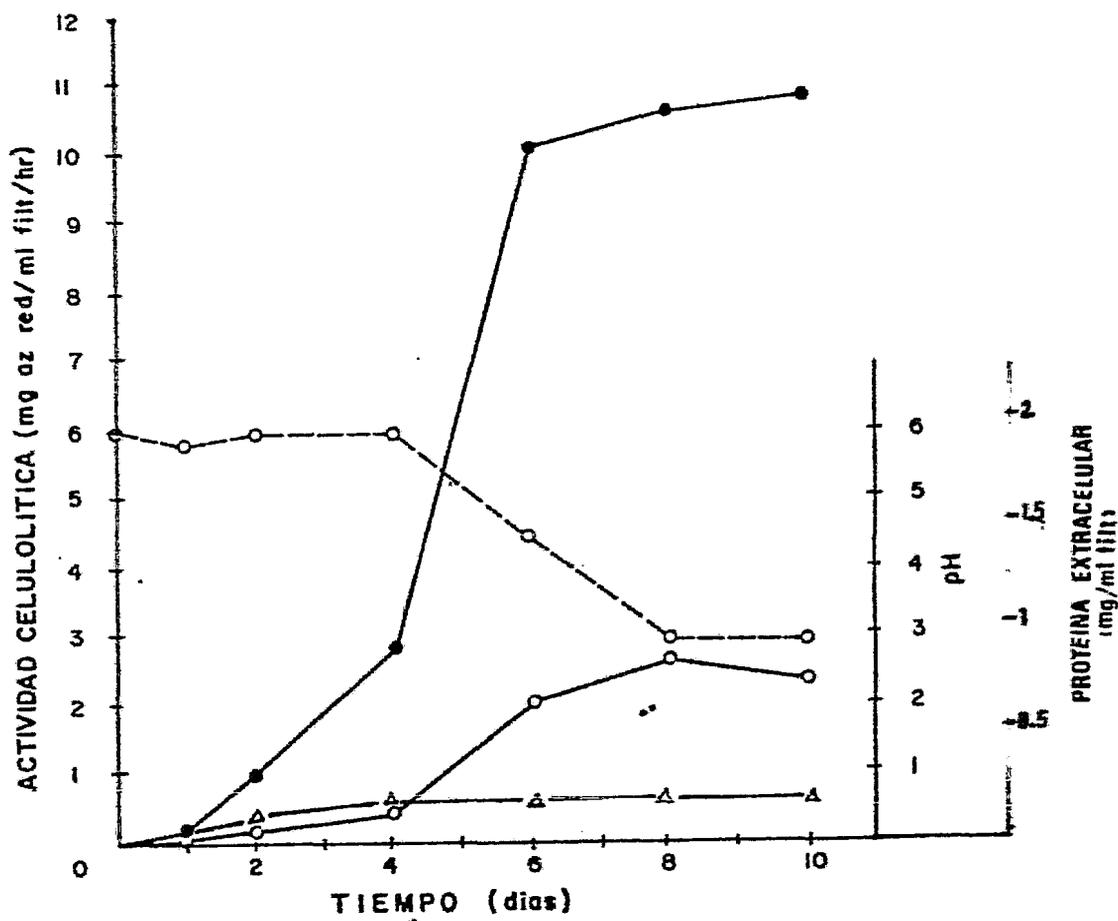


Figura 10 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-002 en medio B con celulosa microcristalina al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína extracelular.

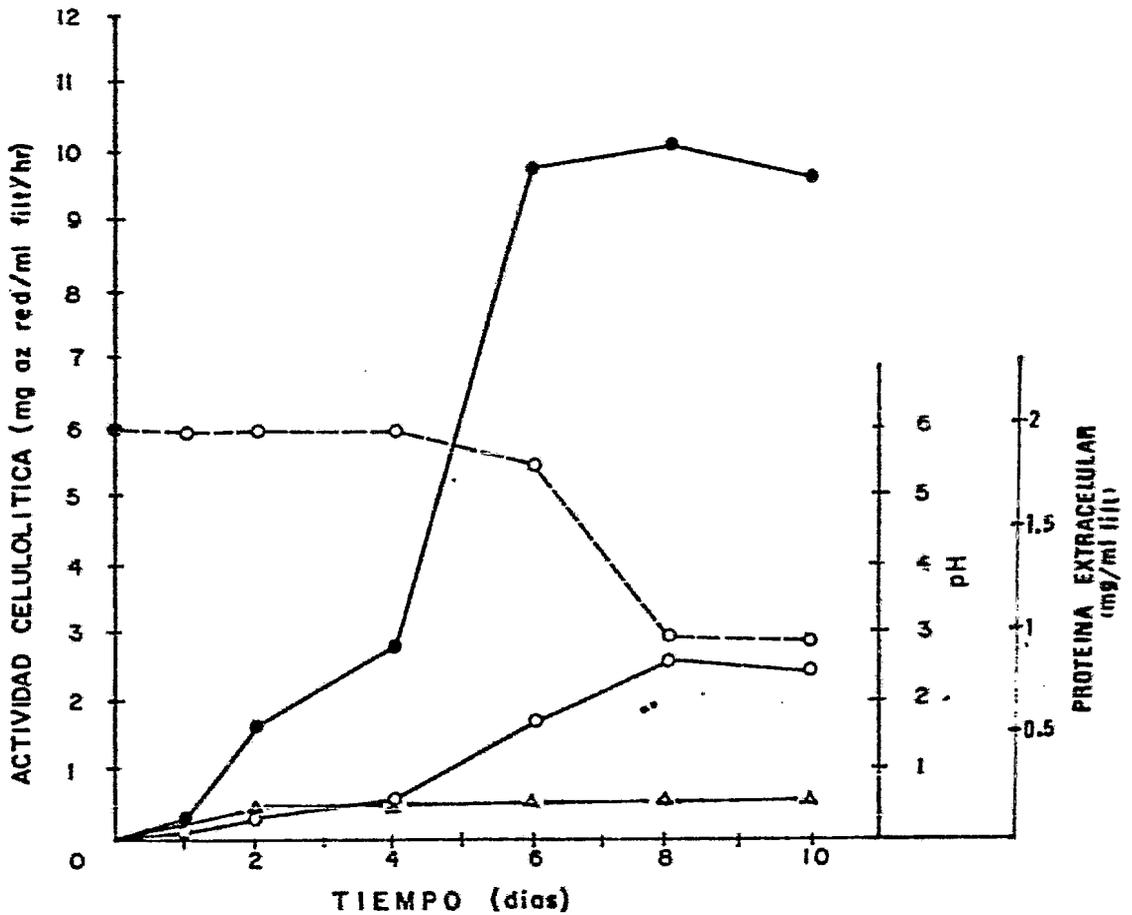


Figura 11 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-004 en medio B con celulosa microcristalina al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína extracelular.

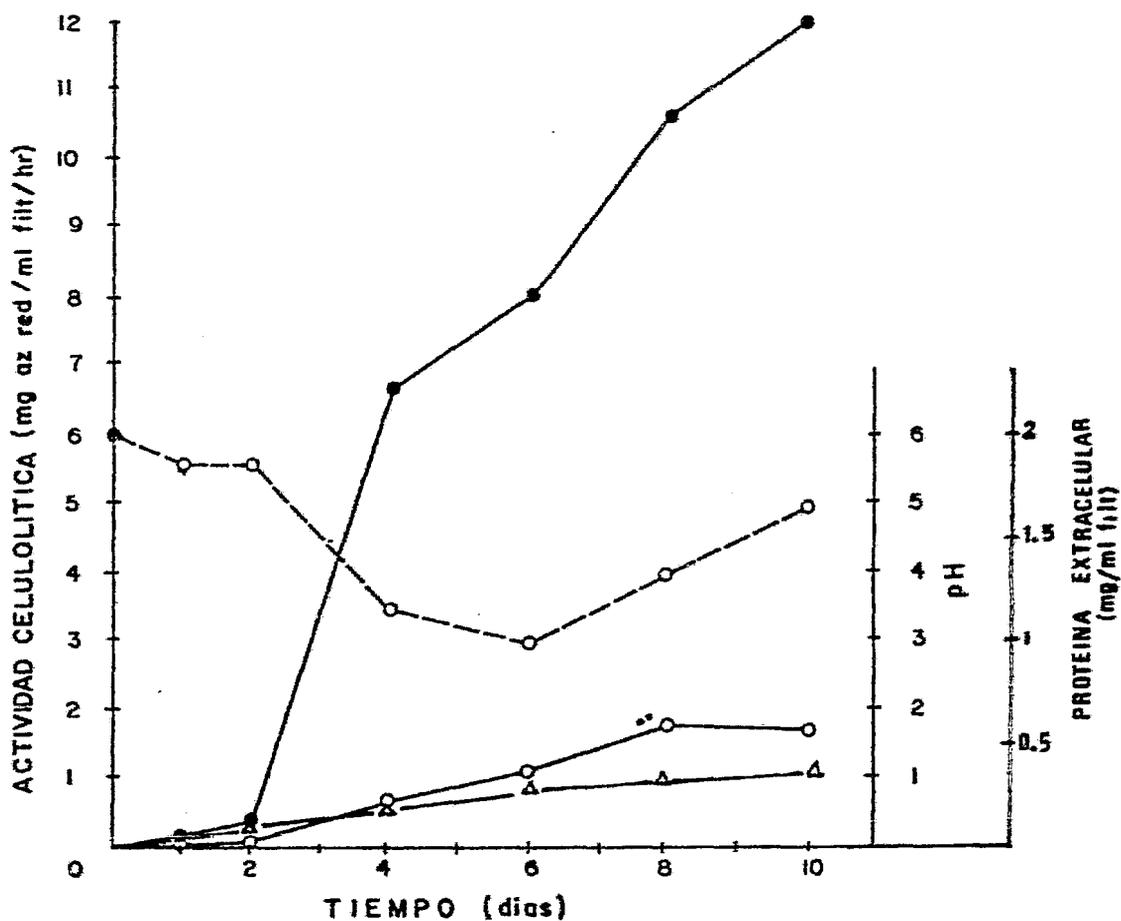


Figura 12 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-006 en medio B con celulosa microcristalina al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (△) Proteína extracelular.

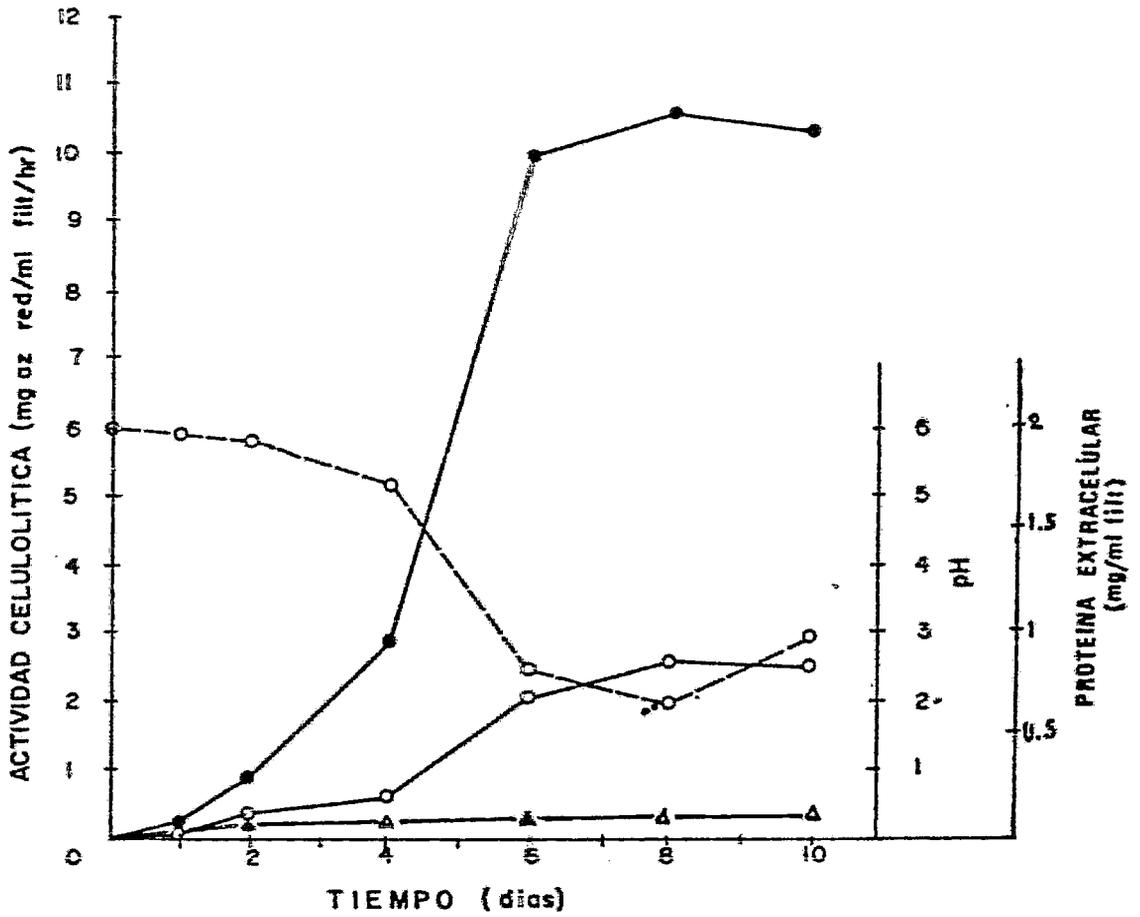


Figura 13

Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-005 en medio B con celulosa microcristalina al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína extracelular.

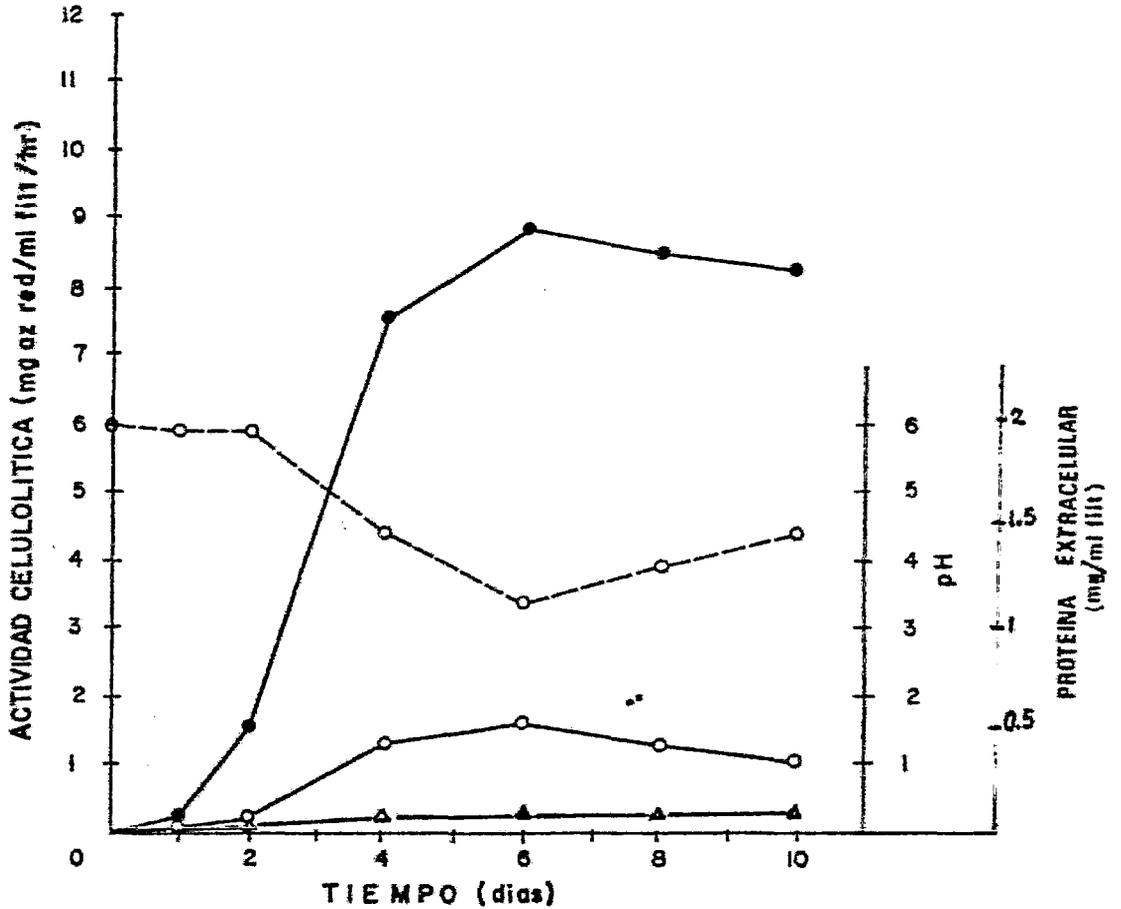


Figura 14 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-010 en medio B con celulosa microcristalina al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína extracelular.

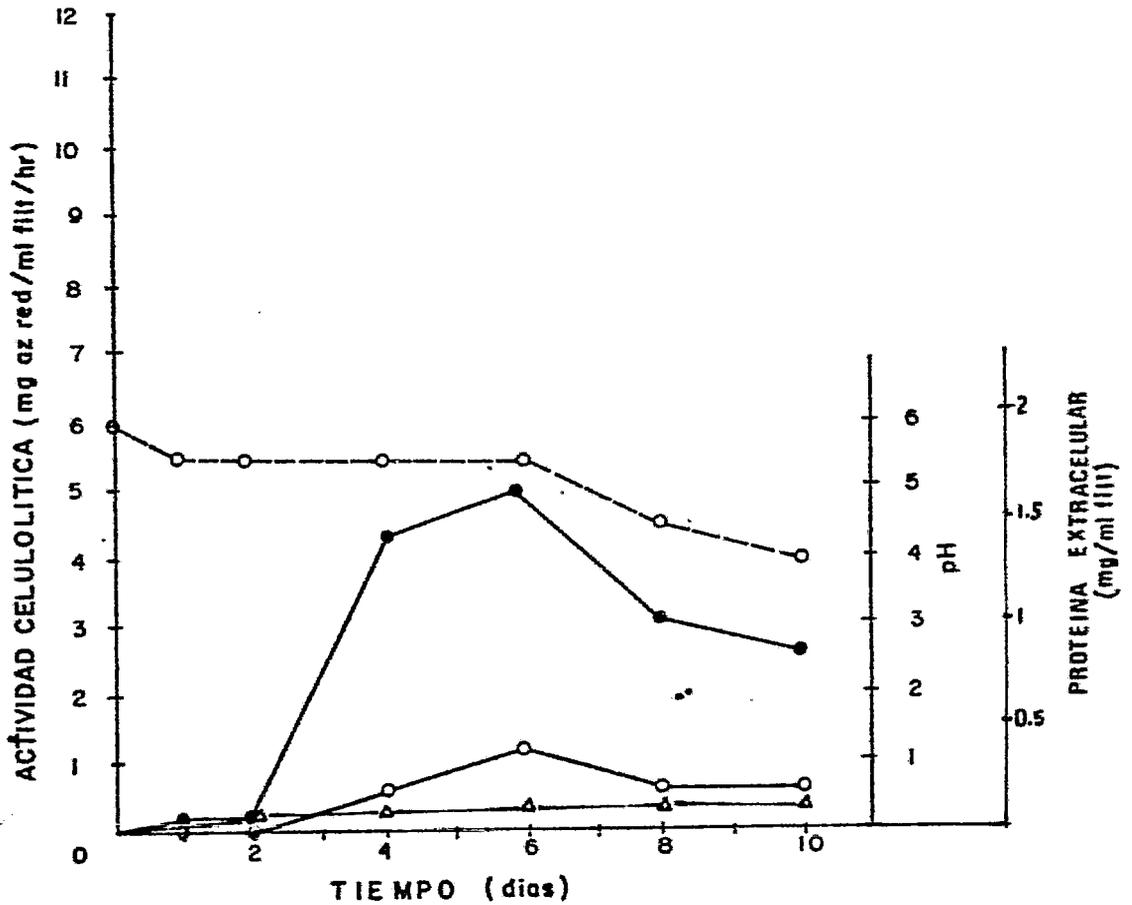


Figura 15 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-011 en medio B con celulosa microcristalina al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína extracelular.

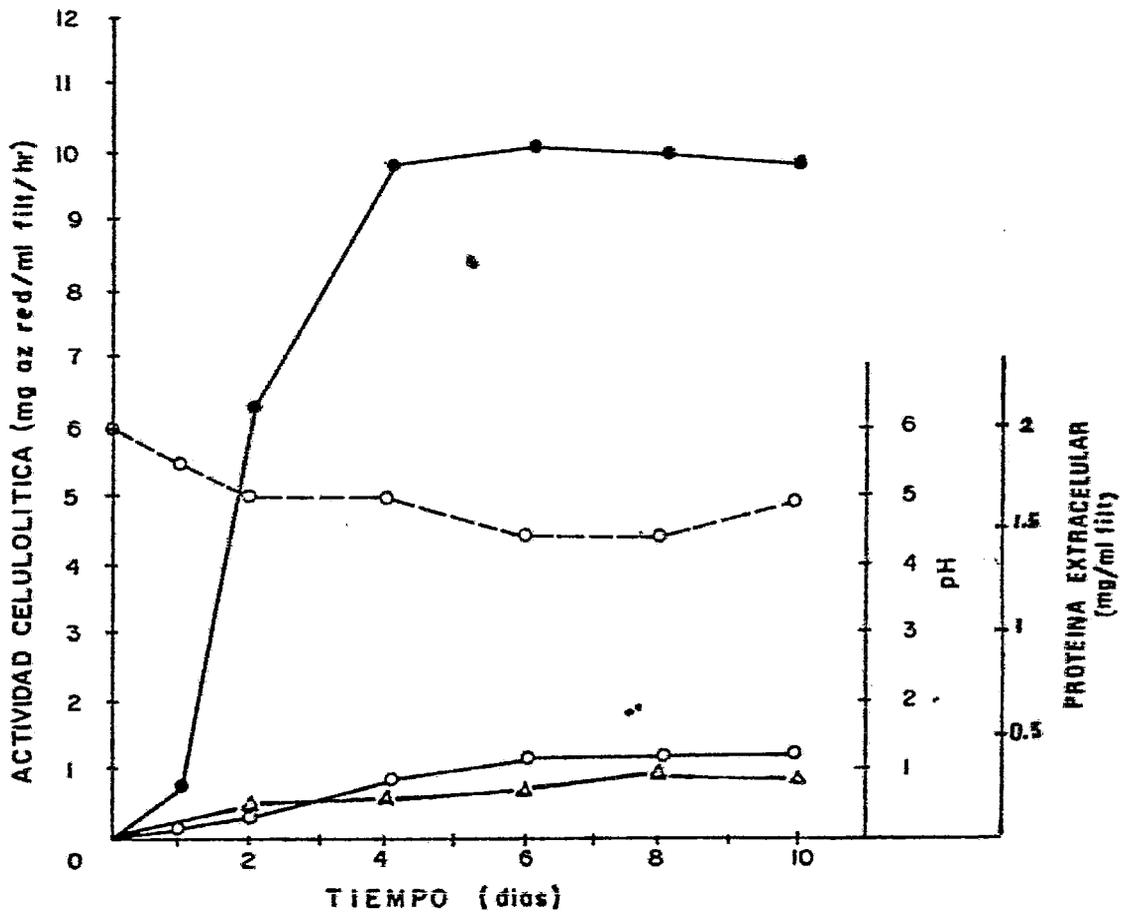


Figura 16 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-013 en medio B con celulosa microcristalina al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (◻) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína extracelular.

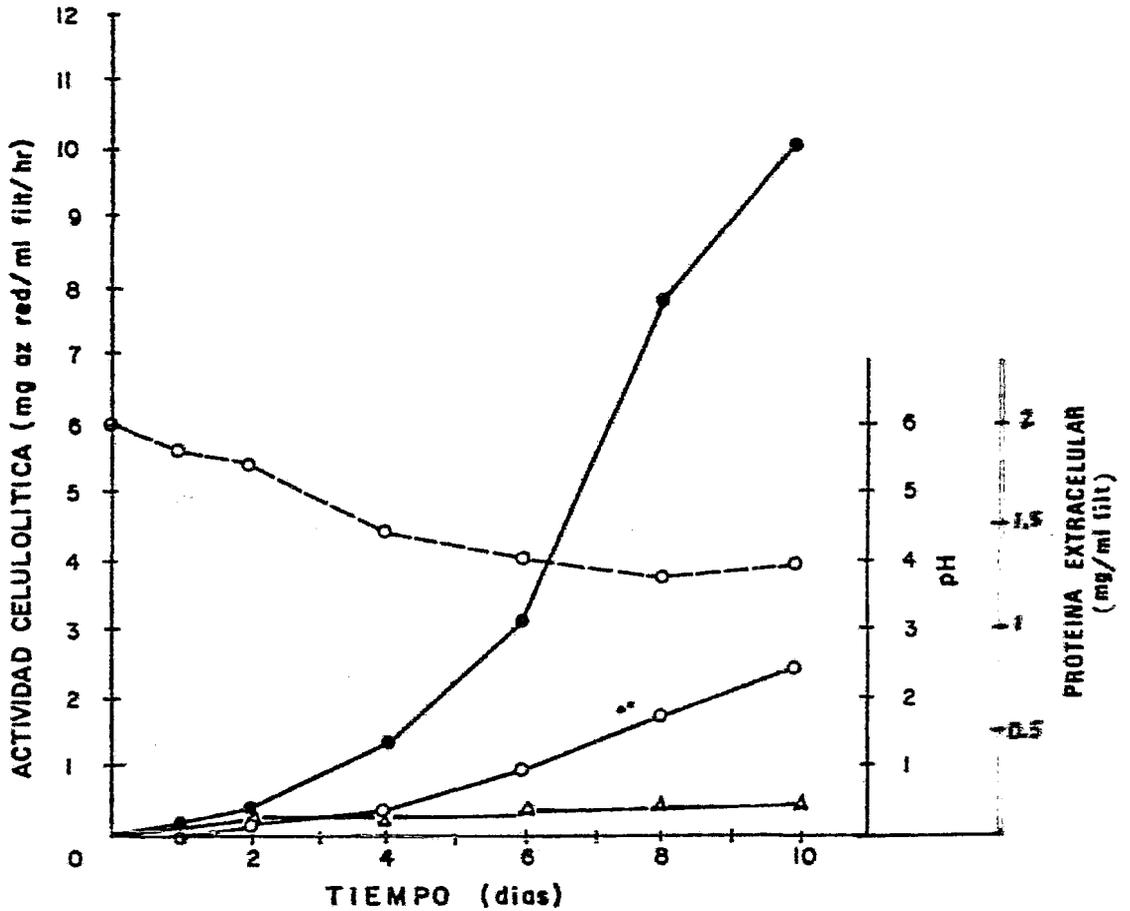


Figura 17 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-014 en medio B con celulosa microcristalina al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína extracelular.

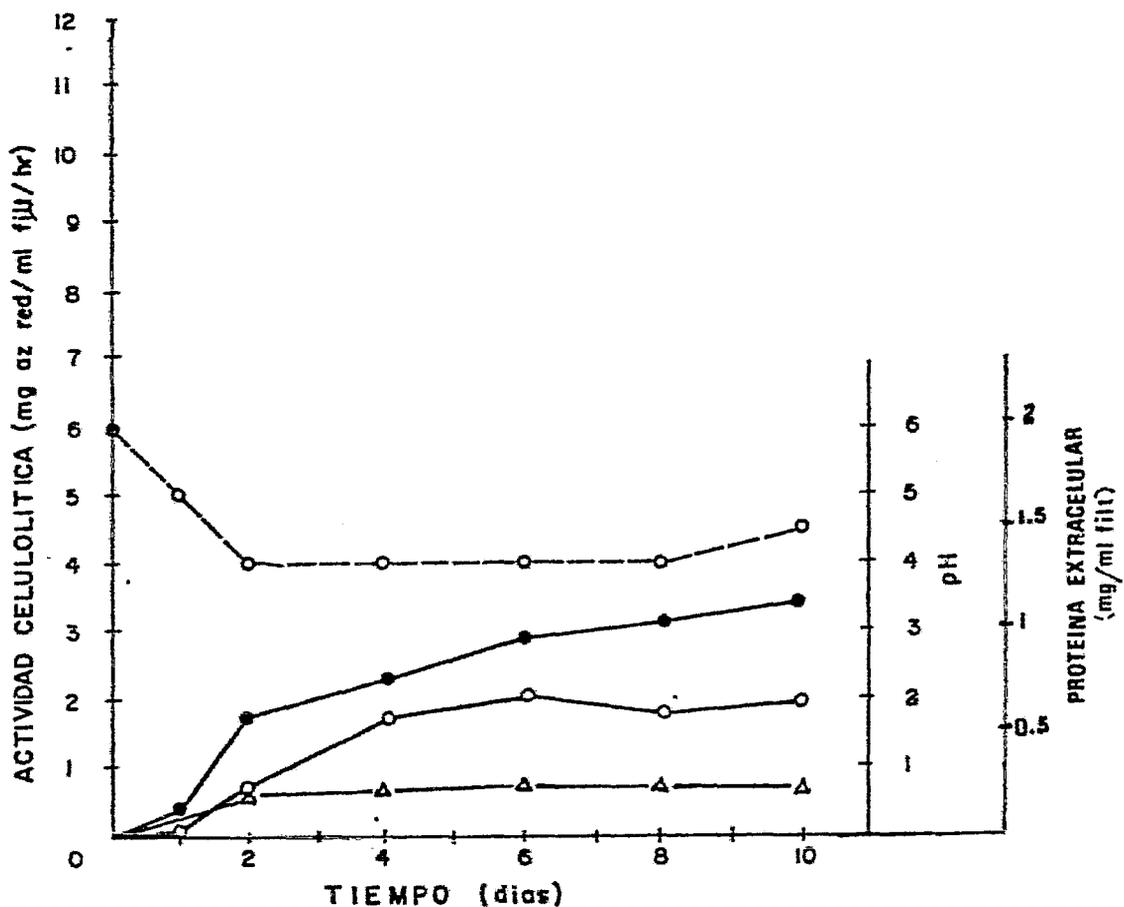


Figura 18 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de Aureobasidium sp. en medio B con celulosa microcristalina al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína extracelular.

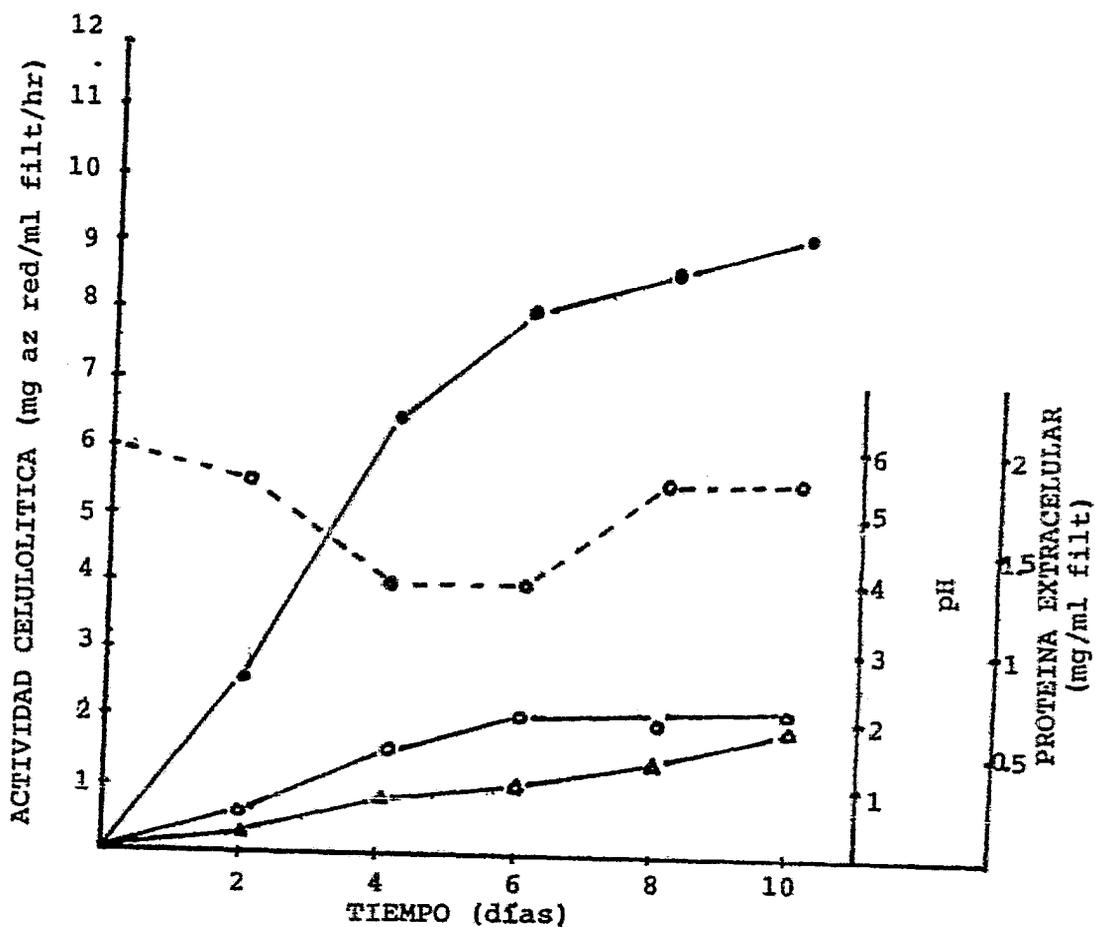


Figura 31 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de Trichoderma viride QM 6 a en medio B con celulosa microcristalina al 1% como fuente de carbono. (○) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (▲) Proteína extracelular.

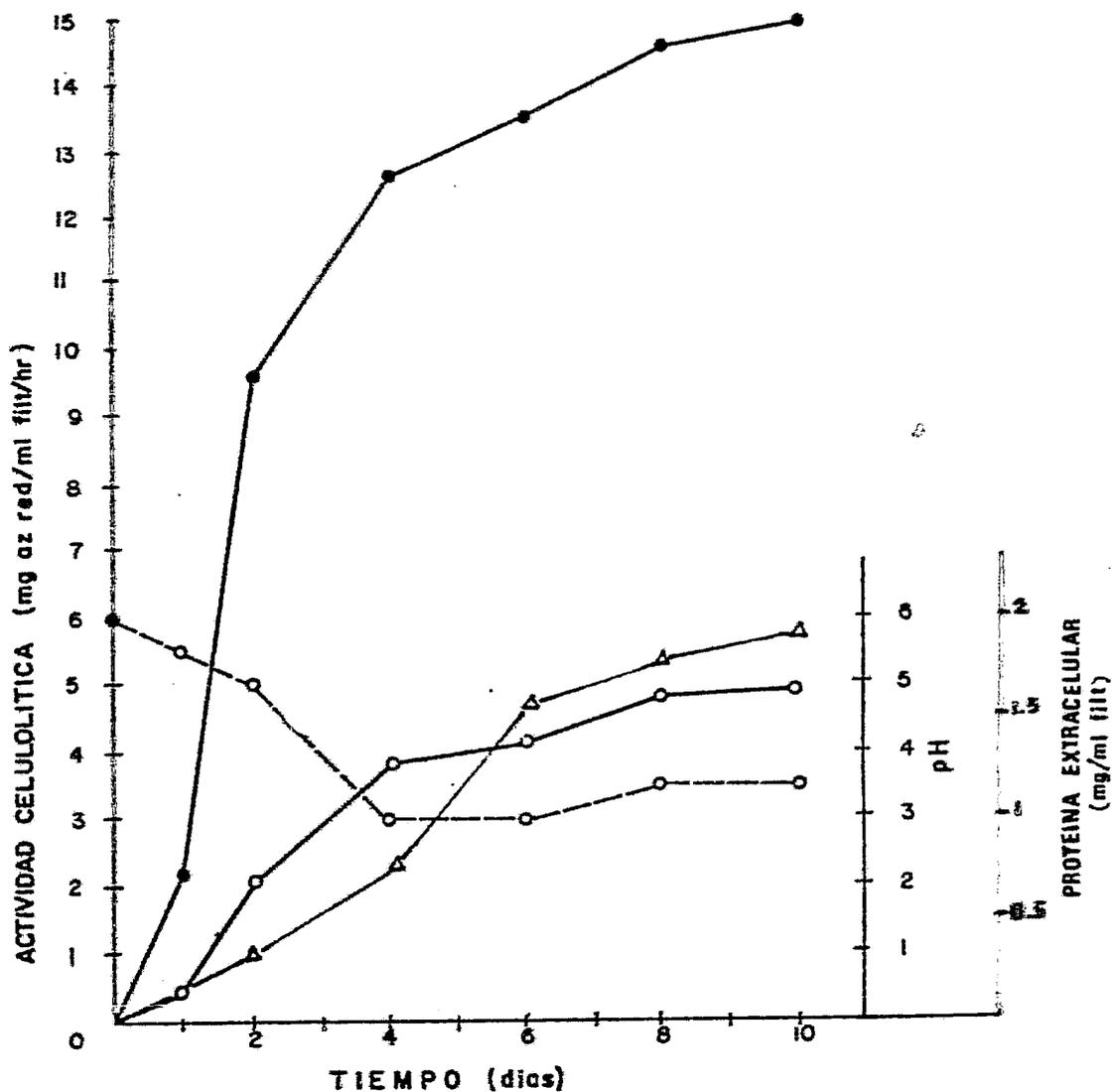


Figura 20 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de Trichoderma viride QM 9414 en medio B con celulosa microcristalina al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína extracelular.

Producción de actividad celulolítica utilizando bagacillo de caña como fuente de carbono.

Los desechos celulósicos contienen varios tipos de carbohidratos y cuando las enzimas son producidas para la hidrólisis de tal material en particular es deseable el uso del mismo material de desecho como fuente de carbono para inducir la síntesis de las enzimas apropiadas para su hidrólisis (Enari y Markkanen, 1977) por lo que la enzima puede ser producida en el mismo material celulósico que vaya a ser usado posteriormente para la producción de azúcares por una reacción de sacarificación considerando contar con el apropiado sistema enzimático que contenga todos los componentes necesarios para el aprovechamiento de este sustrato en particular.

El procedimiento utilizado fué similar al empleado con celulosa microcristalina siguiendo la producción de actividad durante 10 días midiendo también la variación del pH en el medio de cultivo y la producción de proteína extracelular utilizando las mismas cepas seleccionadas por la actividad producida en celulosa microcristalina. Los resultados obtenidos se presentan en las gráficas respectivas (figuras 21 a la 32) de donde es posible apreciar que si bien la producción de actividad en este material es menor a la obtenida con celulosa microcristalina es necesario tomar en cuenta que el contenido de celulosa disponible en el bagacillo es aproximadamente la mitad con respecto a la celulosa microcristalina que además es un material puro, por lo que tal vez se debería intentar utilizar el doble de concentración de bagacillo para intentar obtener la misma proporción de actividad; sin embargo, se sigue el mismo patrón

de comportamiento en lo que se refiere a producción de actividad y secreción de proteína extracelular aunque en lo que se refiere a la cantidad presente en el filtrado ésta es de aproximadamente el doble para las cepas probadas incluyendo la de Aureobasidium sp manteniéndose la misma cantidad en la cepa de Trichoderma viride QM 6a y disminuyendo únicamente alrededor de un 50% para la cepa QM 9414 lo cual se reflejó invariablemente en la actividad obtenida, puesto que la actividad manifestada por la misma ha sido relacionada con la cantidad de proteína extracelular presente (Sternberg, 1976).

En lo que se refiere al pH del medio, éste no varió durante el tiempo de producción por lo que es posible considerar que la disminución de la actividad celulolítica producida podría deberse a un efecto de pH, sin embargo no se pueden descartar otras posibilidades como serían que con este sustrato se produzca una mayor cantidad de azúcares solubles los cuales reprimen la síntesis del sistema celulolítico completo o de alguno de sus componentes como sucede con T. viride (Gupta, 1972). La producción de ácido está directamente relacionada con la velocidad de consumo de carbohidratos, dependiendo de la cantidad de carbohidrato consumido, el pH varía por la secreción de compuestos amoniacales o bien por el consumo de ácidos formados durante la fase de crecimiento. Durante la fase de producción de ácidos, cuando la actividad metabólica es alta, las celulasas son inducidas, por lo que la producción de ácidos, también representa una función regulatoria (Mandels, et al 1975).

Aunque en presencia de este material se obtuvo una menor actividad celulolítica comparada a la obtenida con celulosa microcristalina, se decidió continuar con su utilización para fines de sacarificación debido a

que es un desecho agroindustrial abundante y de bajo costo en cambio la celulosa microcristalina al igual que otros materiales de este tipo, son por lo general purificados y por lo mismo resultan costosos, por lo cual su utilización en la producción de enzimas a gran escala incrementaría los costos.

Con respecto a una comparación entre la actividad obtenida por las diversas cepas utilizadas y las de referencia es notorio que es mayor en la cepa mutante de T. viride QM 9414 pero con respecto a la cepa silvestre QM 6a y la de Aureobasidium sp existe una producción muy similar en el caso de la actividad de papel filtro para la mayoría de las cepas seleccionadas pero sobresalen por su actividad sobre carboximetilcelulosa en lo que se refiere a tiempos cortos de fermentación tanto la cepa TE-006 como la TE-013 las cuales fueron por lo mismo seleccionadas puesto que cuando fueron probadas en celulosa microcristalina mostraron un perfil de producción de esa actividad elevado para tiempos cortos de fermentación efecto mantenido sólo en lo que a cantidad se refiere ya que se produjo alrededor de un 77% de la misma. Los resultados obtenidos a los 6 días de fermentación para todas las cepas seleccionadas son presentados en la tabla 11 de donde es notorio que otro factor que no sufre variación significativa es la relación existente entre la actividad producida en papel filtro y carboximetilcelulosa comparando con los patrones de comportamiento a este respecto obtenidos cuando se empleó la celulosa microcristalina como sustrato inductor de la producción de actividad celulolítica lo cual indica que el bagacillo de caña es un material lo

suficientemente heterogéneo con capacidad suficiente para inducir ambos tipos de actividad en forma similar que cuando se usa un material puro.

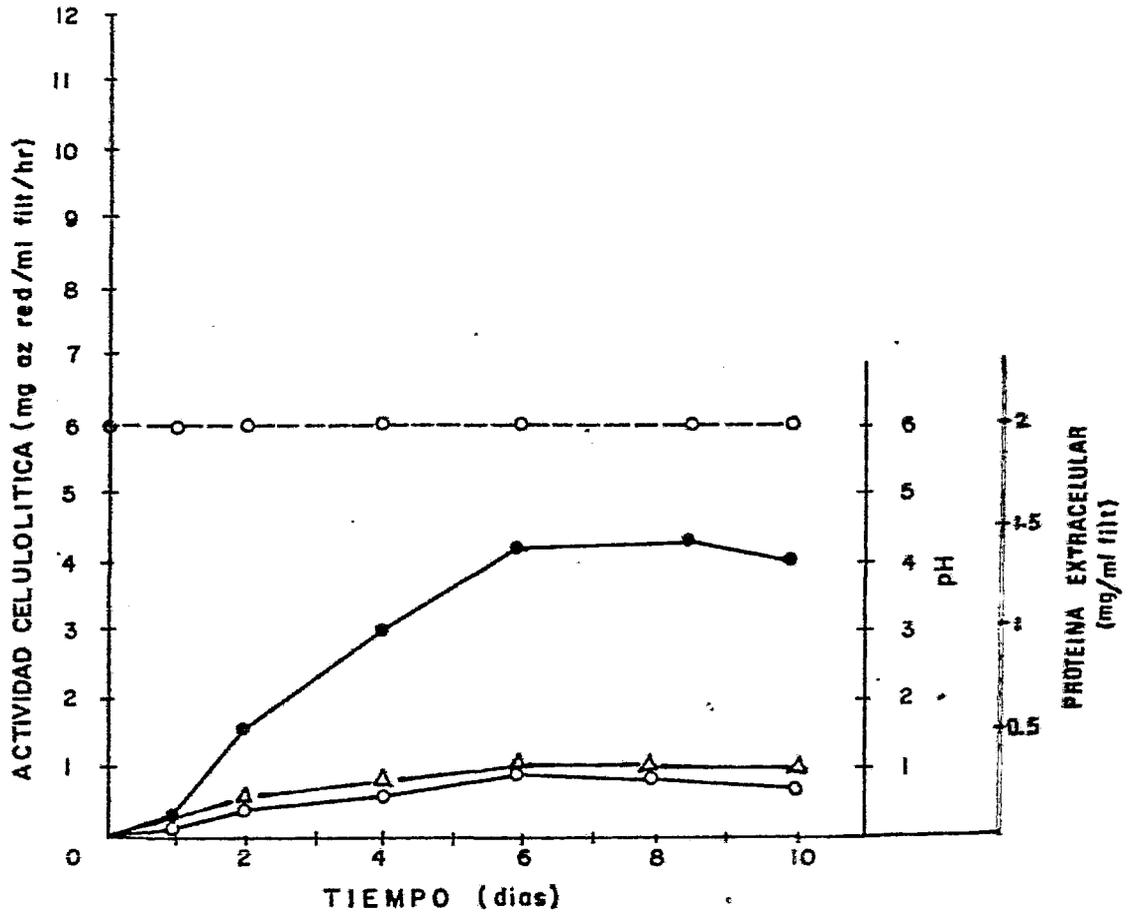


Figura. 21 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-001 en medio B con bagazo no tratado al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína extracelular.

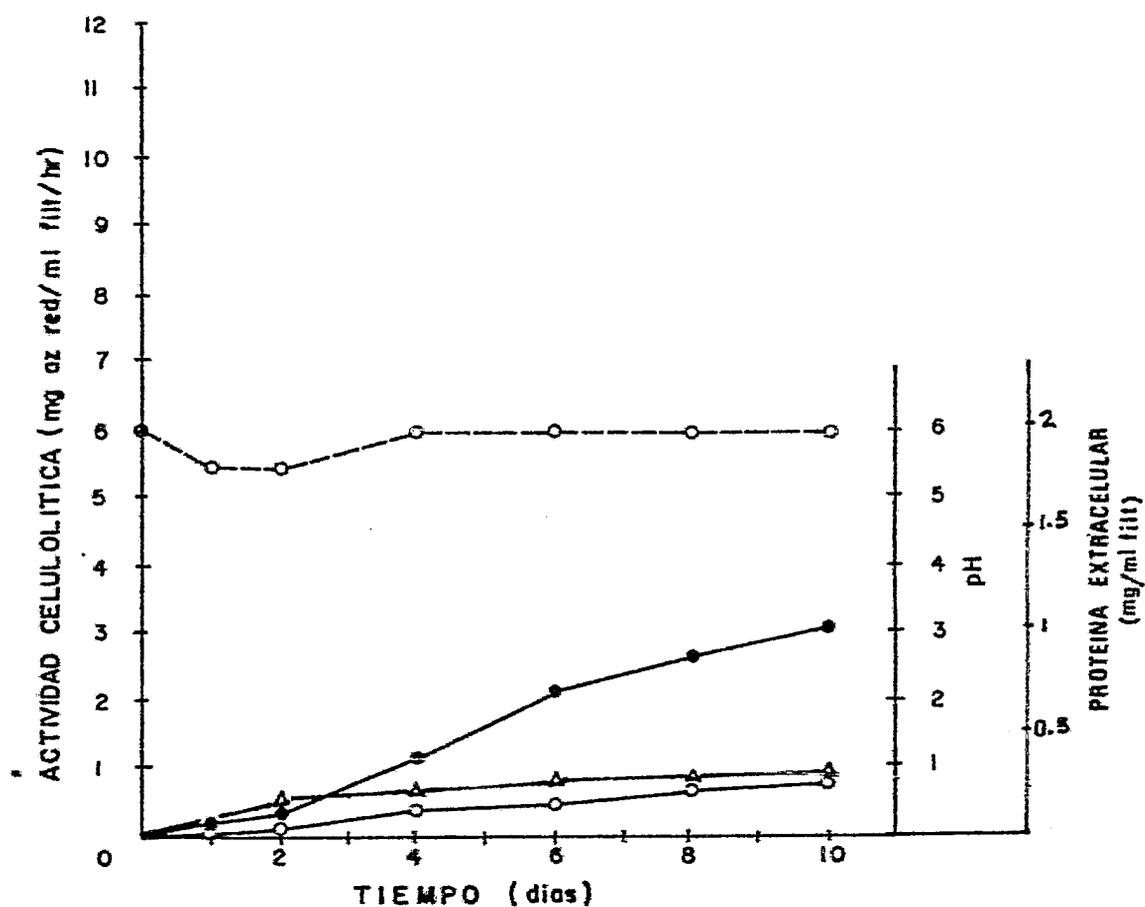


Figura. 22 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-002 en medio B con bagazo no tratado al 1% como fuente de carbono. (○) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína extracelular.

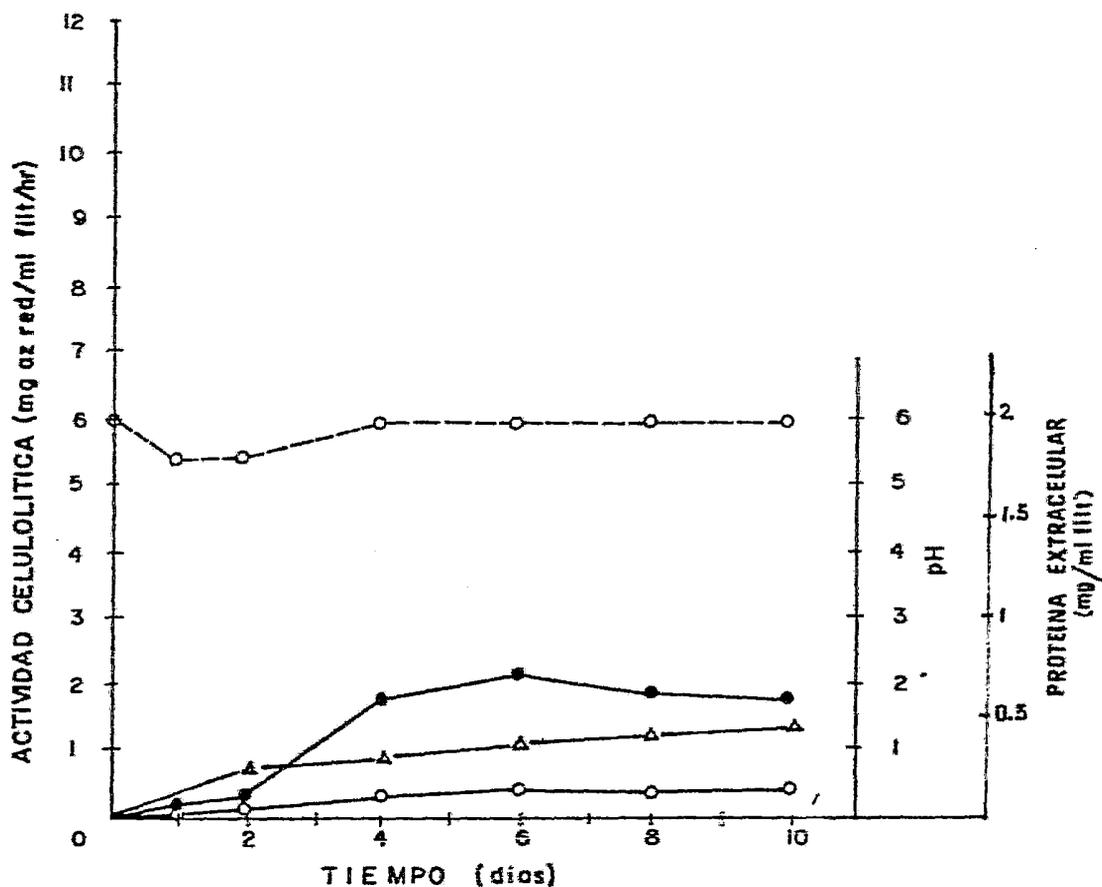


Figura. 23 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-004 en medio B con bagazo no tratado al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína extracelular.

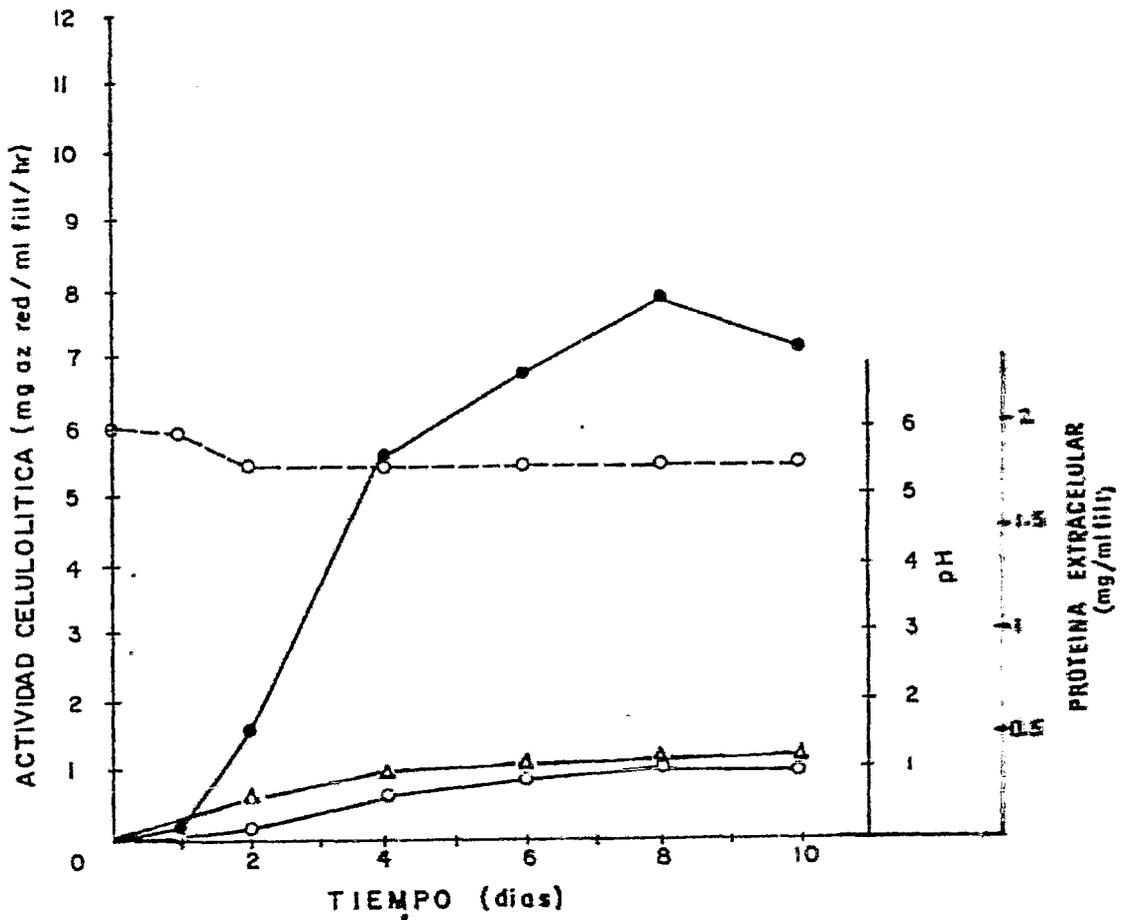


Figura. 24 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-006 en medio B con bagazo no tratado al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína Extracelular.

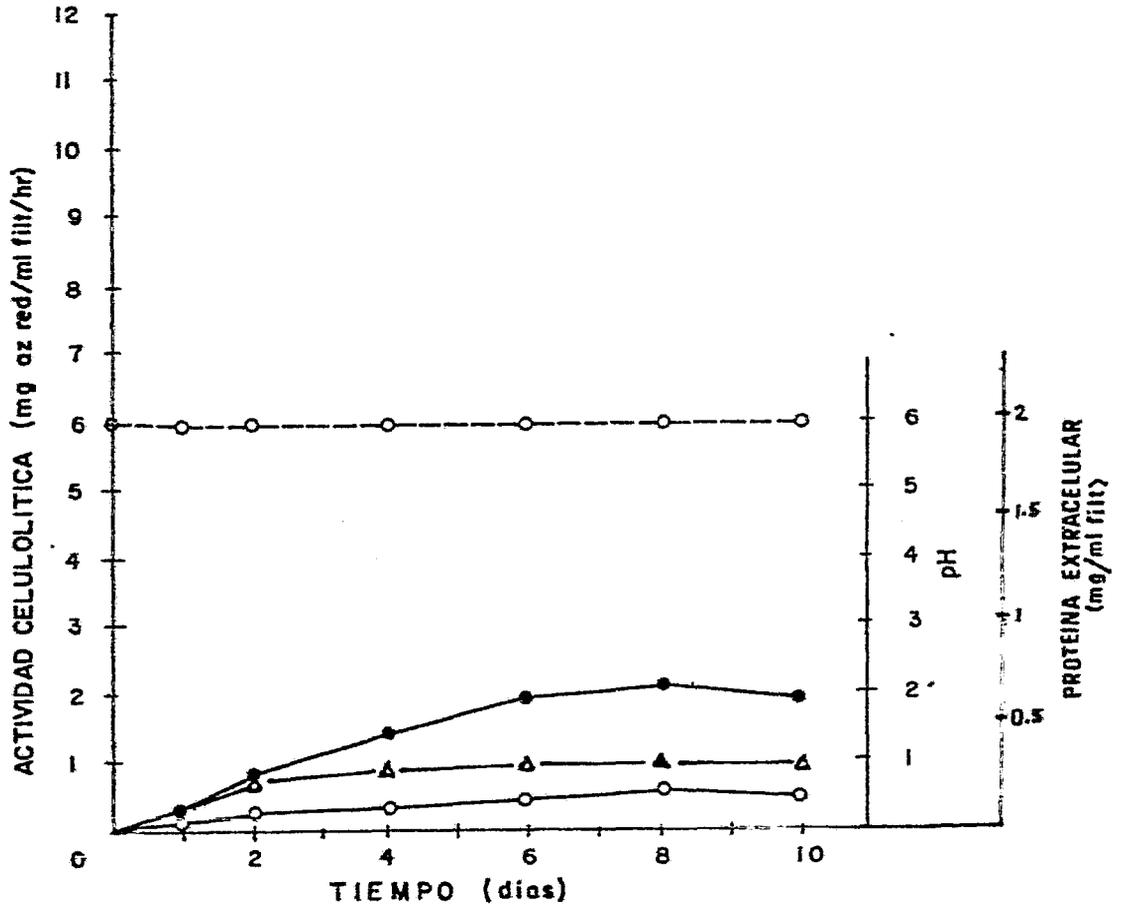


Figura. 25 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-008 en medio B con bagazo no tratado al 1% como fuente de carbono. (○) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína Extracelular.

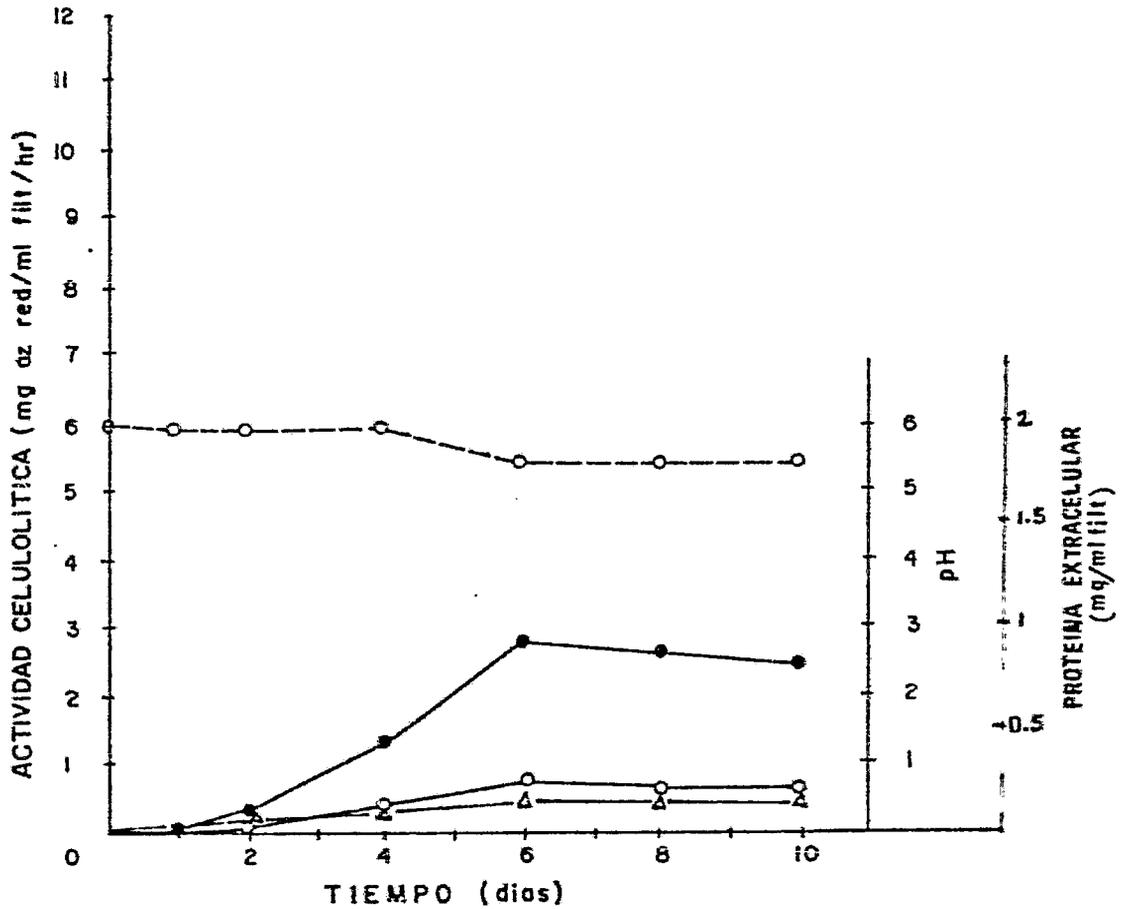


Figura. 26 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-010 en medio B con bagazo no tratado al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína Extracelular.

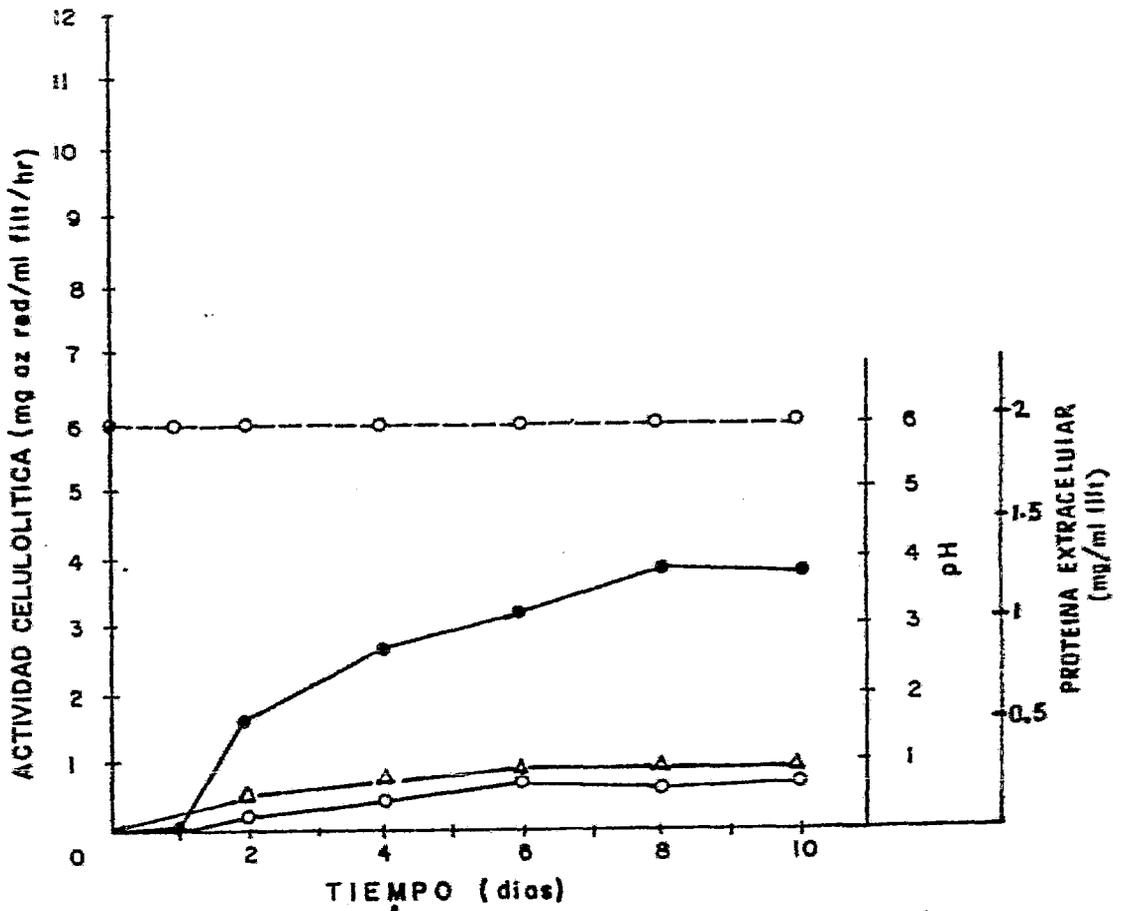


Figura. 27 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-011 en medio B con bagazo no tratado al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína Extracelular.

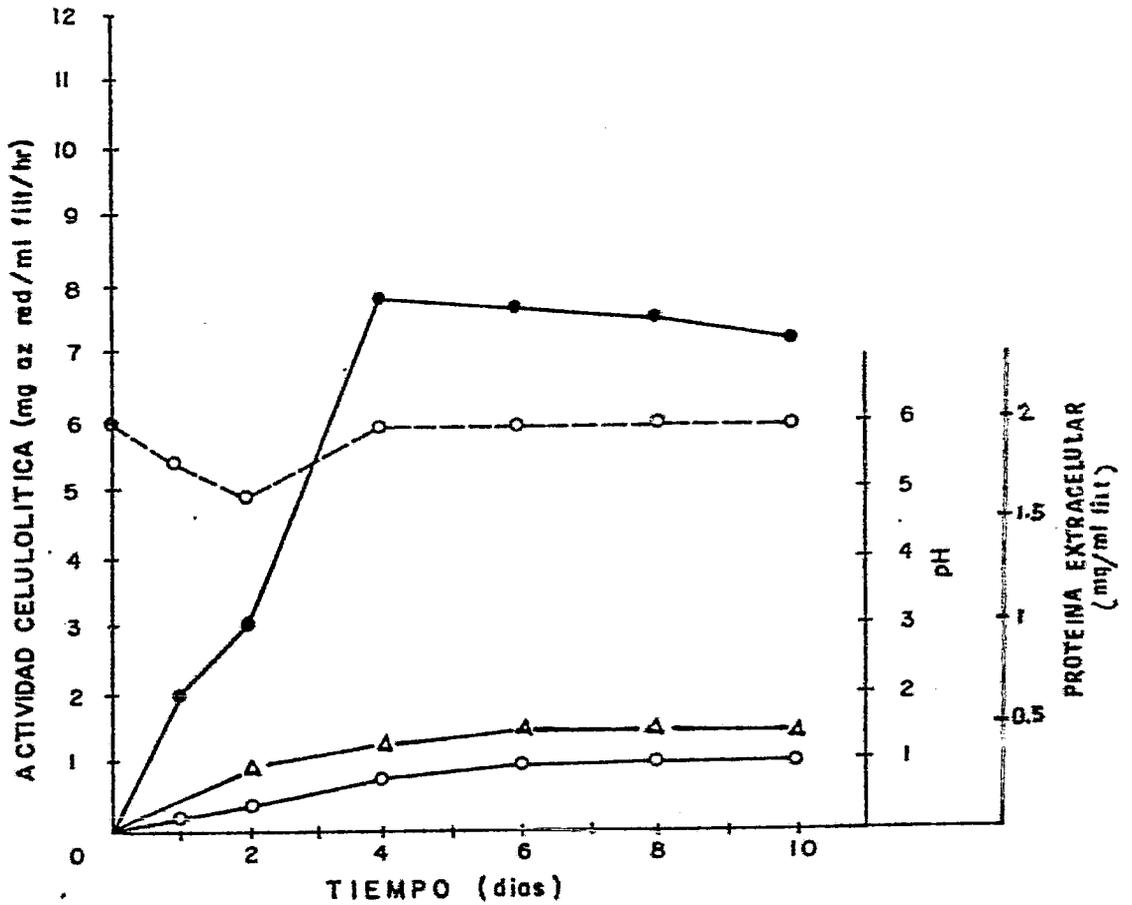


Figura. 23 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-013 en medio B con bagazo no tratado al 1% como fuente de carbono. (○) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína Extracelular.

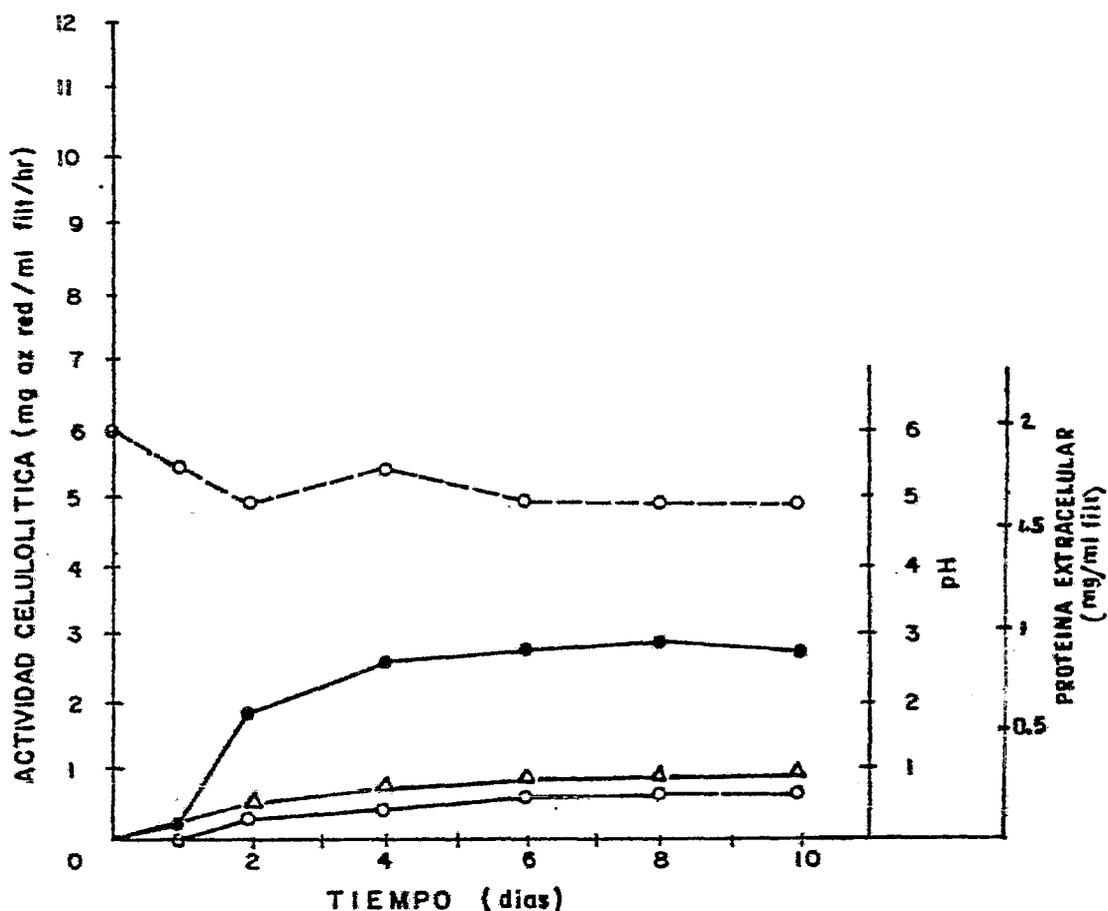


Figura. 29 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de la cepa TE-014 en medio B con bagazo no tratado al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína Extracelular.

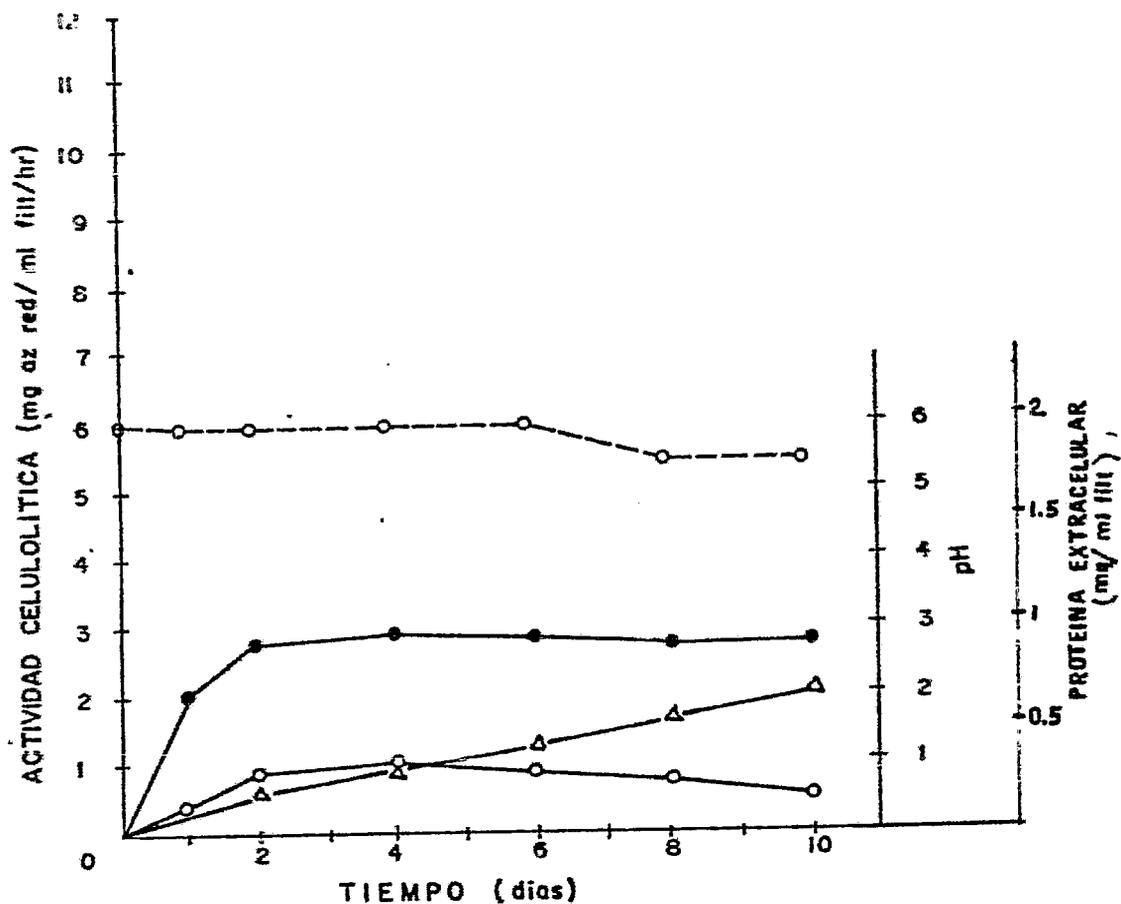


Figura 30 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de Aureobasidium sp. en medio B con bagazo no tratado al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína Extracelular.

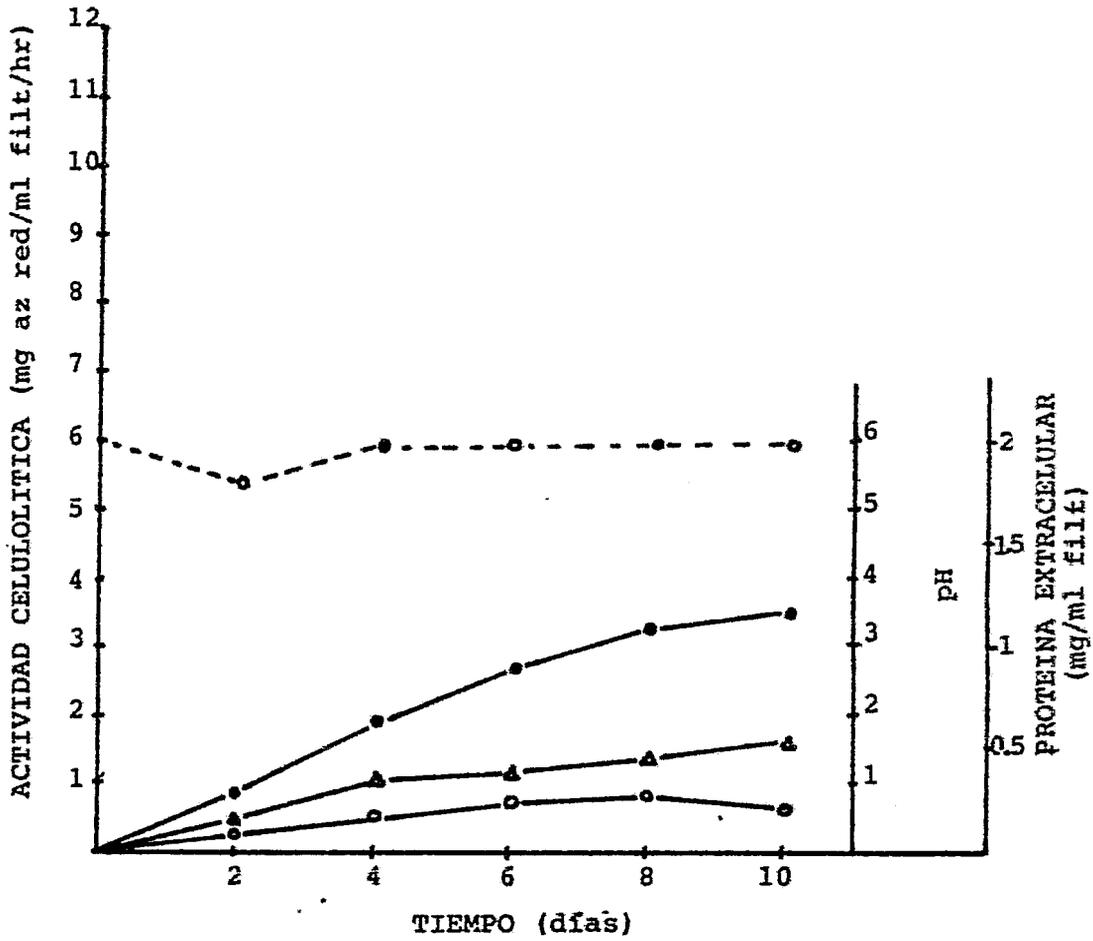


Figura 19 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de Trichoderma viride QM 6a en medio con bagazo no tratado al 1% como fuente de carbono. (○) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (△) Proteína extracelular.

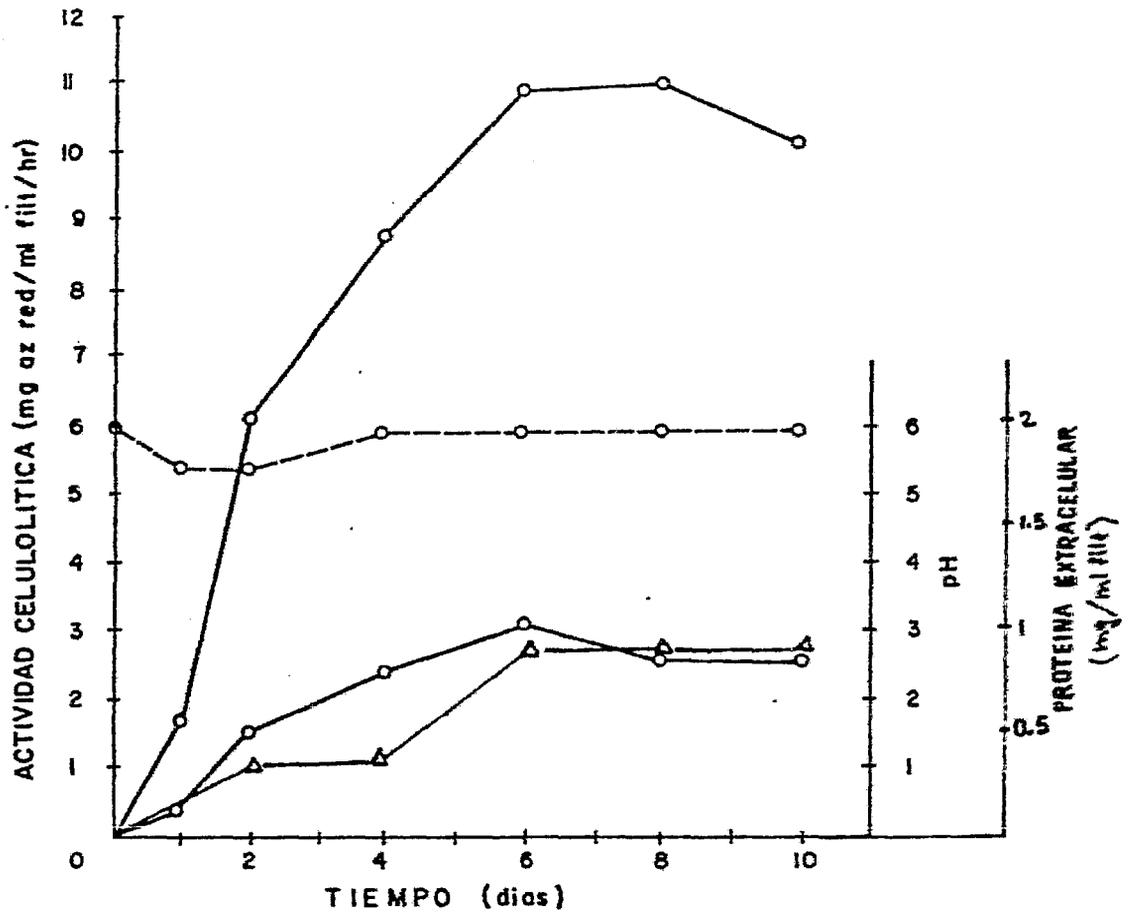


Figura 32 Producción de actividad celulolítica extracelular y variación del pH en el filtrado producido por el cultivo de *Trichoderma viride* QM 9414 en medio B con bagazo no tratado al 1% como fuente de carbono. (o) Actividad sobre papel filtro. (●) Actividad sobre CMC. (---) Variación del pH. (Δ) Proteína Extracelular.

Comparación de los filtrados producidos en base a la actividad celulo-
lítica excretada al medio de fermentación con celulosa microcristalina o
bagacillo de caña.

De acuerdo al perfil de producción de actividad en ambos tipos de sus-
tratos se consideró conveniente evaluar inicialmente la actividad presente
en el filtrado obtenido del cultivo de cada hongo a los 6 días de fermen-
tación considerando este lapso de tiempo razonable para la manifestación
de casi toda la actividad ya que las variaciones posteriores no resultan
significativas. Los datos son los mencionados en las Tablas 10 y 11
comparándose en ambos casos la relación con respecto a los cultivos de
referencia de Aureobasidium sp y Trichoderma viride. Siguiendo este cri-
terio y de acuerdo a la actividad máxima producida fueron seleccionadas
las cepas TE-001, TE-006, TE-013. Las dos primeras fueron aisladas en
medio con celulosa microcristalina y seleccionadas de acuerdo a la velo-
cidad de disgregación del papel filtro y la última aislada y seleccionada
por su desarrollo en medio líquido y sólido con carboximetilcelulosa. En
las figuras 33 y 34, es posible apreciar en conjunto la actividad produ-
cida por las cepas seleccionadas y las de referencia.

El criterio empleado para la cepa TE-001 fué la actividad producida
sobre papel filtro en el medio con celulosa microcristalina correspon-
diendo a las cepas TE-006 y TE-013 la actividad presente en los filtra-
dos al actuar sobre carboximetilcelulosa que si bien no es la máxima
durante el perfil de producción, el criterio para su selección e npleado
fué que manifestaron la mayor actividad sobre este sustrato en un lap-
so de 48 hrs de fermentación sobre todo la TE-013 lo cual es una -

característica sobresaliente para evaluar en reacciones de sacarificación de materiales celulósicos de tipo agrícola como el bagacillo de caña puesto que contienen bastantes zonas amorfas sobre las que se manifiesta este tipo de actividad sobre todo para el uso de esta cepa que fué aislada siguiendo este criterio de selección aunque también posee actividad significativa sobre celulosa de tipo cristalino que se manifiesta a mayor tiempo de fermentación con lo cual es posible establecer que los filtrados del cultivo de varios hongos poseen cantidades variables de los diferentes componentes del sistema enzimático.

De hecho, la cantidad de proteína extracelular presente en los filtrados evaluados es variable y hay una diferencia significativa con respecto a la cepa de Trichoderma viride QM 9414 lo cual se refleja en la actividad específica obtenida por lo que resulta notorio que para esta cepa el aumento en su producción logrado es debido aparentemente a la cantidad de proteína excretada más que a una alteración en la actividad específica de las enzimas la cual sí es comparada con las demás cepas evaluadas y aún con la cepa silvestre QM 6a es menor independientemente de la fuente de carbono utilizada para la producción de la actividad celulólitica (Tablas 10 y 11) lo cual es debido a que el incremento en la cantidad de proteína extracelular por esta mutante corresponde al aumento en la actividad celulólitica que produce (Sternberg, 1976) por lo que posteriores incrementos por mutagénesis pueden ser posibles. Este comportamiento puede ser extrapolado a las cepas utilizadas en este trabajo las cuales presentaron una actividad específica variable dependiendo del material utilizado en la producción de actividad resultando menor en los filtrados obtenidos con bagacillo de

caña ya que aquí la proteína extracelular producida fué aproximadamente el doble que en celulosa microcristalina por lo mismo llegar a contar con cepas que posean un mayor porcentaje de proteína extracelular como celulasa activa podría significar igualar o superar a la actividad de la cepa de Trichoderma QM 9414 con lo cual se mejoraría también la eficiencia de la reacción de sacarificación puesto que aún no resulta económicamente competitiva la producción de glucosa a partir de celulosa, debido en parte a la baja actividad específica de las celulasas obtenidas (Dewey, et al 1930).

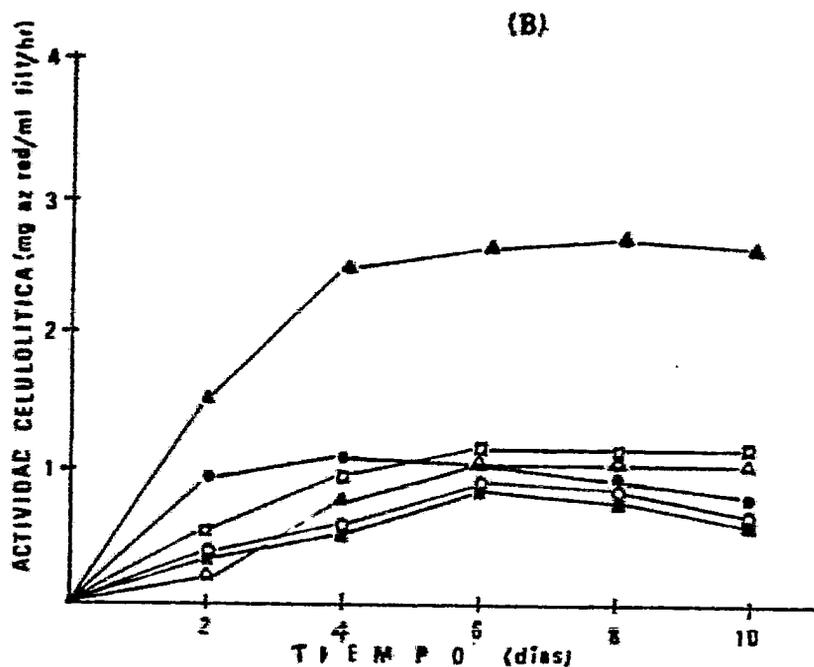
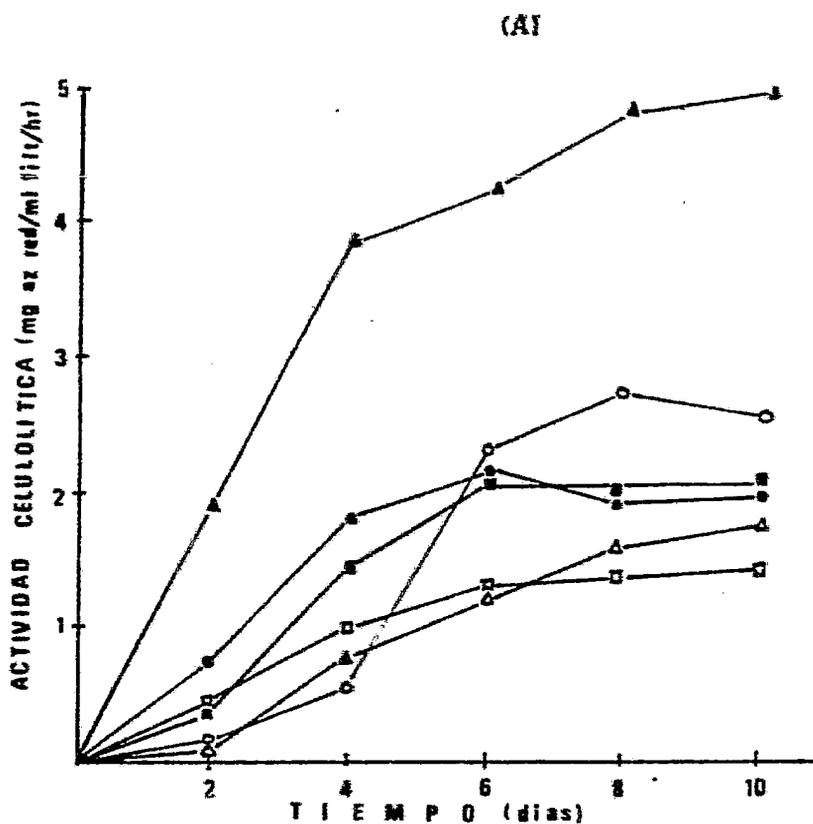
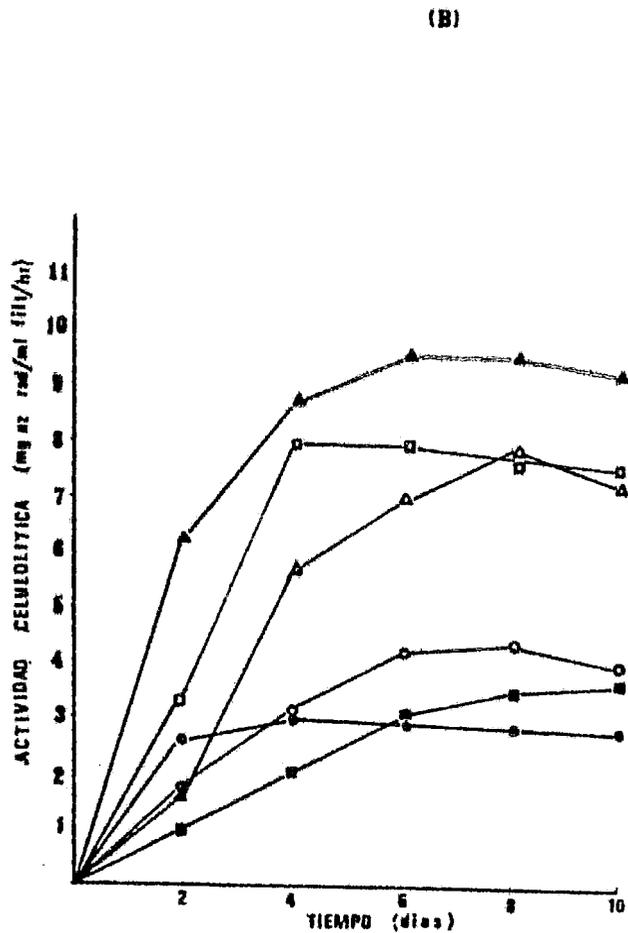
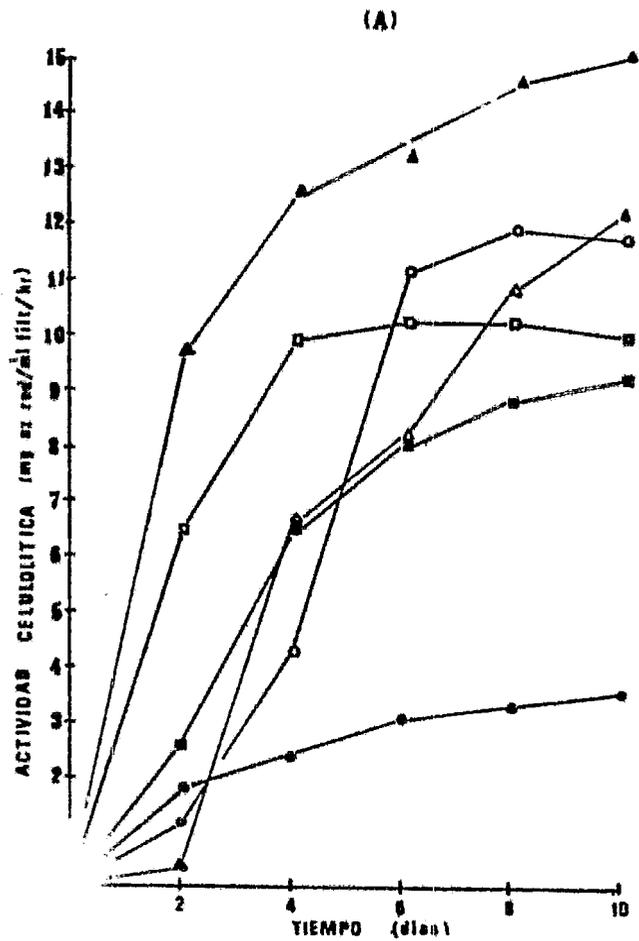


Fig. 33 Producción de actividad sobre papel filtro por tres de los hongos aislados TE-001 (o), TE-006 (Δ), TE-013 (◻); *Aureobasidium* sp (●); y *Trichoderma viride* QM 6a (◼); QM 9414 (▲). (A) En medio con celulosa microcristalina; (B) en medio con bagacillo de caña no tratado.



34 Producción de actividad sobre carboximetilcelulosa por tres de los hongos aislados TE-001 (○), TE-006 (△), TE-013 (□); *Aureobasidium* sp (●) y *Trichoderma viride* QM 6a (■); QM 9414 (▲) (A) En medio con celulosa microcristalina; (B) en medio con bagacillo de caña no tratado.

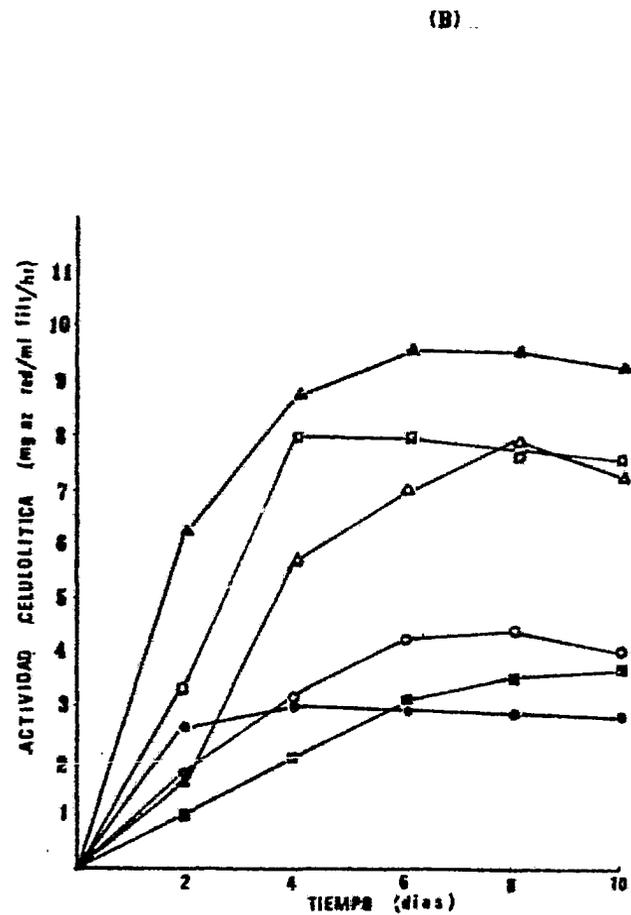
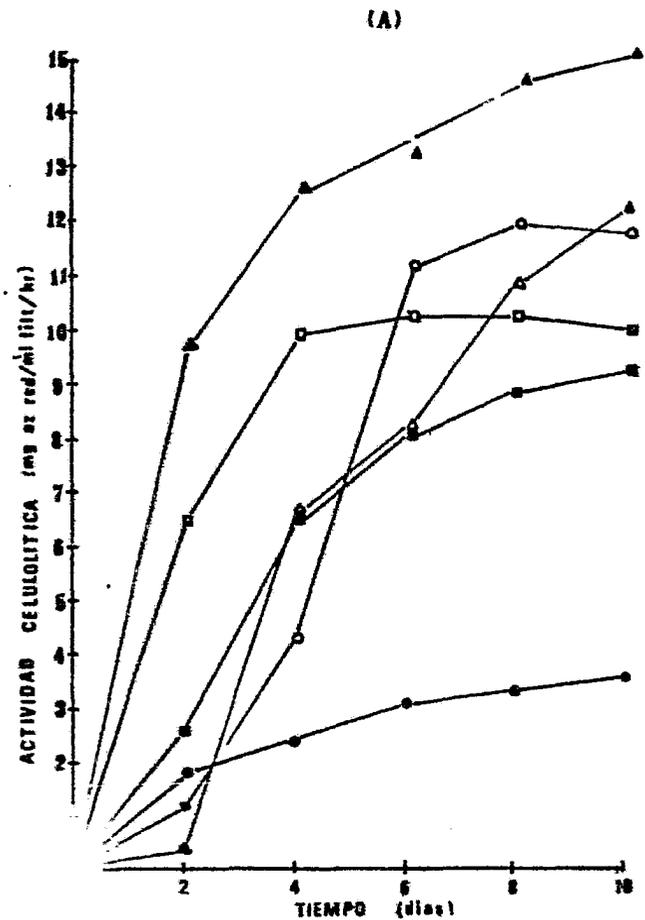
TABLA 10

PRODUCCION DE CELULASAS^a Y PROTEINA EXTRACELULAR.

CEPA	Actividad celulolftica ^b (mg az red/ml filt/hr)		Protefna Extracelular. (mg/ml filt)	Actividad Especifica. (Act. celul./mg prot.)	
	SUTRATOS Papel filtro	CMC		SUTRATOS Papel filtro	CMC
TE-001	2.3	11.1	0.117	19.7	94.4
TE-002	2.1	10.3	0.148	11.5	56.3
TE-004	1.8	9.8	0.183	9.8	53.6
TE-006	1.2	8.1	0.170	7.1	47.6
TE-008	2.1	10.0	0.083	25.3	120.5
TE-010	1.7	8.9	0.074	23.0	120.3
TE-011	1.3	4.9	0.123	10.6	39.8
TE-013	1.3	10.2	0.163	8.0	62.6
TE-014	1.0	3.2	0.103	9.7	31.1
<u>Aureobasidium</u> sp.	2.1	3.0	0.231	9.1	13.6
<u>T. viride</u> QM 6a	2.0	8.2	0.382	5.5	21.5
<u>T. viride</u> QM 9414	4.2	13.2	1.55	2.7	8.5

^aActividad celulolftica producida a los 6 días de fermentación en medio B con celulosa microcristalina al 1%.

^bLa actividad celulolftica se midió por la aparición de azúcares reductores a partir de papel filtro y carboximetilcelulosa.



.34 Producción de actividad sobre carboximetilcelulosa por tres de los hongos aislados TE-001 (o), TE-006 (Δ), TE-013 (◻); *Aureobasidium* sp (●) y *Trichoderma viride* QM 6a (◼); QM 9414 (▲)
 (A) En medio con celulosa microcristalina; (B) en medio con bagacillo de caña no tratado.

TABLA 10

PRODUCCION DE CELULASAS^a Y PROTEINA EXTRACELULAR.

CEPA	Actividad celulolítica ^b (mg az red/ml filt/hr)		Proteína Extracelular. (mg/ml filt)	Actividad Específica. (Act. celul./mg prot.)	
	SUTRATOS Papel filtro	CMC		SUTRATOS Papel filtro	CMC
TE-001	2.3	11.1	0.117	19.7	94.4
TE-002	2.1	10.3	0.148	11.5	56.3
TE-004	1.8	9.8	0.183	9.8	53.6
TE-006	1.2	8.1	0.170	7.1	47.6
TE-008	2.1	10.0	0.083	25.3	120.5
TE-010	1.7	8.9	0.074	23.0	120.3
TE-011	1.3	4.9	0.123	10.6	39.8
TE-013	1.3	10.2	0.163	8.0	62.6
TE-014	1.0	3.2	0.103	9.7	31.1
<u>Aureobasidium</u> sp.	2.1	3.0	0.231	9.1	13.6
<u>T. viride</u> QM 6a	2.0	8.2	0.382	5.5	21.5
<u>T. viride</u> QM 9414	4.2	13.2	1.55	2.7	8.5

^aActividad celulolítica producida a los 6 días de fermentación en medio B con celulosa microcristalina al 1%.

^bLa actividad celulolítica se midió por la aparición de azúcares reductores a partir de papel filtro y carboximetilcelulosa.

TABLA 11

PRODUCCION DE CELULASAS^a Y PROTEINA EXTRACELULAR.

CEPA	Actividad celulolítica ^b (mg az red/ml filt/hr)		Proteína Extracelular. (mg/ml filt)	Actividad Específica. (Act. celul./mg prot.)	
	SISTRATOS			SISTRATOS	
	Papel filtro	CMC		Papel filtro	CMC
TE-001	0.9	4.2	0.229	3.9	18.3
TE-002	0.5	2.2	0.273	1.8	8.1
TE-004	0.5	2.3	0.368	1.4	6.3
TE-006	1.0	6.9	0.346	2.9	19.9
TE-008	0.5	2.0	0.243	2.1	8.2
TE-010	0.7	2.9	0.159	4.4	18.2
TE-011	0.8	3.3	0.242	3.3	13.6
TE-013	1.1	7.9	0.461	2.4	17.1
TE-014	0.7	2.8	0.281	2.5	10.3
<u>Aureobasidium</u> sp.	1.0	2.9	0.401	2.5	7.2
<u>T. viride</u> QM 6a	0.8	3.0	0.353	2.3	8.5
<u>T. viride</u> QM 9414	2.6	9.4	0.875	3.0	10.7

^aActividad celulolítica producida a los 6 días de fermentación en medio B con bagacillo de caña no tratado al 1%.

^bLa actividad celulolítica se midió por la aparición de azúcares reductores a partir de papel filtro y carboximetilcelulosa.

Sacarificación de diferentes sustratos a tiempos de hidrólisis cortos.

Para la caracterización de los filtrados de las cepas seleccionadas de acuerdo a su actividad producida se llevó a cabo una hidrólisis a tiempos cortos de reacción sobre diferentes tipos de celulosas cuya estructura varía de altamente organizada a celulosas amorfas para lo cual se utilizó un sistema igual al empleado para la medición de la actividad producida. La reacción se llevó a cabo en tubos de ensayo en función del tiempo a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos tal y como se describe en materiales y métodos correspondiendo la actividad de cada filtrado a la obtenida a la hora de reacción.

De los resultados obtenidos y presentados en las figuras 35 a la 48 es posible establecer que existe una estrecha relación entre la estructura de la celulosa y la susceptibilidad al ataque enzimático correspondiendo a menor cristalinidad mayor grado de sacarificación tanto para los filtrados provenientes de medio con celulosa microcristalina como a los de bagacillo de caña y aunque los filtrados provenientes de este último realizan la reacción rápidamente en los primeros 30 minutos, ésta disminuye notablemente en los 90 minutos restantes. De hecho, no se observa un rango lineal en el que la sacarificación sea directamente proporcional al tiempo de reacción debido principalmente a las características de cristalinidad y heterogeneidad de los sustratos utilizados, aunque también puede establecerse que la velocidad de hidrólisis decrece cuando aumenta la cristalinidad del sustrato, y el grado de hidrólisis varía de acuerdo al tiempo de contacto entre las celulasas y la celulosa (Flora, 1964).

Con respecto a la diferencia entre el grado de hidrólisis y la procedencia del filtrado utilizado, ya sea de bagacillo o de celulosa microcristalina, es posible establecer que después de una hora de reacción el grado de sacarificación obtenido es muy similar en ambos casos; sin embargo esta reacción efectuada en tiempos relativamente cortos ya que el máximo fueron 2 hrs. representa sólo un porcentaje mínimo de evaluación del sustrato en particular puesto que para los fines de un propósito práctico es necesario evaluar a los filtrados bajo condiciones realistas como sería una concentración de sustrato de 10-30% durante un período de hidrólisis de 24 -48 hrs (Mandels, 1981) donde los factores como la estabilidad de la enzima y la inhibición por producto comienzan a ser importantes en la obtención de rendimientos satisfactorios aunque un punto conveniente de hacer notar es que la actividad presente en los filtrados generalmente es suficiente para realizar con ellos una sacarificación directa sin que se requiera de algún proceso o paso previo de concentración de las enzimas presentes.

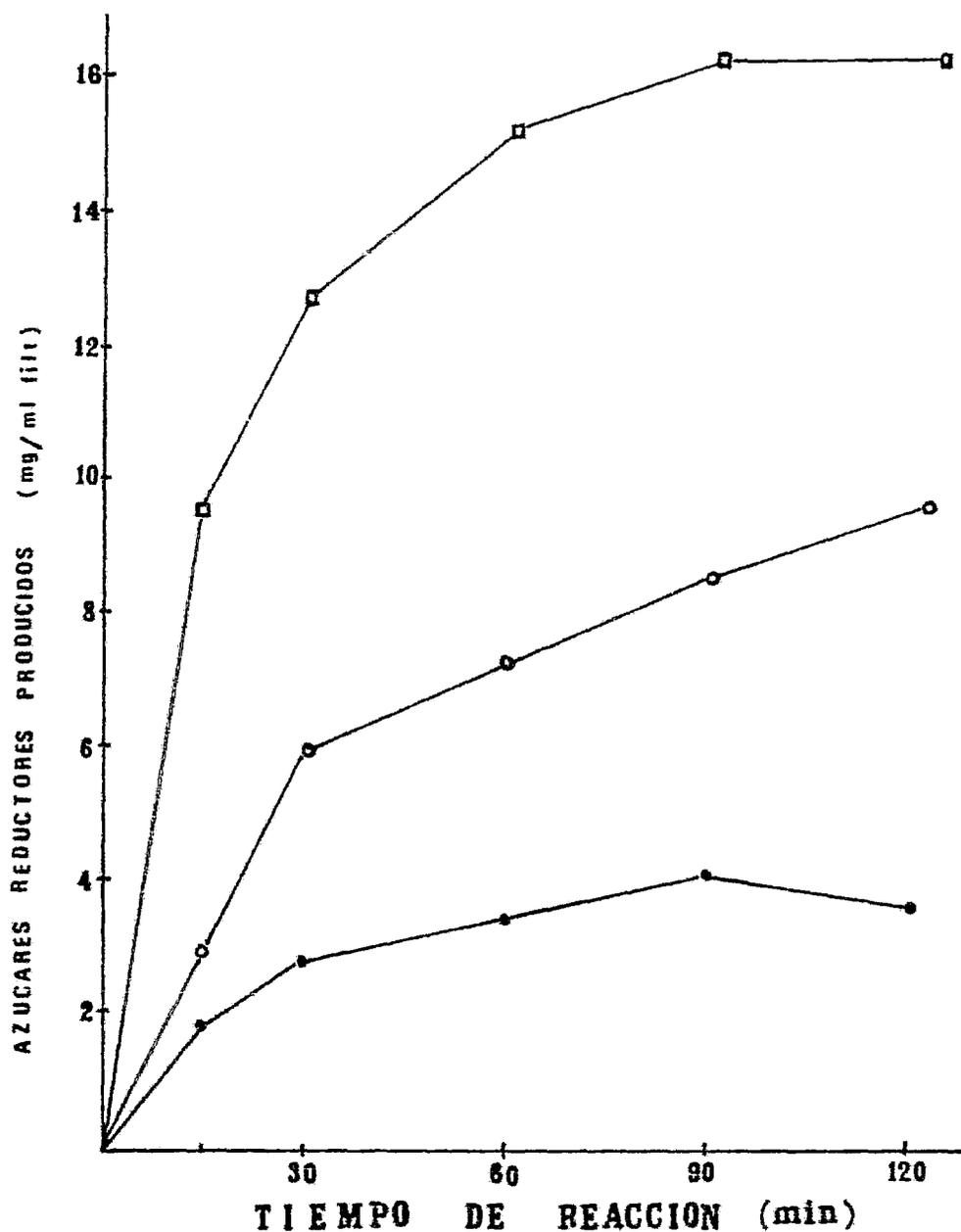


Fig 35 Sacarificación de diferentes tipos de sustratos por el filtrado celulolítico producido por la cepa TE-001 en medio B con celulosa microcristalina. Papel filtro (●), celulosa microcristalina (○), carboximetilcelulosa (◻).

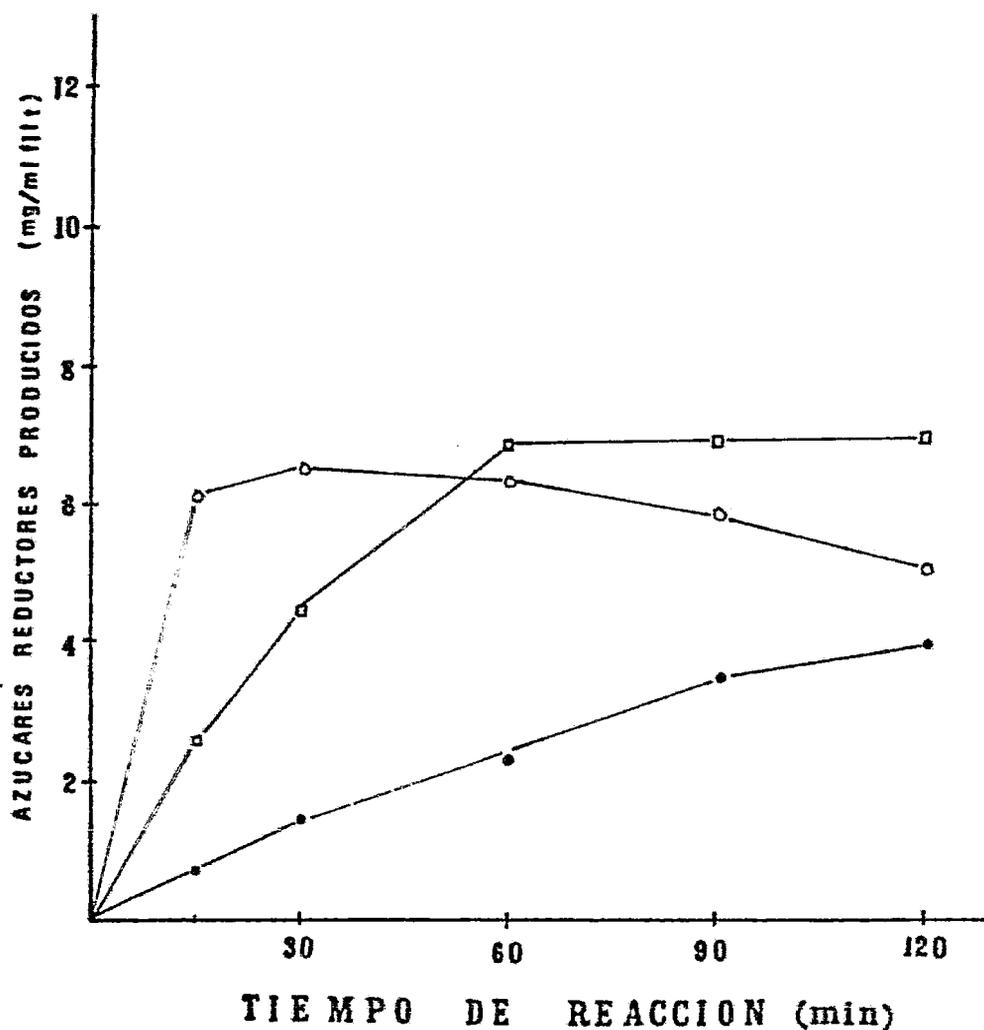


Fig.36 Sacarificación de diferentes tipos de sustratos por el filtrado celulolítico producido por la cepa TE-004 en medio B con celulosa microcristalina, Papel filtro (●), celulosa microcristalina (○), carboximetilcelulosa (□).

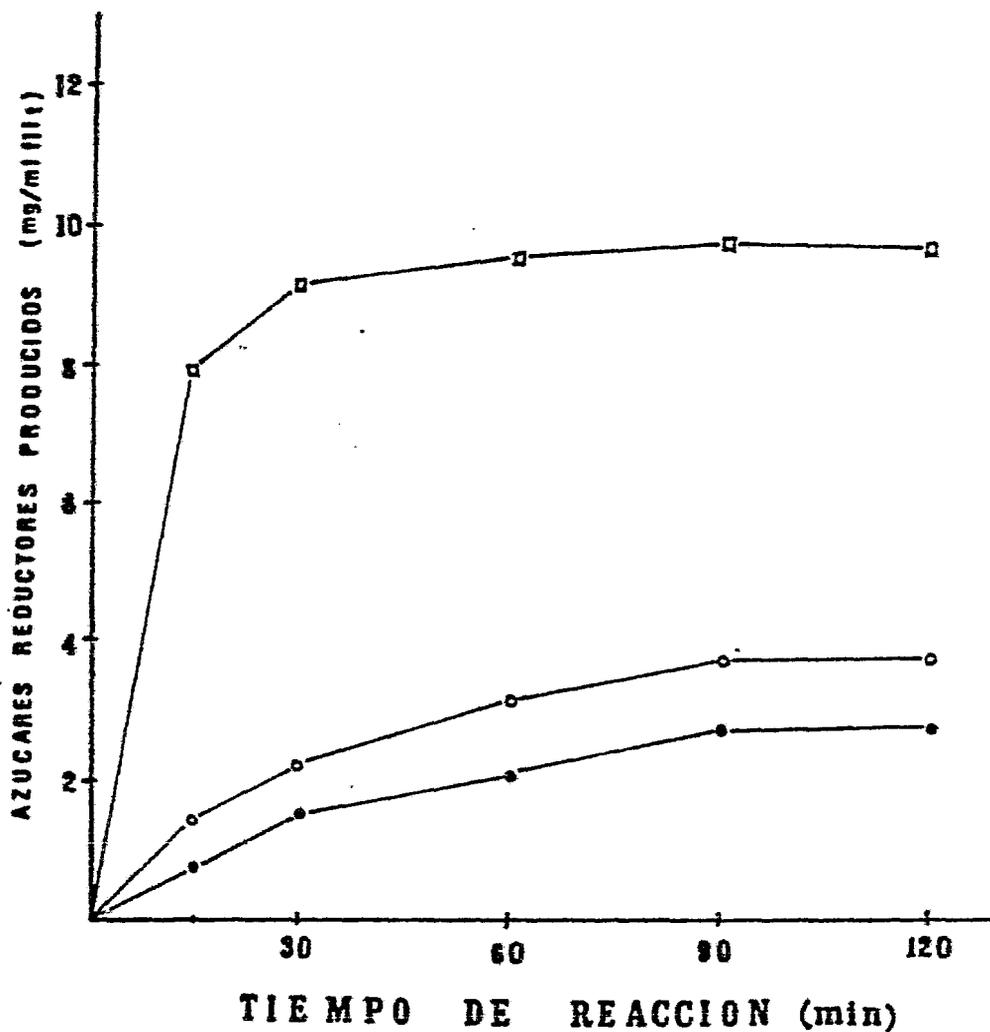


Fig.37 Sacarificación de diferentes tipos de sustratos por el filtrado celulolítico producido por la cepa TE-006 en medio B con celulosa microcristalina. Papel filtro (●), celulosa microcristalina (○), carboximetilcelulosa (□).

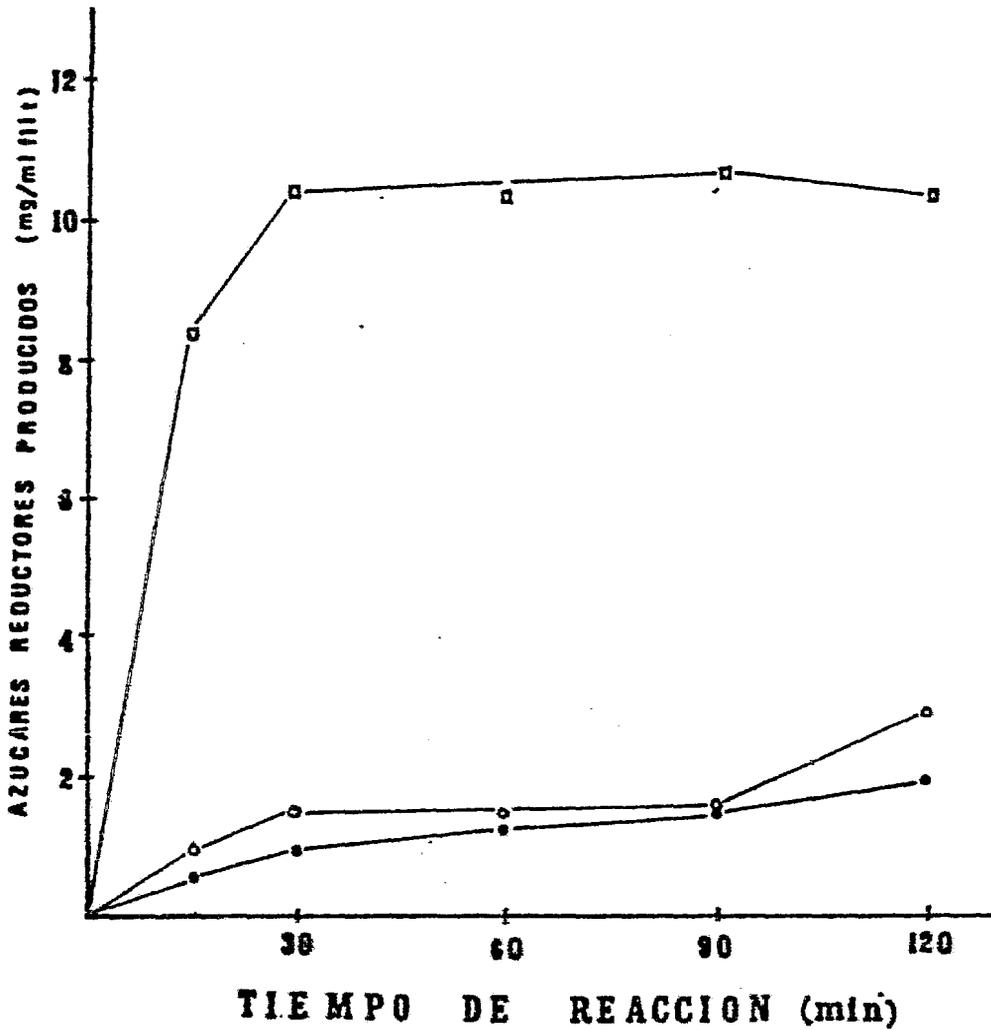


Fig. 38 Sacarificación de diferentes tipos de sustratos por el filtrado celulolítico producido por la cepa TE-013 en medio B con celulosa microcristalina. Papel filtro (●), celulosa microcristalina (○), carboximetilcelulosa(◻).

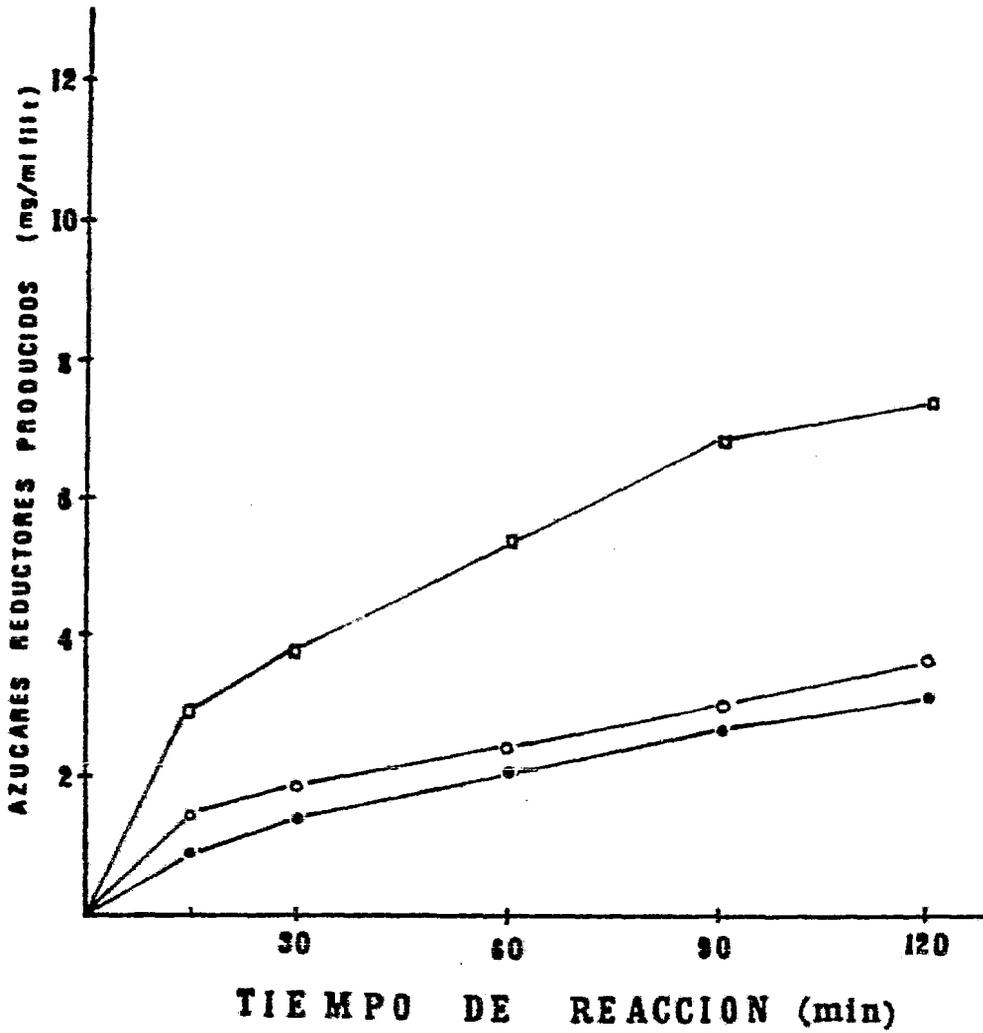


Fig. 39 Sacarificación de diferentes tipos de sustratos por el filtrado celulolítico producido por la cepa *Aureobasidium* sp en medio 3 con celulosa microcristalina. Papel filtro (●), celulosa microcristalina (○), carboximetilcelulosa (□).

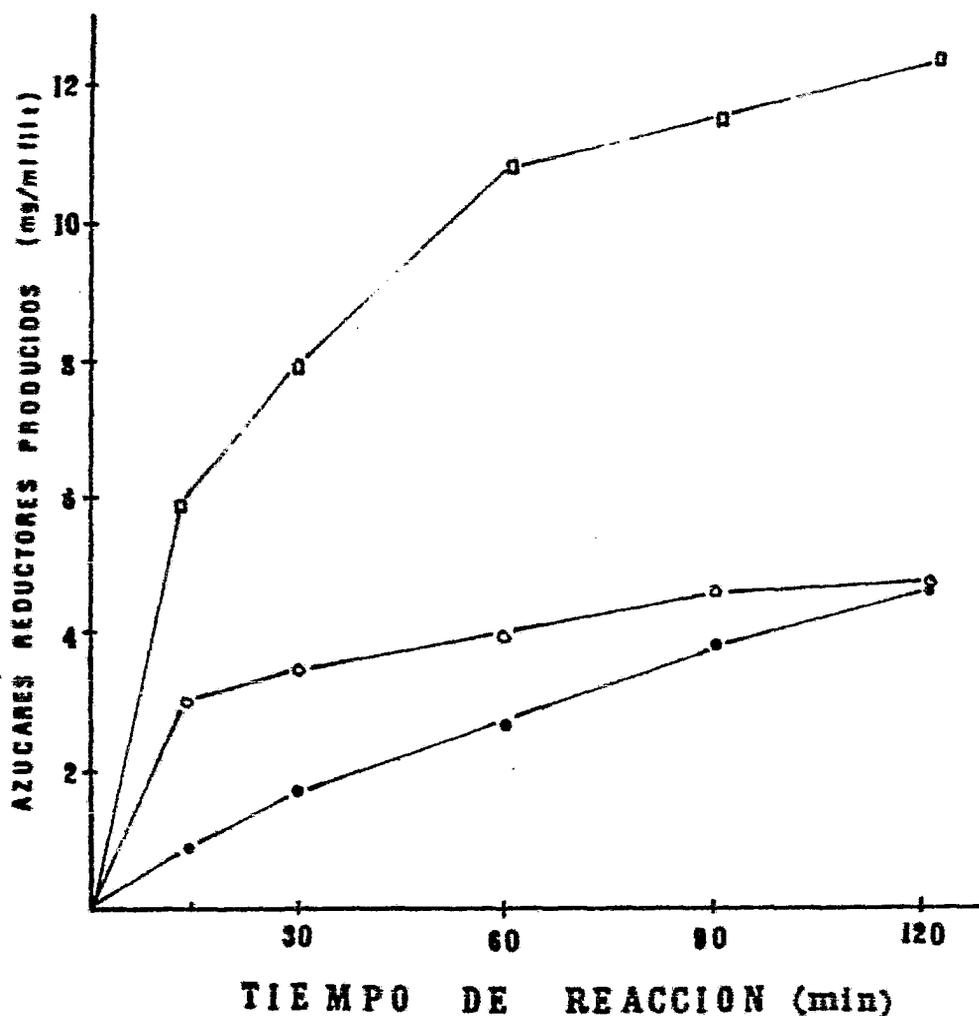


Fig. 40 Sacarificación de diferentes tipos de sustratos por el filtrado celuloilítico producido por la cepa *Trichoderma viride* QM 6a en medio B con celulosa microcristalina. Papel filtro (●), celulosa microcristalina (○), carboximetilcelulosa (◻).

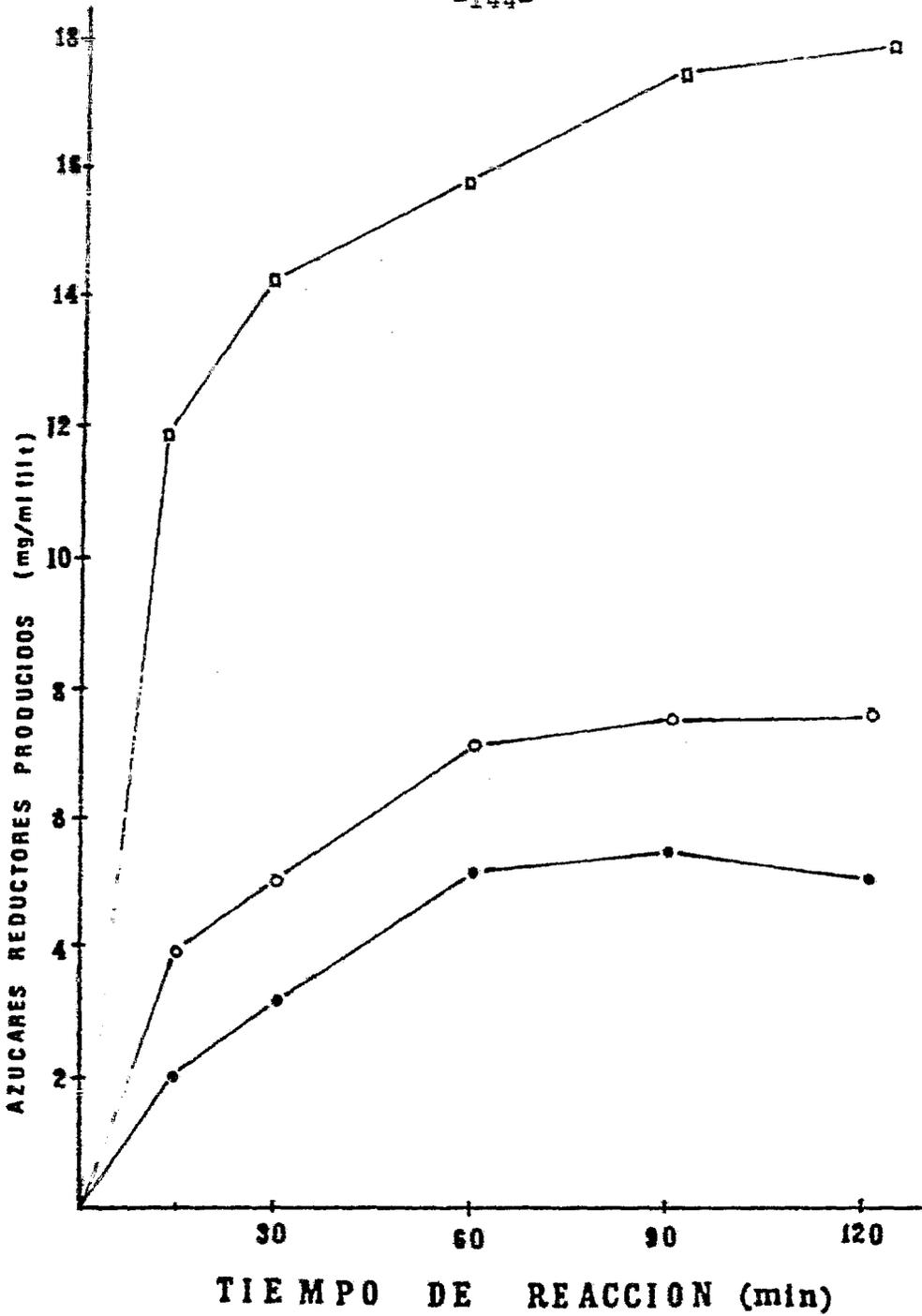


Fig. 41 Sacarificación de diferentes tipos de sustratos por el filtrado celulolítico producido por la cepa *Trichoderma viride* QM 9414 en medio B con celulosa microcristalina. Papel filtro (●), celulosa microcristalina (○), carboximetilcelulosa (◻).

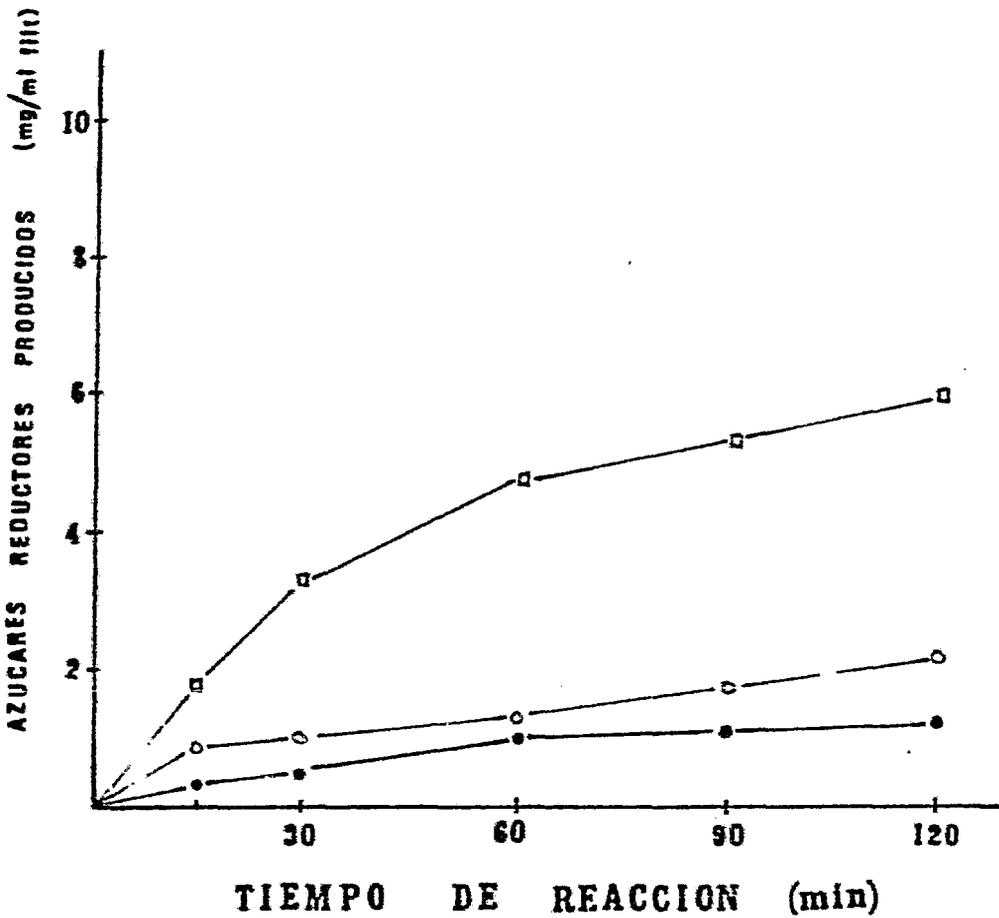


Fig. 42 Sacarificación de diferentes tipos de sustratos por el filtrado celulolítico producido por la cepa TE-001 en medio B con bagacillo de caña no tratado. Papel filtro (●), celulosa microcristalina (○), carboximetilcelulosa (□).

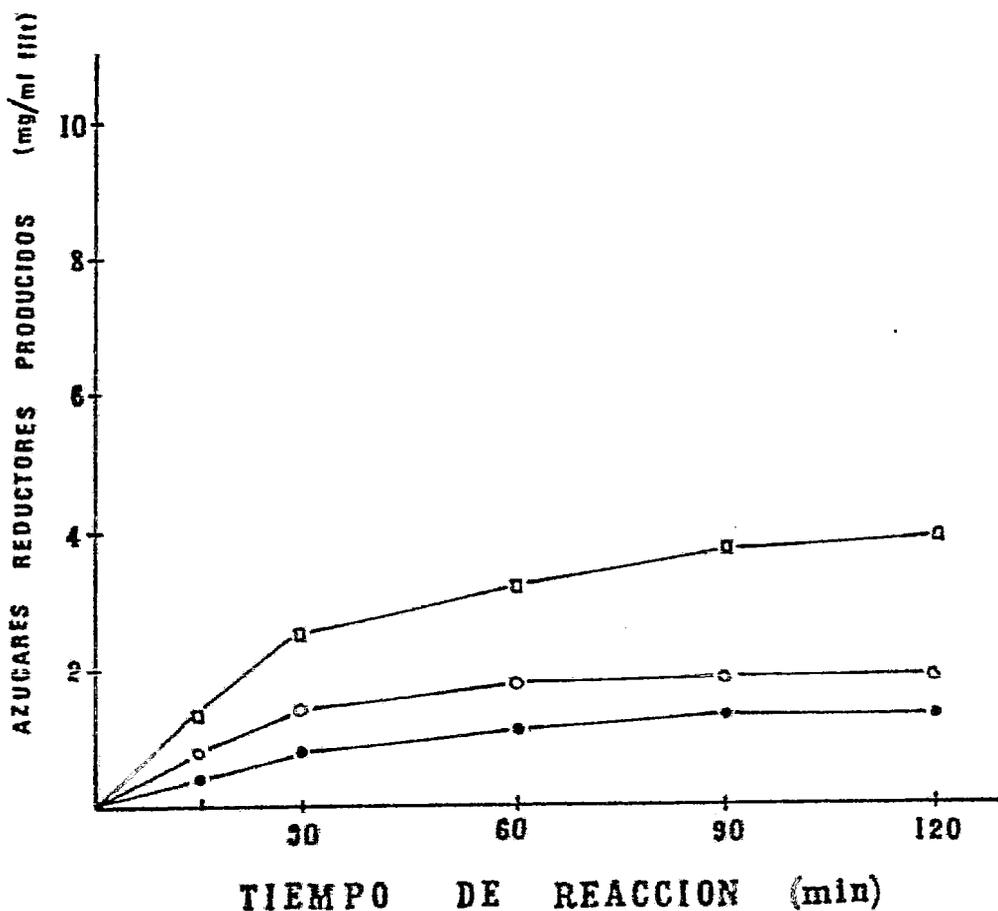


Fig. 43 Sacarificación de diferentes tipos de sustratos por el filtrado celulolítico producido por la cepa TE-004 en medio B con bagacillo de caña no tratado. Papel filtro (●), celulosa microcristalina (○), carboximetilcelulosa (□).

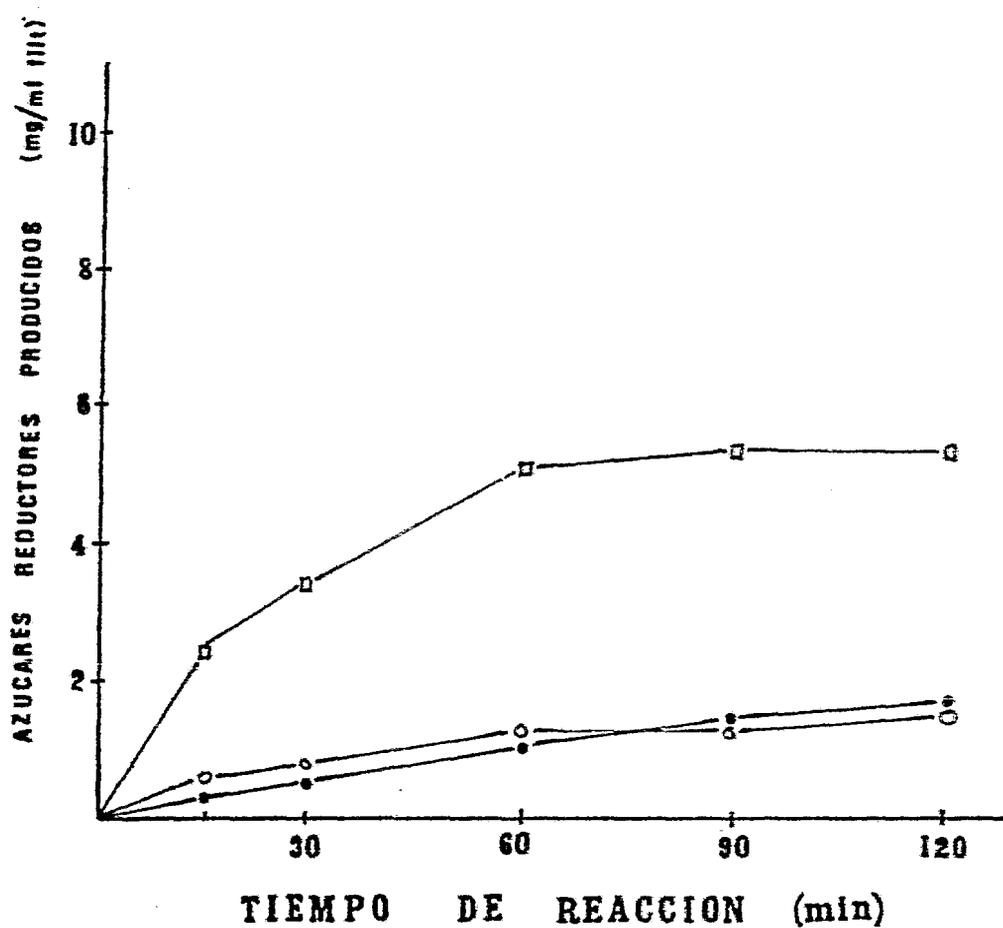


Fig. 44 Sacarificación de diferentes tipos de sustratos por el filtrado celulolítico producido por la cepa TE-006 en medio B con bagacillo de caña no tratado. Papel filtro (●), celulosa microcristalina (○), carboximetilcelulosa(□).

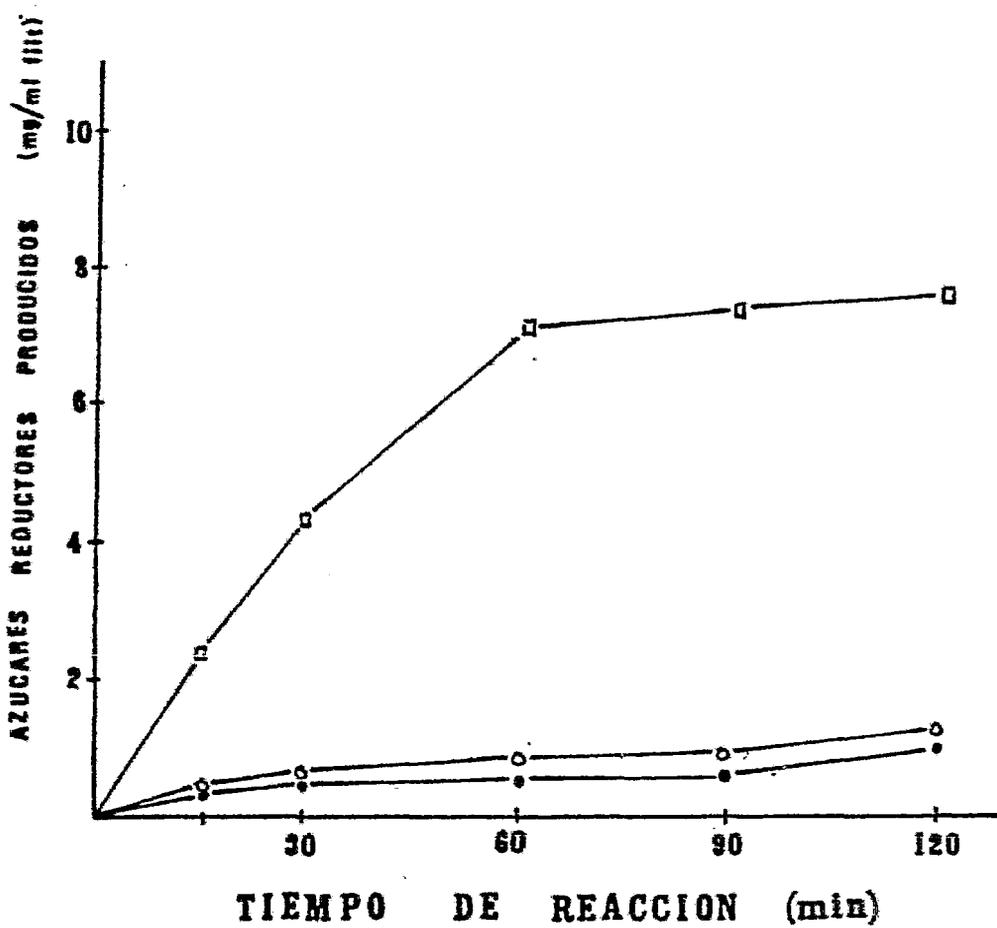


Fig. 45 Sacarificación de diferentes tipos de sustratos por el filtrado celulolítico producido por la cepa TE-013 en medio B con bagacillo de caña no tratado. Papel filtro (●), celulosa microcristalina (o), carboximetilcelulosa (□).

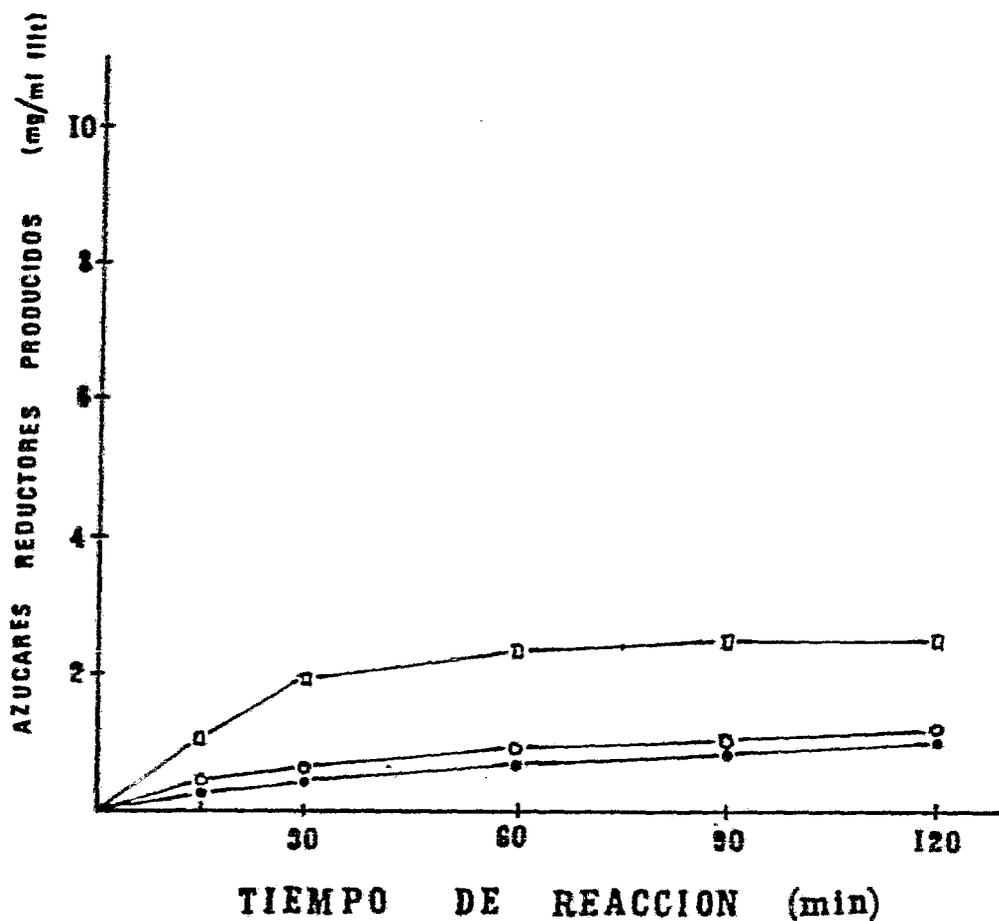


Fig. 46 Sacarificación de diferentes tipos de sustratos por el filtrado celulolítico producido por la cepa *Aureobasidium* sp en medio B con bagacillo de caña no tratado. Papel filtro (●), celulosa micro cristalina (○), carboximetilcelulosa (□).

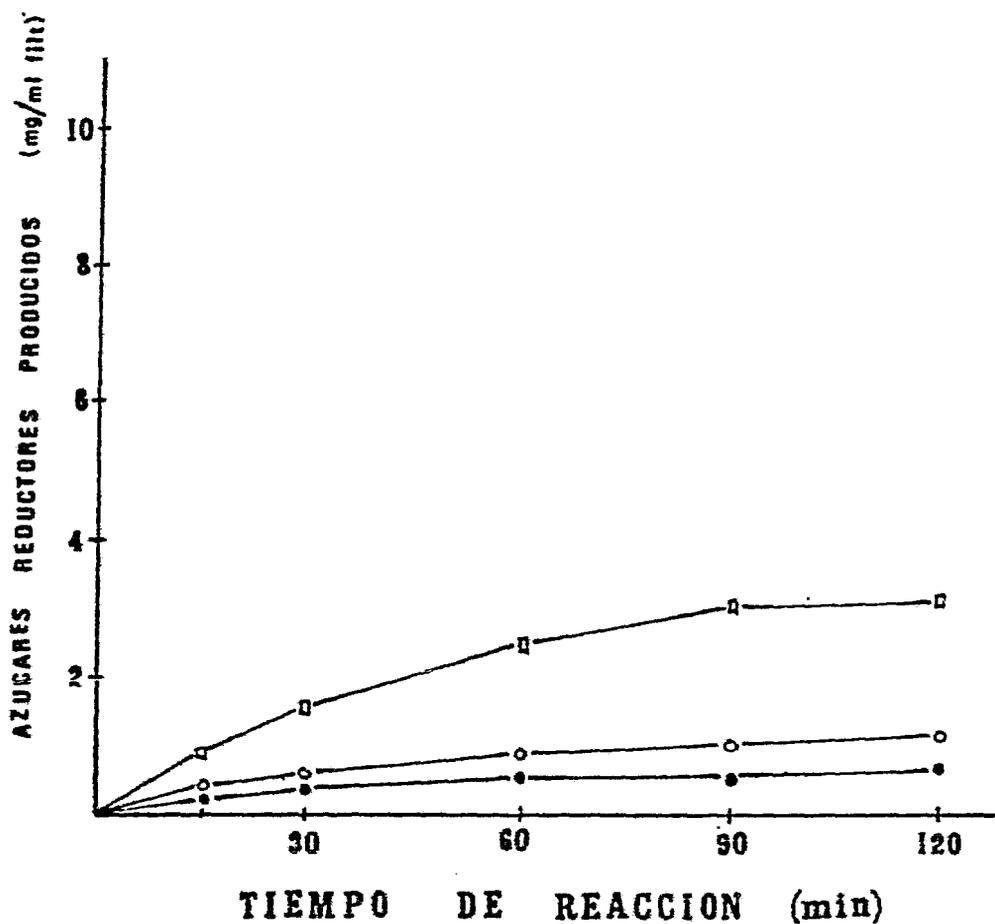


Fig. 47 Sacarificación de diferentes tipos de sustratos por el filtrado celuloiítico producido por la cepa *Trichoderma viride* QM 6a en medio B con bagacillo de caña no tratado. Papel filtro (●), celulosa microcristalina (○), carboximetilcelulosa (◻).

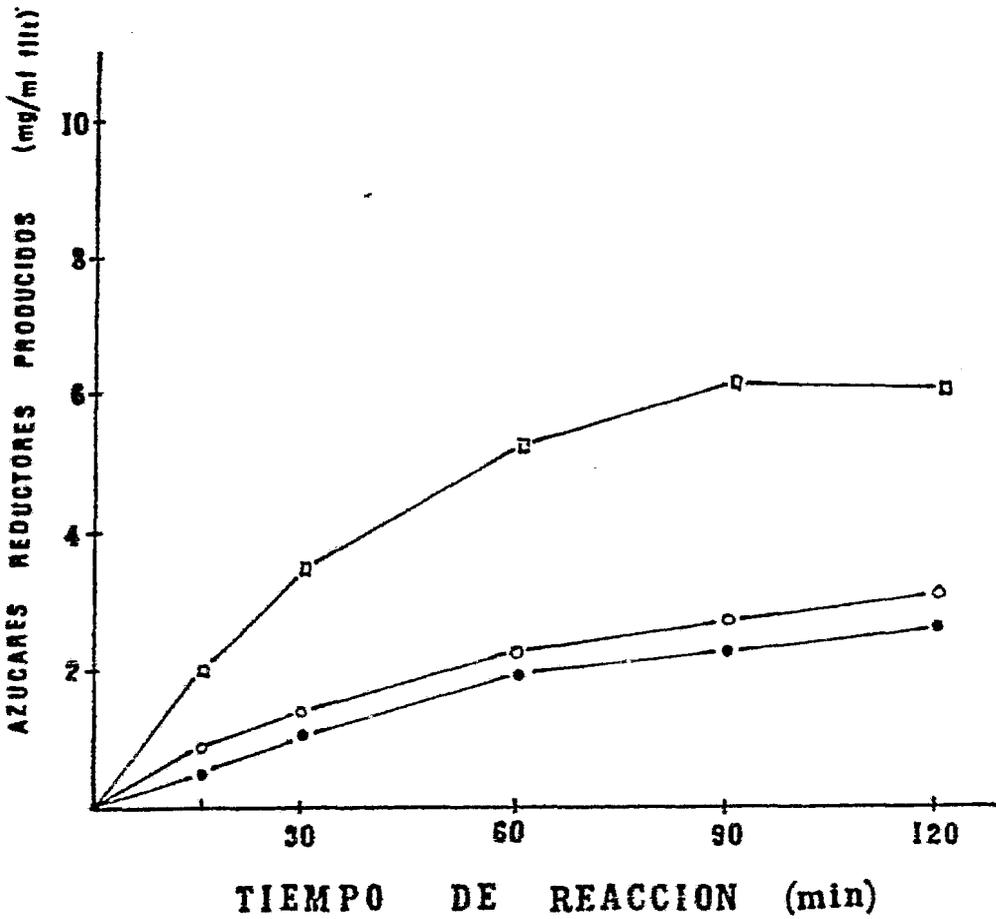


Fig. 48 Sacarificación de diferentes tipos de sustratos por el filtrado celulolítico producido por la cepa *Trichoderma viride* QM 9414 en medio B con bagacillo de caña no tratado. Papel filtro (●), celulosa microcristalina (○), carboximetilcelulosa (◻).

Sacarificación de diversos materiales celulósicos por los filtrados producidos en el medio de fermentación con celulosa microcristalina y bagacillo de caña.

Con el fin de poder establecer la posibilidad de utilización de los filtrados producidos en celulosa microcristalina y bagacillo de caña con fines de sacarificación, se seleccionaron dos filtrados de acuerdo a los resultados obtenidos en las reacciones de hidrólisis a tiempos cortos; estos fueron el producido por la cepa TE-001 y por la cepa TE-013, los cuales resultan adecuados para los fines de aprovechamiento de algún sustrato en particular; en el caso de celulosa de tipo cristalino fué el de la TE-001 y para la celulosa de tipo amorfo el de la TE-013.

Los materiales celulósicos utilizados para la sacarificación fueron el bagacillo de caña tratado (residuo obtenido después de la obtención de furfural), el bagacillo de caña sin tratamiento previo y el bagacillo de henequén. También fueron incluidos con fines comparativos otros materiales que pueden ser considerados como puros y que son representativos de la medición de algún tipo de actividad celulolítica en particular: la celulosa microcristalina para las exo-glucanasas, la carboximetilcelulosa para endoglucanasas y el papel filtro el cual es degradado únicamente por sistemas celulolíticos completos que incluyen los dos tipos de actividad así como también la de beta-glucosidasa además de que la determinación de tal actividad es considerada como un índice muy directo de la capacidad de sacarificación de las preparaciones de celulasas crudas (Canevascini y Gattlen, 1981).

La reacción fué realizada tal y como se describe en materiales y -

métodos pero en tiempos largos de reacción con un máximo de 48 horas considerando este tiempo suficiente para indicar un grado de hidrólisis - razonable principalmente para los materiales celulósicos nativos ya que la mayoría de los estudios concernientes a la degradación de la celulosa han sido realizados utilizando celulosa pura como sustrato por lo mismo aquí se incluyen materiales representativos de la misma sólo con fines comparativos.

En términos generales es posible establecer que las diferencias en los valores obtenidos de la evaluación de los filtrados bajo condiciones de sacarificación fueron menores a los encontrados en los ensayos enzimáticos cortos así como también que no existe una variación significativa - para ciertos materiales según la procedencia del filtrado utilizado en lo que se refiere al sustrato utilizado para su producción.

Con respecto al grado de sacarificación obtenido, mostrado en la figura 49 a la 53, los resultados variaron dependiendo del filtrado utilizado - pero es notorio para las primeras 24 horas que los materiales en los que se logró mayor cantidad de azúcares solubles fueron los tratados - con los filtrados producidos en celulosa microcristalina y en menor grado con aquellos provenientes del bagacillo de caña no tratado aunque existieron variaciones significativas con todos los filtrados después de este tiempo manifestándose mayor cantidad de azúcares con materiales como el bagacillo de caña no tratado. En todos los casos el grado de sacarificación logrado con el bagacillo de caña tratado y el bagacillo de henequén correspondió al más bajo lo cual puede ser motivo de la gran cantidad - de azúcares presentes en dichos materiales los cuales fueron detectados

en el blanco de reacción, de hecho se sabe que la pérdida de azúcares - durante el proceso de extracción de la caña de azúcar y que se encuentran presentes en el bagazo es de alrededor de un 5.7% del material seco (UNPASA, 1978) los cuales afectan la acción de las enzimas celulolíticas por efecto de inhibición por producto.

El comportamiento seguido con los filtrados producidos en bagacillo - de caña refleja que si bien es menor su actividad, los azúcares obtenidos varían ampliamente según el filtrado y el material empleado manteniéndose únicamente la relación del mayor y menor sacarificado correspondiendo ésta a la CMC y al bagacillo de henequén respectivamente.

Para los demás, fué notorio que el grado de sacarificación obtenido guarda una estrecha relación con la pureza del material empleado, siendo mayor en todos los casos durante las primeras 24 hrs de reacción para papel filtro y celulosa microcristalina correspondiendo posteriormente éste de acuerdo a un orden definido, a los materiales nativos como el bagacillo de caña no tratado y bagacillo de caña tratado respectivamente. Por lo mismo, de acuerdo a las características mencionadas es posible considerar un comportamiento definido de acuerdo al filtrado utilizado aún el de las cepas de referencia; a grandes razgos se puede considerar que el mejor filtrado fué el correspondiente a la cepa TE-001 ya que en ambos casos mostró un patrón de comportamiento similar al de la cepa T. viride QM 9414 siendo obviamente mayor al de otras cepas de referencia tanto de la de Trichoderma QM 6a y la de Aureobasidium sp considerando la producción del filtrado en ambos tipos de materiales..

En lo que respecta a la cepa TE-013, la cual fué seleccionada por su -

actividad sobre celulosa amorfa, el comportamiento indica que sí es efectiva para la degradación de estos materiales considerando como tales a la carboximetilcelulosa y los dos tipos de bagacillo excluyendo el comportamiento sobre el henequén puesto que la acción sobre este material fué similar en todos los casos.

La actividad de hidrólisis aún considerando estos factores es de aproximadamente la mitad del filtrado de la cepa TE-001 para los materiales cristalinos. De acuerdo a este comportamiento se podría pensar que la cepa TE-013 posee además de una actividad de endoglucanasa elevada, una actividad de beta-glucosidasa similar ya que durante las reacciones de sacarificación la celobiosa ha resultado ser un inhibidor más potente que la glucosa (Ghose y Das, 1971) y la remoción de la celobiosa altera favorablemente la velocidad de reacción lo cual es notorio en esta cepa principalmente a las 48 hrs de reacción puesto que la actividad presente casi iguala en algunos casos a la de la cepa TE-001.

Con respecto al comportamiento seguido por la cepa de referencia de Aureobasidium sp aislada del mismo material que las otras dos es posible considerar que mostró un comportamiento similar al de la cepa silvestre de Trichoderma por lo que estas cepas deben de tomarse en cuenta sólo con fines comparativos para la producción de filtrados pero para el caso de una sacarificación resulta más conveniente comparar el comportamiento obtenido con la mutante QM 9414 puesto que si se piensan utilizar los filtrados en un proceso con miras a una aplicación industrial resulta más adecuado contar con una preparación con alta actividad y que lleve a cabo la reacción de hidrólisis más eficientemente puesto que se puede decir -

que la cinética de la hidrólisis de los materiales celulósicos depende - básicamente de los siguientes factores (Dwevedi y Ghose, 1979) :

- 1) Estructura de la celulosa.
- 2) Naturaleza del sistema enzimático utilizado.
- 3) Los efectos inhibitorios de productos intermedios y finales.

Sobre la cantidad de enzima requerida para realizar una conversión determinada de algún sustrato en especial y a un determinado tiempo, es posible decir que para lograr altas concentraciones de azúcares así como un buen porcentaje de conversión son necesarias grandes cantidades de - enzima lo cual puede deberse en parte a una actividad específica baja y a una eficiencia pobre de la celulosa en cuestión lo cual representa una de las mayores barreras económicas a vencer para lograr que la sacari- ficación enzimática de la celulosa sea posible. Las explicaciones dadas a este respecto se basan en la insolubilidad de la celulosa cristalina, inhibi ción por producto e inactivación enzimática, las cuales en conjunto son ne cesarias de tomarse en cuenta pero también otro factor no considerado - que influye en el desarrollo de la reacción completa es la necesidad de la acción sinérgica entre las endo y exoglucanasas. Datos recientes (Ghose y Bisaria, 1979) han demostrado que ambos tipos de enzimas son fácilmente adsorbidas en la superficie de la celulosa mientras que la beta-glucosida- sa no sufre este efecto y permanece en solución. De lo anterior es posible concluir que la despolimerización de la celulosa hasta celobiosa se lleva a cabo en la superficie y la hidrólisis de celobiosa a glucosa en la fase líquida siendo independientes una de la otra; éstas suposiciones reflejan en parte los rendimientos obtenidos durante la reacción de sacarificación -

efectuado, los cuales son agrupados sólo con fines comparativos ya que no puede considerarse como un índice total de la cantidad de azúcares solubles capaces de liberar cada filtrado puesto que para ello sería necesario realizar la reacción con grandes volúmenes tanto de filtrado como de sustrato en un reactor diseñado para tal fin además cuando se mide la formación de azúcares, la actividad determinada es la suma de diferentes actividades celulolíticas y el resultado obtenido depende de la proporción relativa a la que se encuentran tales enzimas. La formación de glucosa o celobiosa como producto final depende de la actividad de beta-glucosidasa (Leisola y Linko, 1976). La tabla 12 muestra el % de conversión logrado por cada filtrado en particular para las 24 y 48 hrs de reacción - puesto que este lapso de tiempo sería el apropiado para la integración de un proceso industrial para el aprovechamiento de un material de desecho de tipo agroindustrial como sería el bagacillo de caña mediante la obtención de azúcares solubles por medio de una reacción enzimática.

De esta forma se puede decir que a las 48 hrs de hidrólisis, el material que tuvo la mayor conversión con los filtrados provenientes de bagacillo fué la CMC con un rango que va del 8.8 % al 12.4 % correspondiendo a la cepa silvestre de Trichoderma viride QM 6a y a la TE-001 respectivamente siendo éste el más alto valor logrado aún con respecto a la cepa - QM 9414. Se discuten sólo los datos obtenidos con los filtrados obtenidos a partir de bagacillo de caña puesto que la finalidad de este trabajo estuvo enfocada al aprovechamiento integral de este material y los resultados obtenidos con los filtrados provenientes de celulosa microcristalina aunque poseen una mayor actividad son tan sólo un indicio de la capacidad hidrolítica de cada filtrado y así fueron considerados.

Después en lo que respecta al grado de hidrólisis le siguieron en orden decreciente a la CMC, el bagacillo de caña no tratado donde de nuevo mostró mayor capacidad de utilización el filtrado de la cepa TE-001 con respecto a todas las demás lo cual puede indicar aunque el porcentaje de conversión es bajo (7%) que esta cepa se encuentra adaptada para el aprovechamiento de este tipo de materiales. Posteriormente es posible ordenar a los demás materiales sólo como un índice de la susceptibilidad al ataque: el papel filtro, el bagacillo de caña tratado, la celulosa microcristalina y el de menor grado de todos, el bagacillo de henequén con tan sólo un 2.8% de conversión promedio.

Por lo antes expuesto, es posible apreciar que el filtrado de la cepa TE-001, resulta adecuado para intentar lograr el aprovechamiento del bagacillo de caña nativo para la producción de celulasas como para la hidrólisis en reacciones de sacarificación; puesto que se asemeja o superará en las reacciones de sacarificación efectuadas a la cepa de Trichoderma viride QM 9414 la cual es una mutante por lo que se podría pensar mejorar aún los rendimientos de producción de enzima y el % de conversión en reacciones de sacarificación con los filtrados obtenidos con una cepa derivada de la TE-001 sometida a estudios de mutagénesis.

Con respecto a la variación obtenida en la velocidad de hidrólisis de los materiales celulósicos durante la reacción de sacarificación, ésta puede ser explicada por la existencia de una accesibilidad limitada a las enzimas debido a porciones cristalinas de la celulosa remanente o bien por efecto de inhibición por producto final e inactivación de los componentes del complejo enzimático por acción del calor (Faharich e Irrigant, 1932).

En lo que se refiere a la otra cepa seleccionada es conveniente mencionar que su comportamiento va de acuerdo a los fines de estudio perseguidos puesto que se quería evaluar la actividad presente en un filtrado con una elevada actividad de endoglucanasa y poca en lo que se refiere a la hidrólisis de las porciones cristalinas de la celulosa resultando el comportamiento obtenido regular para el caso del aprovechamiento del bagacillo de caña ya que también existe la posibilidad de mejorar la cepa TE-013 genéticamente puesto que su actividad fué muy similar a la de la cepa silvestre QM 6a de Trichoderma viride.

Un aspecto importante para su selección fué la posibilidad de lograr obtener actividades altas para estudios posteriores mediante una mezcla de las enzimas producidas por diferentes microorganismos buscando un sinergismo en la acción de las mismas sobre todo con aquellas cepas carentes del componente endoglucanasa en particular puesto que para intentar la hidrólisis enzimática de la celulosa completamente, se requiere de una preparación enzimática capaz de realizar el rompimiento en forma eficiente. Trichoderma viride es el producto más eficiente de celulasas extracelulares conocido hasta la fecha, pero debido a que son necesarios varios tipos de celulasas es posible que dos o más microorganismos sean utilizados en el futuro (Linko, 1977). Sin embargo, la mayoría del trabajo referente a este efecto se ha realizado con celulasas del mismo origen y los estudios sobre la combinación de celulasas de diferente fuente aún son preliminares y en la mayoría de los casos se encuentran incompletos (Goksoyr, 1975).

Se ha tenido éxito sobre combinación de preparaciones de diferente -

origen suplementando con beta-glucosidasa de A. niger y A. phoenicis preparaciones enzimáticas de Trichoderma viride durante una reacción de sacarificación ya que la actividad de esta enzima para este último microorganismo es insuficiente (Sternberg, 1977) pudiendose de esta forma aumentar en forma significativa la velocidad de reacción efecto debido tal vez a que se remueven los niveles inhibitorios de celobiosa puesto que la glucosa fué el producto final predominante ya que se ha reportado que durante las reacciones de sacarificación la celobiosa ha resultado ser un inhibidor más potente que la glucosa (Ghose y Das, 1971) y la remoción de la celobiosa altera favorablemente la velocidad de reacción.

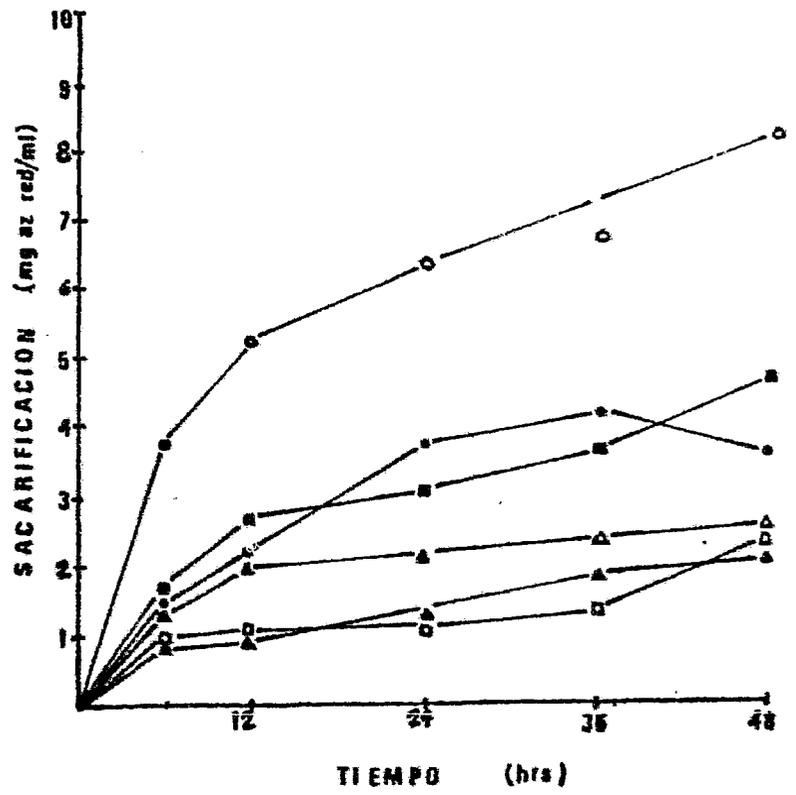
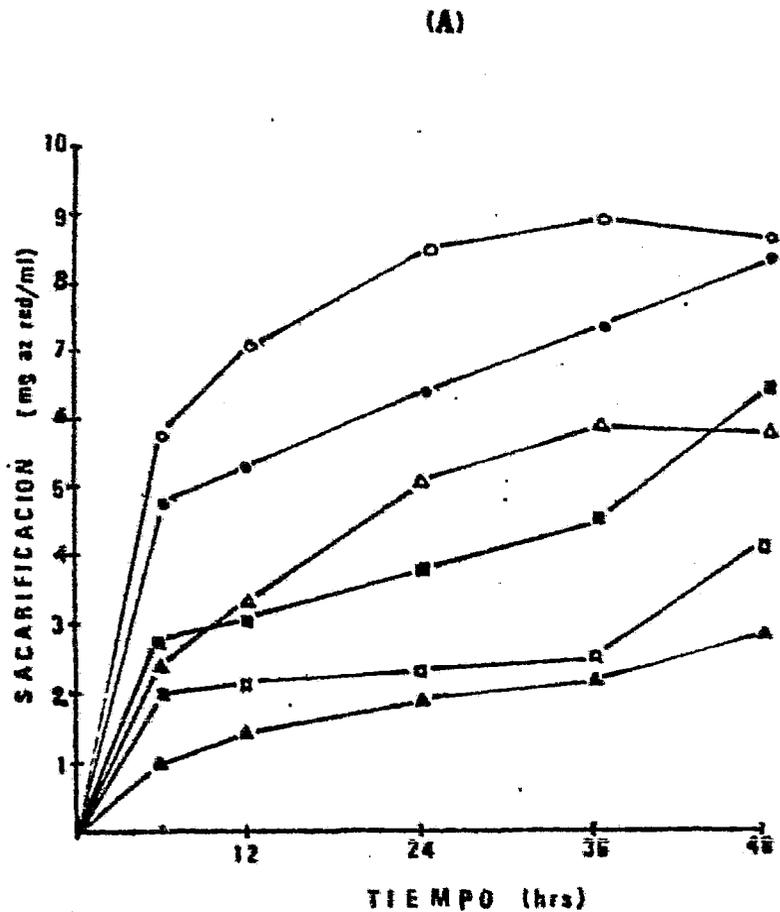
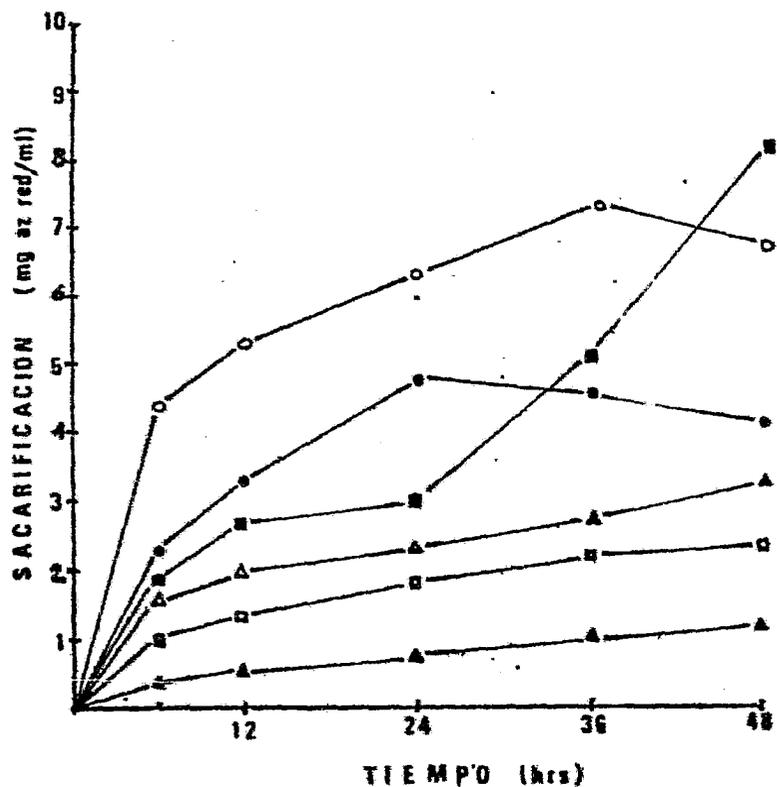


Fig. 49 Sacarificación de materiales celulósicos por el filtrado producido por la cepa TE-001 crecida (A) en medio con celulosa microcristalina, (B) en medio con bagacillo de caña no tratado. La reacción de sacarificación fué realizada en un sistema constituido por 5 ml de filtrado, 10 ml de buffer citratos 0,075 M, pH 4.8 y 1 g del material procesándose tal y como se describe en materiales y métodos. Papel filtro (●), carboximetilcelulosa (○), celulosa microcristalina (▲), bagazo de henequén (◆), bagacillo de caña tratado (■), bagacillo de caña no tratado (□).

(A)



(B)

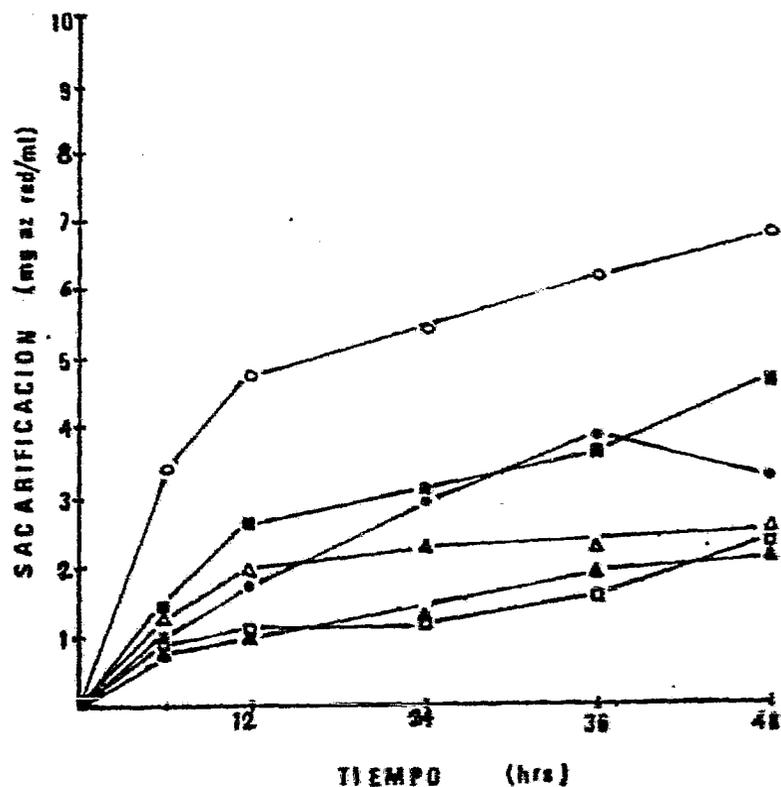


Fig. 50 Sacarificación de materiales celulósicos por el filtrado producido por la cepa TE-013 crecida (A) en medio con celulosa microcristalina, (B) en medio con bagacillo de caña no tratado. La reacción de sacarificación fué realizada en un sistema constituido por 5 ml de filtrado, 10 ml de buffer citratos 0,075 M, pH 4.8 y 1 g del material procesándose tal y como se describe en materiales y métodos. Papel filtro (●), carboximetilcelulosa (○), celulosa microcristalina (▲), bagazo de henequén (△), bagacillo de caña tratado (■), bagacillo de caña no tratado (□).

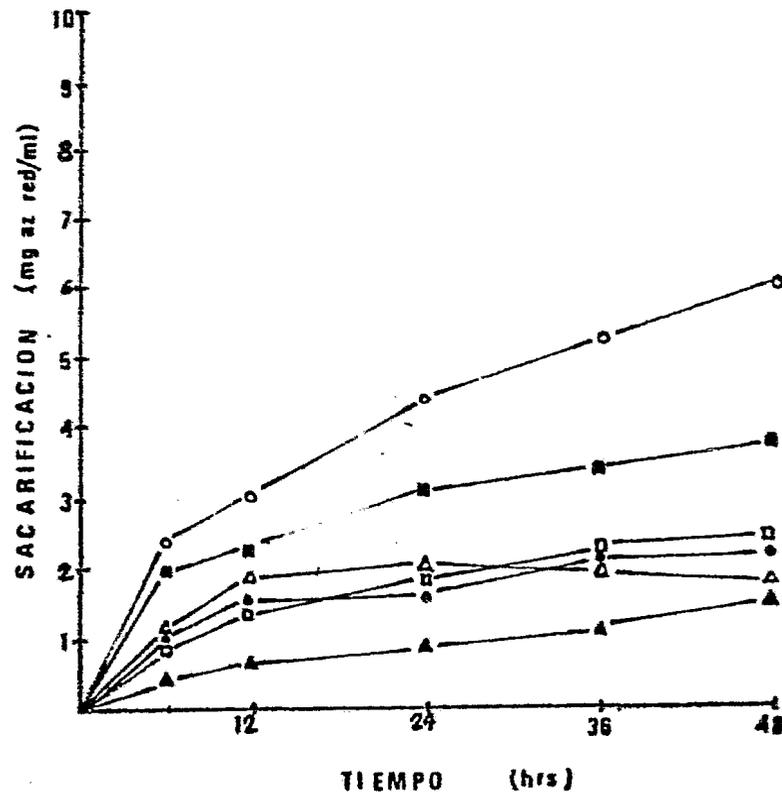
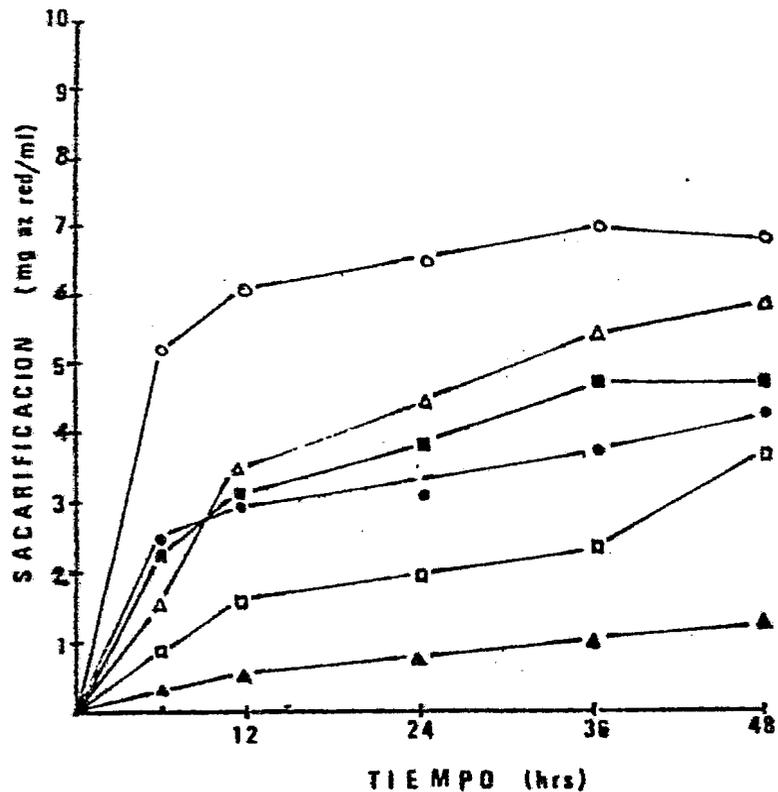
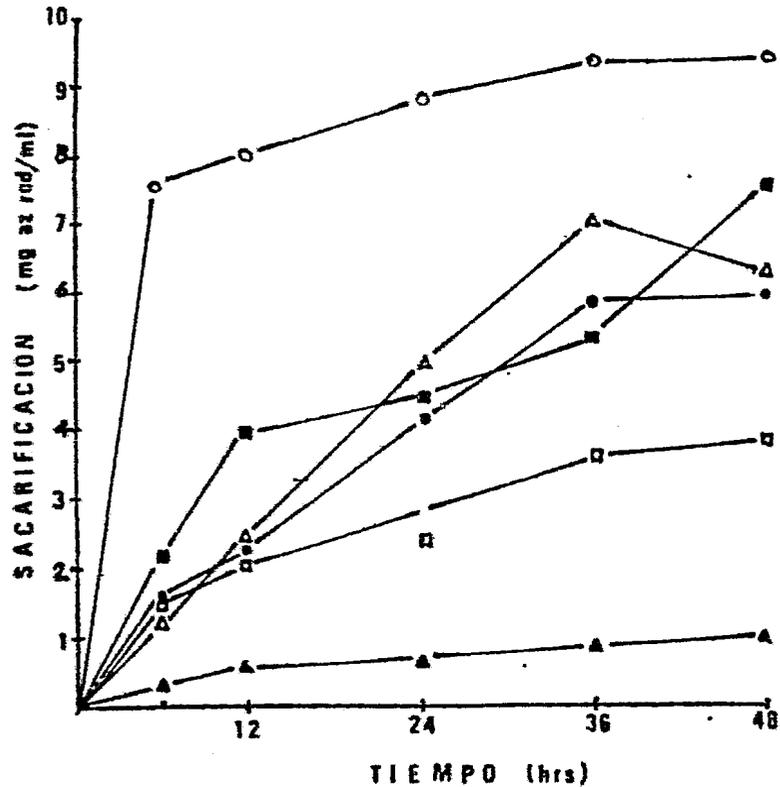


Fig. 51 Sacarificación de materiales celulósicos por el filtrado producido por la cepa *Aureobasidium* sp. crecida (A) en medio con celulosa microcristalina, (B) en medio con bagacillo de caña no tratado. La reacción de sacarificación fué realizada en un sistema constituido por 5 ml de filtrado, 10 ml de buffer citratos 0.075 M, pH 4.8 y 1 g del material procesándose tal y como se describe en materiales y métodos. Papel filtro (●), carboximetilcelulosa (○), celulosa microcristalina (△), bagazo de henequén (▲), bagacillo de caña tratado (□), bagacillo de caña no tratado (■).

(A)



(B)

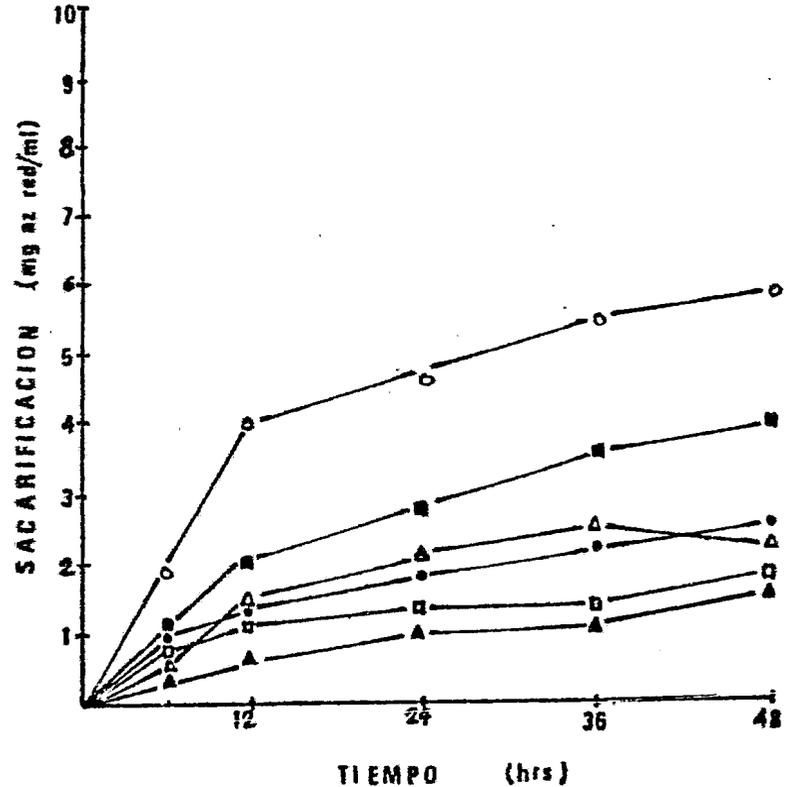


Fig. 52 Sacarificación de materiales celulósicos por el filtrado producido por la cepa *T. viride* QM 6a crecida (A) en medio con celulosa microcristalina, (B) en medio con bagacillo de caña no tratado. La reacción de sacarificación fué realizada en un sistema constituido por 5 ml de filtrado, 10 ml de buffer citratos 0.075 M, pH 4.8 y 1 g del material procesándose tal y como se describe en materiales y métodos. Papel filtro (●), carboximetilcelulosa (○), celulosa microcristalina (▲), bagazo de henequén (▲), bagacillo de caña tratado (□), bagacillo de caña no tratado (■).

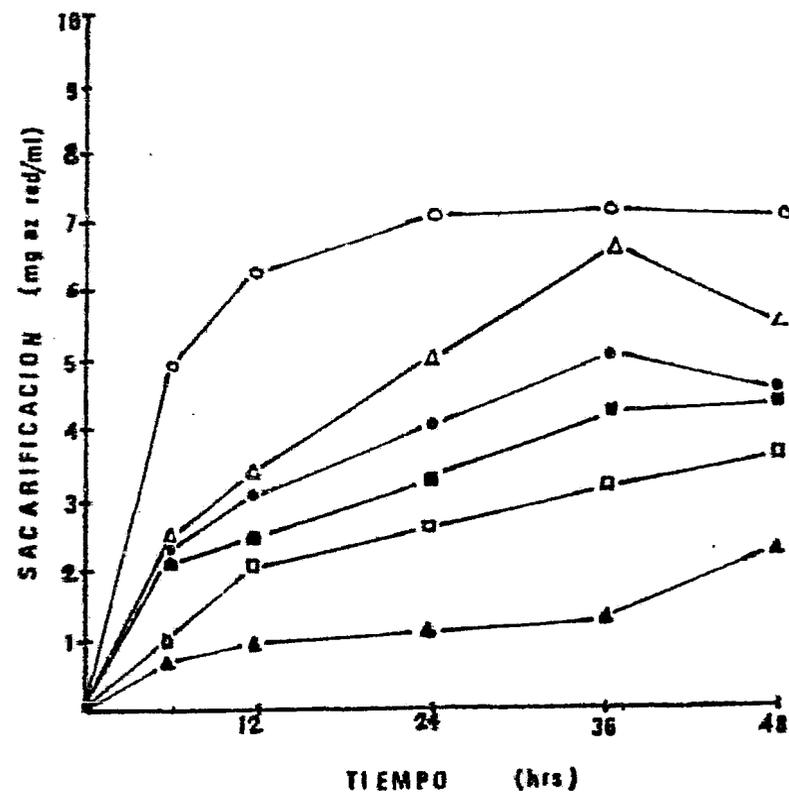
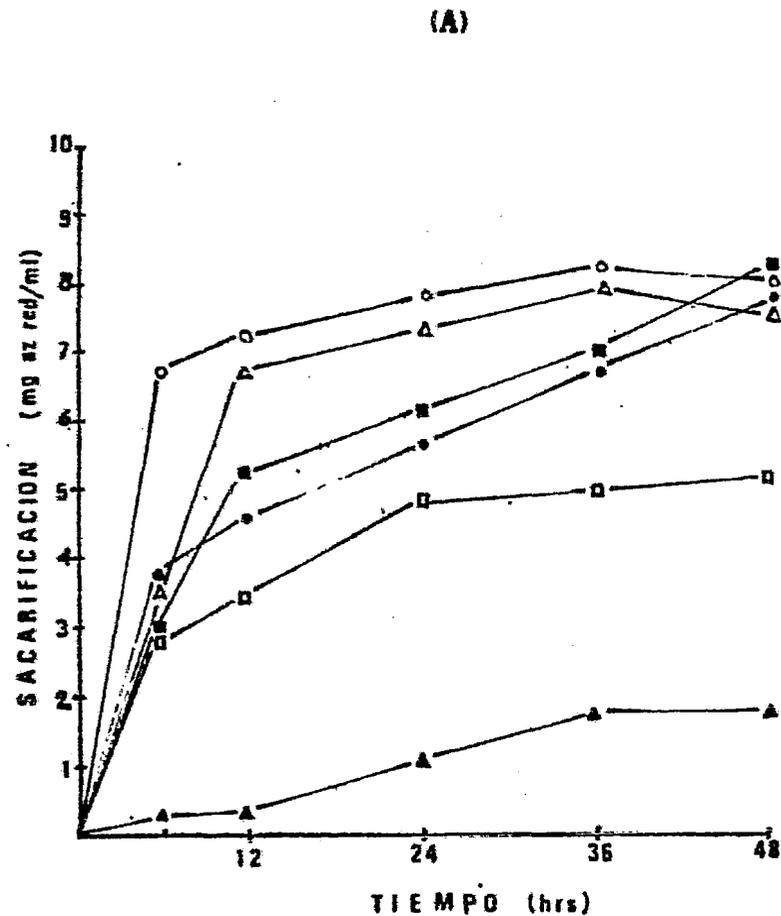


Fig. 53 Sacarificación de materiales celulósicos por el filtrado producido por la cepa *T. viride* QM 9414 crecida (A) en medio con celulosa microcristalina, (B) en medio con bagacillo de caña no tratado. La reacción de sacarificación fué realizada en un sistema constituido por 5 ml de filtrado, 10 ml de buffer citratos 0.075 M, pH 4.8 y 1 g del material procesándose tal y como se describe en materiales y métodos. Papel filtro (●), carboximetilcelulosa (○), celulosa microcristalina (△), bagazo de henequén (▲), bagacillo de caña tratado (◻), bagacillo de caña no tratado (◼).

TABLA 12

Porcentaje de conversión logrado por los filtrados celulolíticos producidos.

FILTRADO	TIEMPO (hrs)	% DE CONVERSION.											
		CMC		PF		Avicel		B. Hen.		B.T.		BNT.	
		(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
TE-001	24	12.9	7.2	9.6	3.0	7.9	2.8	2.6	1.9	2.8	1.5	5.2	4.2
	48	12.9	12.4	12.6	5.4	12.8	3.7	4.1	3.1	6.1	3.3	9.6	7.0
TE-013	24	10.2	7.2	7.2	2.8	3.3	1.9	0.9	1.3	2.1	2.2	4.8	5.2
	48	10.2	10.5	7.2	5.8	4.9	5.4	1.7	2.7	3.4	2.4	12.3	6.0
<u>Aureobasidium</u> sp.	24	9.7	6.6	4.6	2.2	6.6	1.7	1.0	1.2	2.3	2.5	5.1	5.3
	48	10.2	9.2	6.4	3.3	8.7	2.5	1.9	2.1	5.5	3.6	6.9	5.7
<u>Trichoderma</u> <u>viride</u> QM6a	24	11.7	6.0	6.0	1.9	7.5	2.5	0.7	1.4	3.1	1.4	6.1	3.7
	48	14.2	8.8	8.9	3.7	9.1	3.1	1.4	2.9	5.8	2.5	11.2	6.0
<u>Trichoderma</u> <u>viride</u> QM 9414	24	11.7	6.9	6.9	5.5	10.5	7.0	1.5	1.5	7.2	3.9	8.2	4.9
	48	12.0	10.8	11.7	7.6	11.5	8.4	2.4	3.3	7.6	5.5	12.3	6.3

(a) En celulosa microcristalina

(b) En bagacillo de caña no tratado.

El % de conversión está dado por la siguiente relación: $\%C = \frac{\text{Az. red./ml formados}}{\text{Peso del sustrato (mg/ml)}}$

Peso del sustrato (mg/ml)

Pruebas de estabilidad a 50° C de la actividad celulolítica de los filtrados con los que se efectuó la reacción de sacarificación.

La termoestabilidad es una de las propiedades físicas; más importantes de las celulasas ya que la hidrólisis de la celulosa procede en forma más rápida a temperaturas altas (Wood, 1975) resultando la estabilidad térmica otro de los factores que afectan la velocidad y extensión de la sacarificación de la celulosa. Por lo mismo los filtrados con los que se realizó la reacción de sacarificación fueron sometidos a una incubación de 50° C sin sustrato durante el lapso de tiempo que duró la reacción de hidrólisis con la finalidad de observar el grado de pérdida de actividad bajo las condiciones de incubación a las que estuvieron expuestos en el desarrollo de esta reacción puesto que las enzimas son inactivadas debido a las condiciones de reacción siendo esta inactivación más rápida cuando son utilizados sustratos cristalinos (Mandels, et al 1974). Los resultados obtenidos presentados en las figuras 54 a 58, reflejan un comportamiento similar en la mayoría de los filtrados utilizados aunque las actividades enzimáticas presentes en los de las cepas seleccionadas mostraron una disminución diferente de acuerdo a la naturaleza del inductor utilizado para la producción de actividad. Es posible destacar que el filtrado en el que se detectó la mayor pérdida de actividad a esta temperatura de incubación fué el de la cepa TE-013 producido en bagacillo de caña ya que la actividad de endoglucanasa medida sobre CMC es de un 11.5% de la actividad original a las 12 horas de reacción lo cual podría indicar que la proteína presente en este filtrado es más termolábil a esta temperatura de incubación y que pudiera tener otra temperatura óptima para su acción más baja aunque el patrón

de comportamiento bajo las condiciones de la reacción de sacarificación puede ser otro, puesto que en ellas el efecto ejercido por el sustrato puede ser favorable con lo que se podría explicar el comportamiento seguido en las mismas o bien que la actividad manifiesta después de este tiempo es efectuada por esa cantidad de enzima la cual es suficiente para los rendimientos finales obtenidos aunque no se puede descartar que en realidad este efecto se deba a la actividad ejercida por la beta-glucosidasa por removimiento de los niveles inhibitorios de celobiosa con lo que se manifiesta de nuevo la actividad residual existente.

Por otro lado, la actividad de exoglucanasa fué más estable ya que aunque se llega a tener un 20% de actividad esto se logra hasta las 36 hrs de incubación y los incrementos posteriores obtenidos de esa actividad residual son mínimos. Este comportamiento es diferente en el caso del mismo filtrado producido en celulosa microcristalina donde aún a las 48 hrs se tiene alrededor de 70% de actividad en ambos tipos de sustratos lo cual puede ser un índice de que aunque la cantidad de enzima fué menor es más específica para la actividad evaluada.

Con respecto al filtrado de la cepa TE-001 es posible observar que la estabilidad manifestada fué mayor en el filtrado producido en bagacillo para el caso de los dos tipos de actividades, aún después de las 48 hrs de incubación puesto que disminuyen alrededor de un 50% de los valores originales. El comportamiento mostrado por el mismo filtrado pero producido en celulosa microcristalina refleja sólo una diferencia en lo que respecta a la actividad perdida de endoglucanasa puesto que a las 36 hrs se tiene un 35.3% de la actividad comparada contra 42.8% sobre papel

filtro.

La estabilidad a 50°C mostrada por las cepas de referencia fué muy similar entre ellas puesto que aparentemente ésta es muy grande para esa temperatura de incubación que de hecho es la óptima reportada para Trichoderma (Mandels, 1976) ya que por lo general mantuvieron el 60% de actividad residual aún después de las 48 hrs de incubación. La única diferencia notable fué sobre la actividad de endoglucanasa para el filtrado de T. viride QM 9414 producido en bagacillo donde la actividad presente después de 36 hrs fué de 20.1% efecto similar al de la cepa TE-013.

De acuerdo al comportamiento mostrado es posible establecer que hay diferencias significativas en las actividades presentes en cada filtrado se gún la fuente de carbono utilizada para producirlo siendo más estables a una temperatura de incubación de 50°C los filtrados obtenidos en celulosa microcristalina así como también que la actividad más lábil a estas condiciones es la de endoglucanasa manifestada sobre todo en la cepa - TE-013 donde es notorio la pérdida de actividad sufrida durante el período de tiempo de la reacción de sacarificación. Por lo mismo, se puede con siderar que el comportamiento de cada filtrado durante una reacción de hidrólisis depende en gran parte de las características del microorganismo del cual procede y que cada sistema enzimático en particular debe poseer una temperatura óptima a la cual sea más estable dado que las condiciones a las que se trabajó fueron las mismas, lo cual no necesariamente implica que con ellas se lograra obtener la expresión de la máxima actividad.

De hecho en estudios similares al respecto realizados con una celulasa de C. cellulolyticum se ha encontrado que la actividad de endoglucanasa presente en este microorganismo fué estable durante un período de incubación de 24 hrs mientras que la exoglucanasa perdía 20% de su actividad (Fahnrich e Irrgang, 1982), sin embargo (Eriksen y Goksoyr, 1976) demostraron con los filtrados del cultivo de C. thermophile var dissitum que la actividad menos termoestable fué la de endoglucanasa lo cual apoya lo anteriormente expuesto sobre que la característica de termoestabilidad depende de la naturaleza del sistema celulasa de cada microorganismo en particular pero lo que no es discutible es que una de las razones para la disminución en la velocidad de producción de azúcares en una reacción de sacarificación de la celulosa debe ser la inactivación térmica de la actividad enzimática de las celulasas de los filtrados con los que se realiza (Fahnrich e Irrgang, 1982).

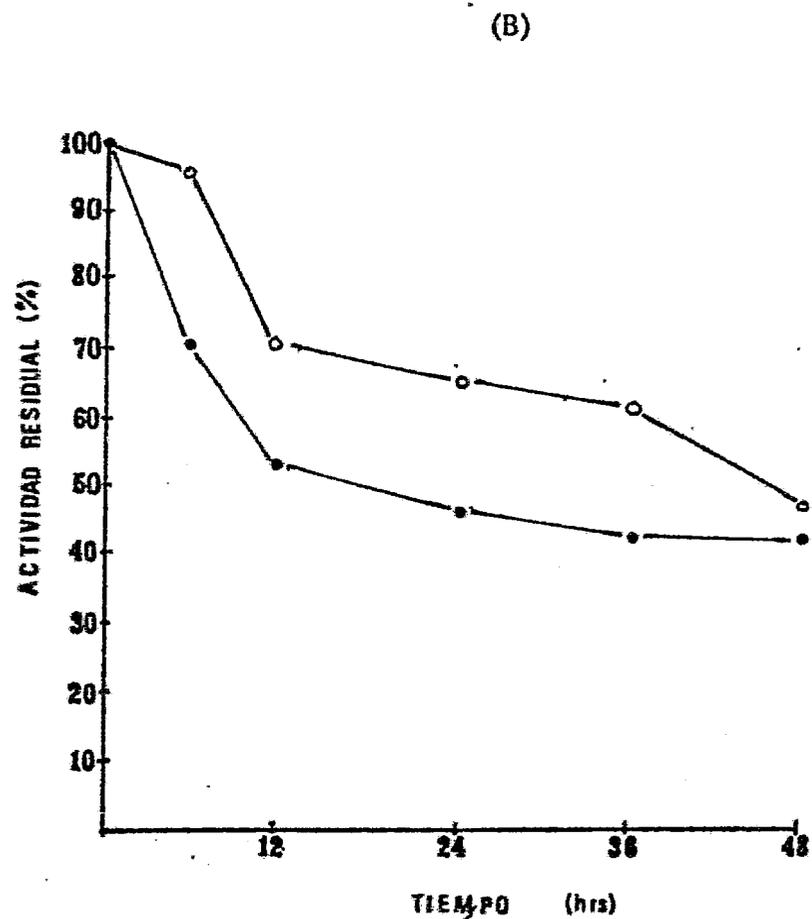
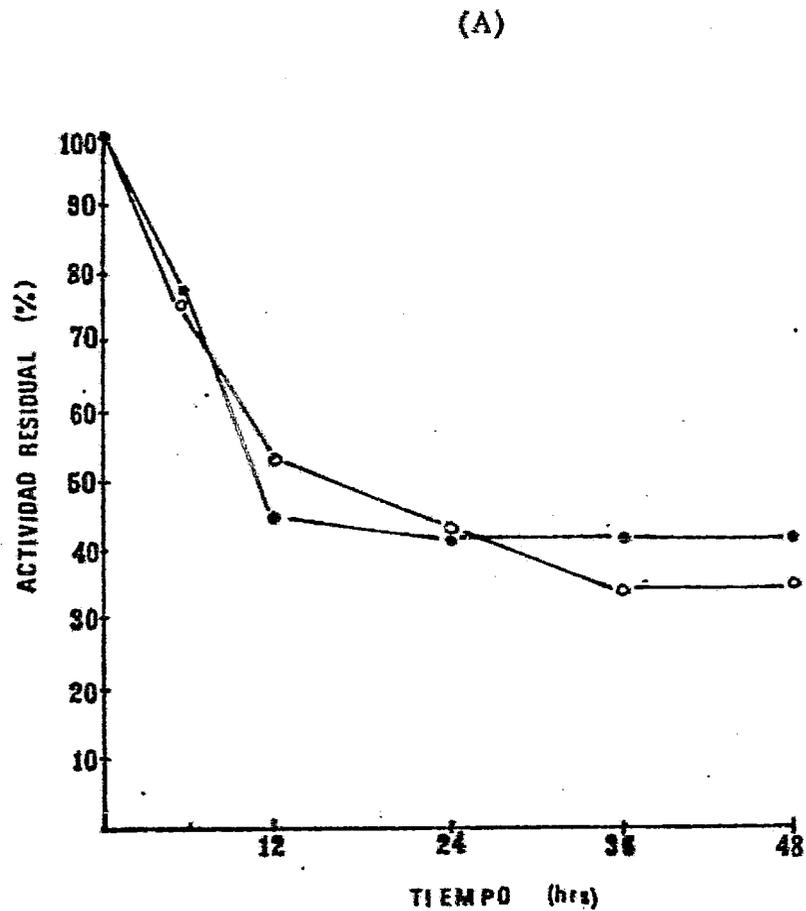


Fig. 54 Estabilidad de la enzima producida por la cepa TE-001; (A) En medio con celulosa microcristalina y (B) en medio con bagacillo de caña no tratado, a la temperatura de incubación de 50°C durante la reacción de sacarificación. Actividad sobre papel filtro (●); actividad sobre carboximetilcelulosa (○).

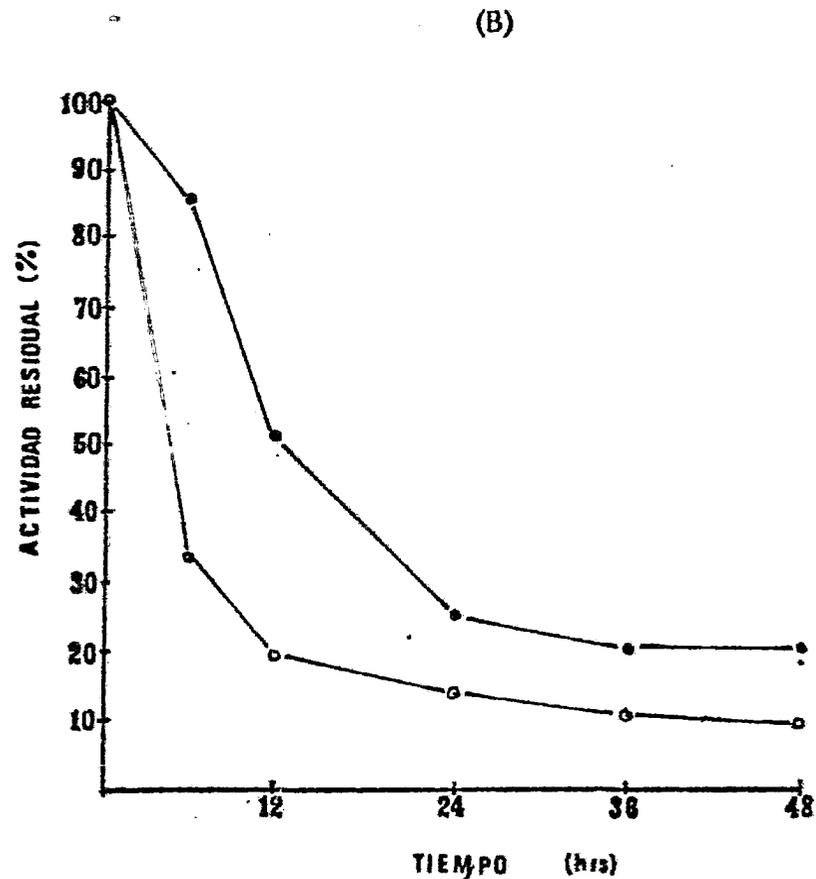
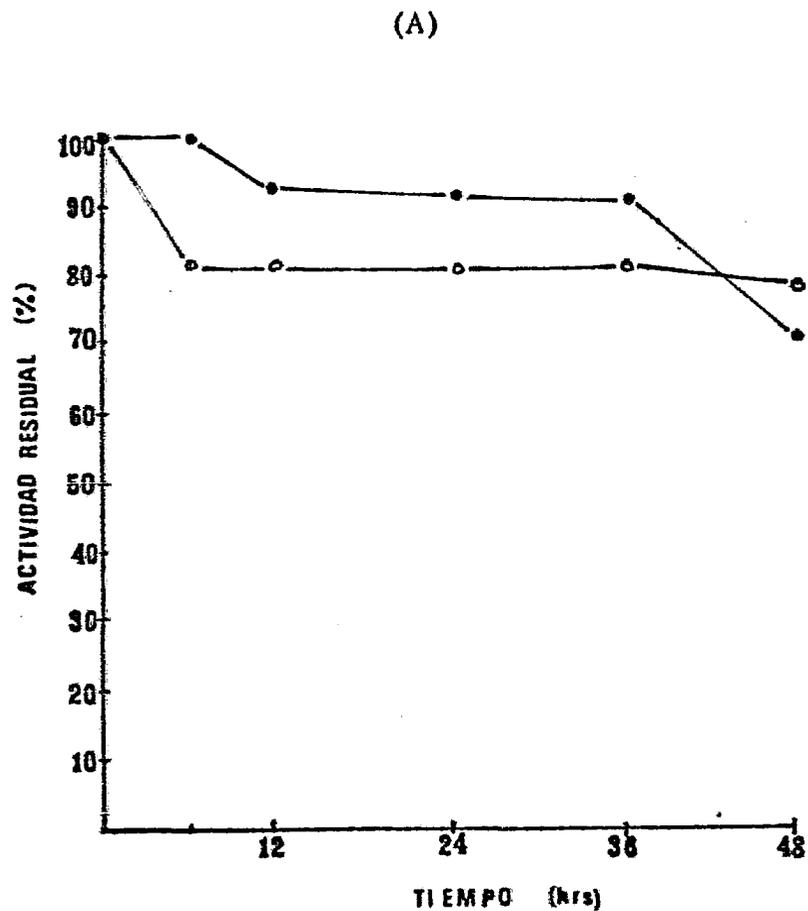


Fig. 55 Estabilidad de la enzima producida por la cepa TE-013. (A) En medio con celulosa microcristalina y (B) en medio con bagacillo de caña no tratado, a la temperatura de incubación de 50°C durante la reacción de sacarificación. Actividad sobre papel filtro (●); actividad sobre carboximetilcelulosa (○).

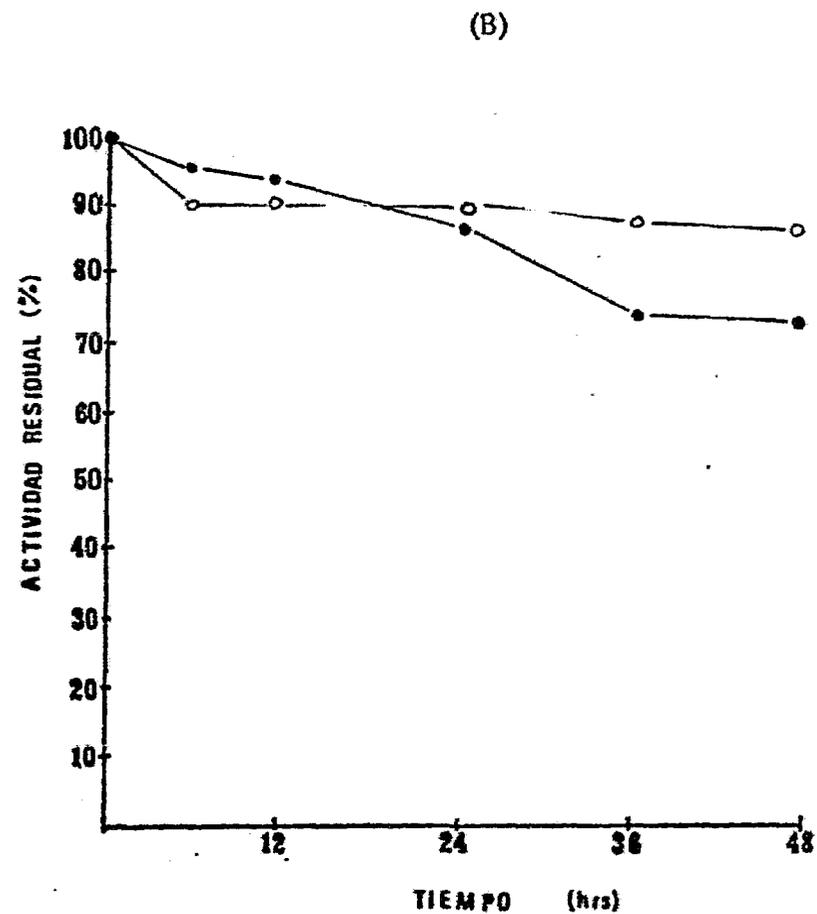
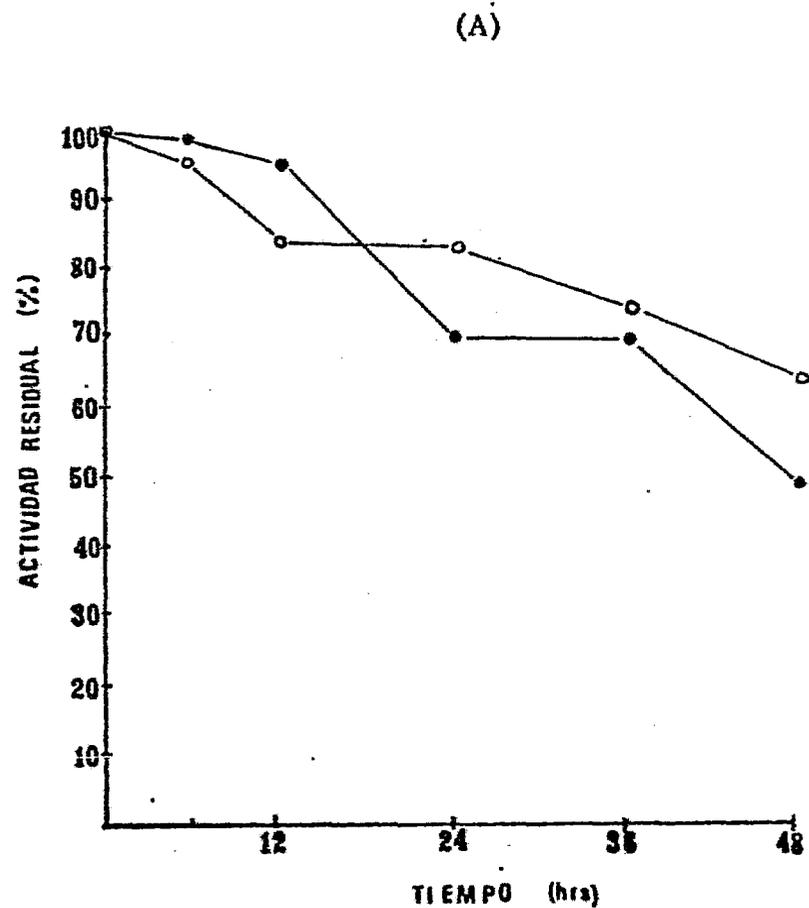
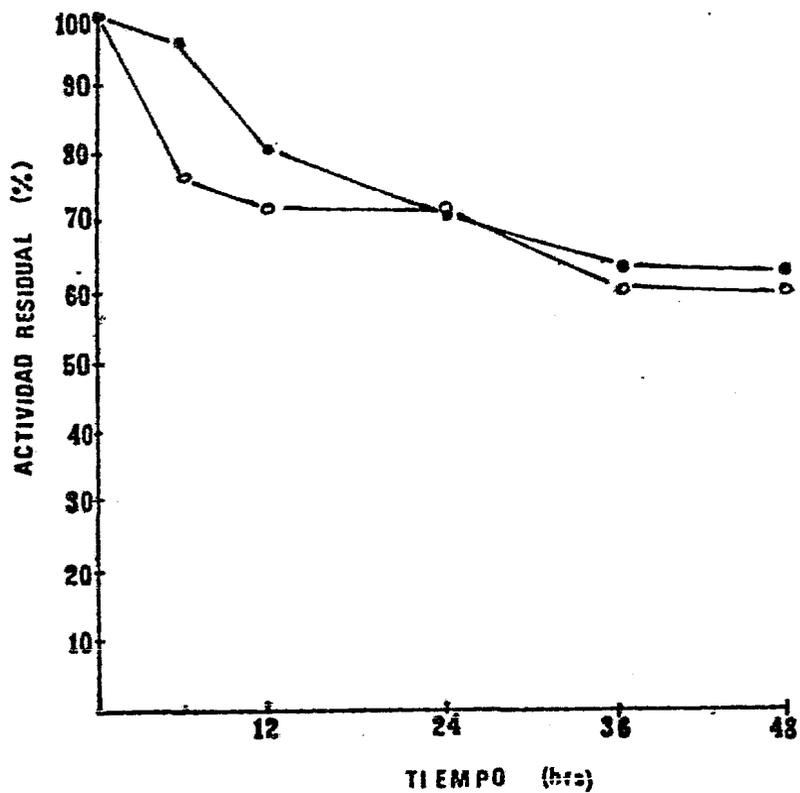


Fig. 56 Estabilidad de la enzima producida por la cepa *Aureobasidium* sp(A) En medio con celulosa microcristalina y (B) en medio con bagacillo de caña no tratado, a la temperatura de incubación de 50°C durante la reacción de sacarificación. Actividad sobre papel filtro (●); actividad sobre carboximetilcelulosa (○).

(A)



(B)

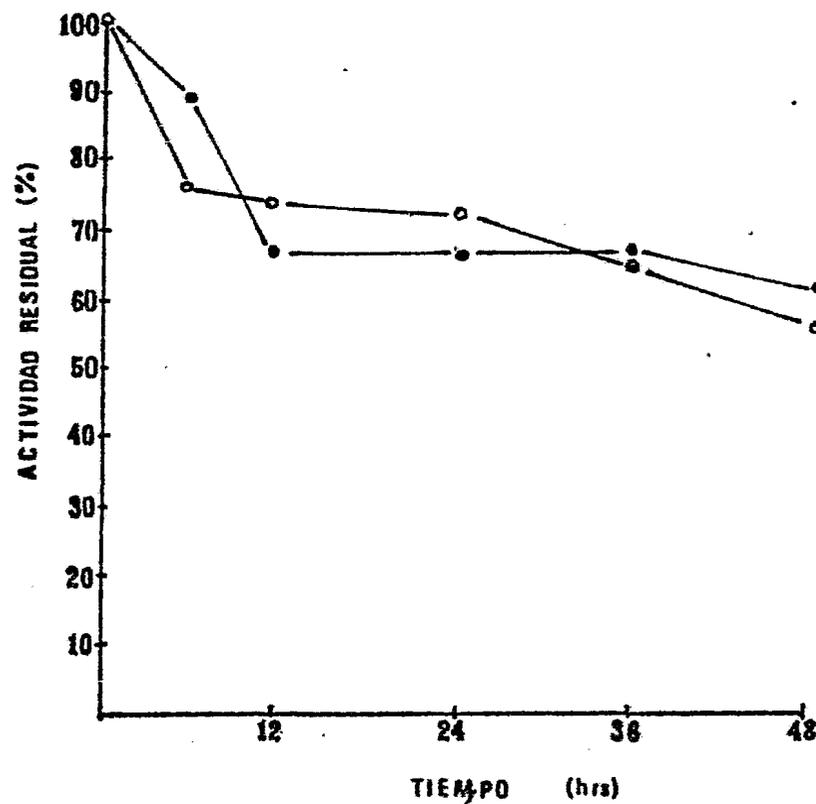


Fig.57 Estabilidad de la enzima producida por la cepa *T. viride* QM6a(A) En medio con celulosa microcristalina y (B) en medio con bagacillo de caña no tratado, a la temperatura de incubación de 50° C durante la reacción de sacarificación. Actividad sobre papel filtro (●); actividad sobre carboximetilcelulosa (○).

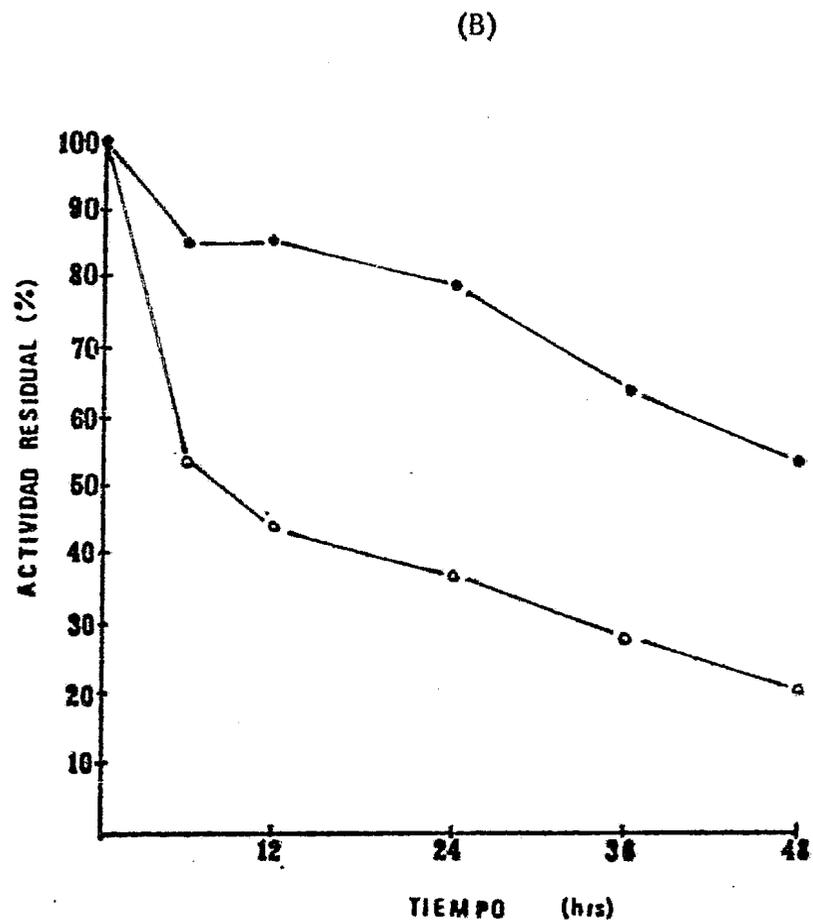
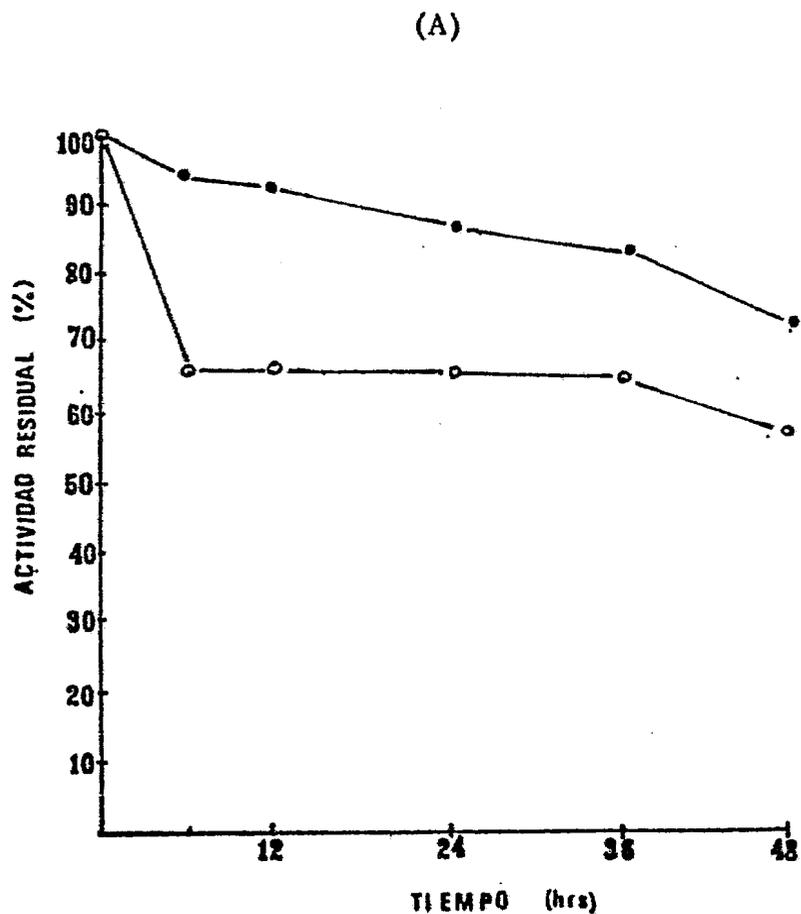


Fig. 58 Estabilidad de la enzima producida por la cepa *T. viride* QM9414 (A) En medio con celulosa microcristalina y (B) en medio con bagacillo de caña no tratado, a la temperatura de incubación de 50°C durante la reacción de sacarificación. Actividad sobre papel filtro (●); actividad sobre carboximetilcelulosa (○).

CONCLUSIONES.

En el desarrollo de este trabajo fué posible evaluar el potencial de utilización del bagacillo de caña de azúcar para la producción de celulasas y como sustrato de reacciones de sacarificación utilizando dos cepas seleccionadas a partir del mismo material las cuales resultan eficientes para pensar en su aprovechamiento y aunque no mostró ser un sustrato tan eficiente como la celulosa microcristalina en lo que respecta a la producción de actividad celulolítica, lo cual puede ser en parte causado por la cantidad de celulosa disponible presente, la cual obviamente es menor alrededor de un 50% a la presente en un material puro; si resulta atractiva su utilización por ser un desecho agroindustrial abundante y renovable además que en la reacción de sacarificación mostró ser uno de los materiales que potencialmente podrían ser utilizados en la integración de un proceso industrial puesto que fué uno de los más hidrolizados por una de las cepas seleccionadas y que además mostró ser una de las más aptas a este respecto. Aunque es necesario considerar para la realización de tales fines, que la selección de algún material celulósico de desecho como sustrato para efectuar la hidrólisis enzimática depende en gran parte de las condiciones locales de donde proviene o es producido, pero un punto primordial necesario de considerarse es que sea también barato en lo que respecta a los costos de recolección, transporte y almacenaje.

Con respecto a la utilidad que podrían tener las cepas seleccionadas -

en este trabajo, es claro que ambas resultan eficientes para el aprovechamiento de materiales celulósicos de este tipo por lo que se podría pensar en utilizarlas en la producción de celulasas y con los filtrados del cultivo obtenidos de la misma, llevar a cabo una reacción de sacarificación y aunque la cepa TE-001 resultó ser la más eficiente se podría pensar que la TE-013 seleccionada por la cantidad de actividad para hidrolizar sustratos fáciles de degradar, podría ser complementaria en lo que se refiere a la actividad presente ya que se sabe que varias celulasas muestran acción sinérgica para la hidrólisis de la celulosa cuando son combinadas entre ellas (Selby y Maitland, 1967; Wood, 1972; Nisizawa, et al 1972; Streamer, et al 1975). También se ha intentado lograr un aumento en la producción de glucosa en los hidrolizados suplementando los filtrados del cultivo con actividad celulolítica con preparaciones provenientes de otros microorganismos en los que la actividad de beta-glucosidasa sea elevada (Joglekar, et al 1983) ya que se sabe que como en el caso de Trichoderma viride esta enzima sólo se produce en muy poca cantidad por lo que su influencia en las reacciones de sacarificación es significativa.

Por este y otros factores mencionados, es necesario desarrollar ampliamente en un futuro cercano, alguna de las siguientes áreas:

___ Contar con cepas productoras que sean mutantes constitutivas que no requieran la presencia de un inductor para sintetizar la enzima.

___ Obtención de cepas mutantes insensibles a represión catabólica o sea obtener cepas capaces de sintetizar celulasas en presencia de glucosa.

__ Contar con celulasas termoestables, ya que las enzimas son inactivadas debido a las condiciones de reacción siendo esta inactivación más rápida cuando son utilizados sustratos de tipo cristalino (Mandels, et al 1974).

__ Producción de celulasas resistentes a inhibición por producto final.

__ Intentar mezclas de diferentes preparaciones enzimáticas con el fin de lograr con las mismas un incremento de la reacción de sacarificación.

Por lo mismo se podría pensar en forma genérica que existen mejores posibilidades de aumentar la efectividad de la sacarificación enzimática de la celulosa a través de la manipulación biológica de microorganismos y enzimas.

BIBLIOGRAFIA

- Almin K.E., Eriksson K.E. y Petterson B.: Eur. J. Biochem., 51, 207-211 (1975).
- Andreotti R.E.: in Abstr. 2nd Int. Symp. Bioconv. Biochem. Eng. 11 T Delhi, India, March 1980.
- Augustin N.R.: Biotechnol., Bioeng., Symp. 6, 1-8 (1976).
- Bailey M.J. y Nevaleinen K.M.H.: Enzyme Microbiol. Technol. 3; 153 (1981).
- Bellany D.M.: Biotechnology Report : SCP from cellulosic wastes.: Biotech. and Bioeng. XVI; 869-880 (1974).
- Bellefsen O. and Tonnensen B.A.: in High Polymers Vol. V Cellulose and Cellulose Derivates., Part IV, ch. 12, part C-2, Wiley Interscience 151, (1971).
- Berghem L.E.R., Pettersson L.G. y Axio-Fredriksson U.B.: Eur. J. Biochem., 53-55 (1975).
- Bisaria V.S. y Ghose T.K.: in Proc. Bioconv. Symp. (Ghose T.K. ed). IIT Delhi India., p. 155 (1977).
- Bose A., trabajo presentado en 2nd Int. Symp. Bioconv. Biochem. Eng. 11T Delhi (1980).
- Bryant M.P. "Symposium on Microbiol. Digestion ruminants" : J. Anim. Sci. 22: 801-813 (1963).
- Bucht B., Eriksson K.E.: Arch., Biochim. Biophys. 129, 416 (1969).

Campos Castillo Ma. y Gutierrez Rojas M.: ESTUDIO DE VIABILIDAD PARA LA PRODUCCION DE PROTEINAS UNICELULARES A PARTIR DE DESECHOS CELULOSICOS. Tesis Profesional, Facultad de Química. UNAM (1977).

Canevascini G. y Gattlen C.: *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1573-1590 (1981).

Clark T.F.: in *Pulp and Paper manufacture.*, Vol. 2, 2nd ed. R.G. Macdonald & J.J. Franklin Eds., McGraw-Hill, New York. 1969.

Coleman G.S., Laurie I., Bailey J., Holgate S.: *J. of Gen. Microbiol.* 95: 144-150 (1976).

Coudray M.R., Canavascini G. y Meier H.: *Biochem J.* 203, 277-284 (1982).

Cowling E.B., Kirk T.K.: In *Symposium on enzymatic conversion of cellulosic materials: technology and applications.* *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 6 John Wiley & Sons, New York p. 95 (1976).

Crawford D.L. y McCoy E.: *Appl. Microbiol.* 24 (1); 150-152 (1972).

Charpentier M.: *Compt. Rend.* 256, 4123 (1963).

Demain A.L.: *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* No. 6; 79-81 (1976).

Desveaux N. y Percheron F.: *C.R. Acad. Sci., Paris*, 276, 355 (1973).

Dixon M. y Webb E.C.: In *"Enzymes"*, Academic Press Inc., p. 69, 1958.

Dixon M. y Webb E.C.: In *"Enzymes"*, Academic Press Inc., p. 742, 1964.

Dwivedi C.P. y Ghose T.K.: *J. Ferment. Technol.* 57: No. 1, 15-24 (1979).

Dewey D., Ryu Y., Mandels M.: *Enzyme Microbiol. Technol.* Vol. 2, 91-101 (1980).

Enari T.M., Markkanene P., Korhonen E.: Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose. Aulanko, Finland. SITRA, Helsinki p. 171 (1975).

Enari T.M., Markkansen P.: Adv. Biochem. Eng. 5, 25-48 (1977).

Enger M.D. y Sleeper B.P.: J. of Bacteriol. 89:23-27 (1965).

Enzymes in food processing. Ed. por C. Reed. Academic Press. Inc. 1975.

Eriksen J. y Goksoyr J.: Arch. Microbiol., 110, 233-238 (1976).

Eriksson K.E.: Adv. Chem. Ser. 95, 83 (1969).

Eriksson K.E., Godell E.W.: Can. J. Microbiol. 20, 371 (1974).

Eriksson K.E., Pettersson B. y Westermark U.: FEBS Lett. 49, 282 (1974).

Eriksson K.E. y Rzedowski W.: Arch. Biochem. Bioph. 129, 689-695 (1969).

Eriksson K.E.: In Symposium on Enzymatic hydrolysis of cellulose. Aulanko, Finland., SITRA., Helsinki., p. 263-280 (1975).

Estadísticas Azucareras. Comisión Nacional de la Industria Azucarera Unión Nacional de Productores de Azúcar. S.P.P. p. 1, 10, 85-87 (1982).

Faith W.T., et al.: In "Advances in Biochemical Engineering., ed. Ghose T.K. and Fiechter A. Springer-Verlag, Vol. 1, p. 98., 1971.

Fahnrich P. y Irrgang K.: Biotechnol. Lett. vol. No. 4., 519-524 (1982).

Fahnrich P. y Irrgang K.: Biotechnol Lett. Vol. 4, No. 12 p. 775-780 (1982).

- Fan L.T., Young-Hyun L., Beardmore D.H.: Adv. in Biochem. Eng. edits. T.K. Ghose, A. Fiechter N. Blakebrough. Vol. 9 p. 102. Berlin (1979).
- Fergus C.L.: Mycologia 61:120-129 (1969).
- Flora R.M.: Phd. Thesis, Va Poly Inst. Va (1964).
- Forbes A.M.S.: Thesis. Univ. of Wisconsin, Madison (1969).
- Gaden E.L.: Applications. Summary. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6., 313-314 (1976).
- Gallo B.J., Andreotti R., Roche C., Ryu D. y Mandels M.: Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 8 p. 89-101 (1978).
- García Matínez D.V., Ogawa T., Shinmyo E. y Enatsu T.J.: Ferment. Technol. 52;6, 378-387 (1974).
- Ghose T.K. y Kostick J.A.: Advances in Chemistry Series ACS. 95;415-446 (1969).
- Ghose T.K.: Biotechnol. Bioeng. 11, 239-261 (1969).
- Ghose T.K., Das K.: Adv. Biochem. Eng. (Ghose T.K.; Fiechter, A) 1, 55 (1971).
- Ghose T.K., Pathak A.N. y Bisaria B.S.: Proc. of SITRA. Symp. on Enz. Hydrolysis of cellulose. M. Bailey T.M. Enari and M. Linko eds. Aulanko, Finland (1975).
- Ghose T.K.: Adv. Biochem. Eng. vol. 6, p. 39 (1977). Falkenhag S.I.J.: Appl. Polym. Sci. (Appl. Polym. Symp.) 28, 247 (1975).
- Ghose T.K. y Bisaria V.S.: Biotechnol. Bioeng. 21, 131 (1979).
- Ghose T.K. y Ghosh P.: Proc. Biochem. Nov. 20-24 (1979).

- Goksory J., Edisa G., Eriksen J., Osmundsvag K.: in Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose. Aulanko, Finland. SITRA, Helsinki p. 217. (1975).
- Guignard R. y Pilot P.E.: *Plant Cell Physiol.*, 17, 899 (1976).
- Gupta J.K., Das N.B. y Gupta Y.P.: *Agr. Biol. Chem.* 36, 1961-1967 (1972).
- Halliwel G.: *Biochem. J.* 95, 270-281 (1965).
- Han Y.W. y Srinivasan .: *Appl. Microbiol.* 16 (8): 1140-1145 (1968).
- Han Y.W., Dunlap C.E. y Cullihan C.D.: *Food Technol.* 25; 32 (1971).
- Han Y.W., Callihan C.D.: *Appl. Microbiol.* 27, 159 (1974).
- Han Y.W., Lee J.S., Anderson A.W.: *J. Agr. Food Chem.* 23; 928 (1975)b.
- Han Y.W., Cheeke P.R., Anderson A.W. y Lekprayoon C.: *Appl. Env. Microbiol.* 32 (6), 799-802 (1976).
- Hans G. Schlegel : *Microbiología Genreal*. Ediciones Omega S.A. 2a Ed. 1975.
- Hendy H., Wilke C.H. y Blanch H.: *Biotechnology Letters* Vol. 4, No. 12, 785-788 (1983).
- Honeyman J. "Recent advances in the Chemistry of cellulose and starch" p. 496, Interscience Publishers Inc., N.York. 1959.
- Horton J.C. y Keen N.T.: *Can. J. Microb.* 12, 210 (1966).
- Holme M.A., y Stranks D.W.: *J. Gen. Microbiol.*, 69, 145-155 (1970).
- Holme M.A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 149, 49 (1971).

Humphrey A.E., Moreira A., Armger W. y Zabriskie D.: Production of single cell protein from cellulosic wastes. University of Pennsylvania (1974).

Humphrey A.E.: Adv. in Chem. Ser., 181, 2; 25-53 (1979).

Husemann E. y Werner R.: Makromol. Chem., 59, 43 (1963).

Husemann E., Keilich G. y Staehelin A.: 5th. International Ferment. Symp., p. 442 (1976).

Joglekar A.V., Srinivasan A.C., Jogdand V.V. y Karanth N.G.: Enzyme Microb. Technol., vol. 5, p. 22-24 (1983).

Joglekar A.V., Karanth N.G. y Srinivasan M.C.: Enzyme Microb. Technol. Vol. 5, p. 25-29 (1983).

Jurazek L.: Adv. Appl. Microbiol., 9, 157 (1967).

Katz M., Reese E.T.: Appl. Microb., 16, 419 (1968).

Kawai M., Noguchi S., Shimura G., Suga Y. y Samejima H.: Agr. Biol. Chem., 42 (2); 333-337 (1978).

Kirk T.K., Moore W.E.: Wood Fiber 4, 72 (1972).

Larios G. y Huitrón C.: Rev. Tecnol. Aliment. (Méx.) Vol. XVI, No. 5 (1982).

Leatherwood J.M.: Appl. Microbiol., 13, 771 (1965).

Lee B.H. y Blackburn T.H.: Appl. Microbiol., 32, 346 (1975).

Lin T.H. y King K.W.: Arch. Biochem. Biophys., 120, 1462 (1967).

Linko M.: Kemia-Kemi 2, 602 (1975).

Matteau P.P. y Saddler J.H.:Biotechnolgy Letters Vol. 4,No. 8, 513-518 (1982).

Miller G.L.:Anal. Chem.;31,426 (1959).

Millet M.A.,Baker A.J.,Satter L.D.: In Cellulose as a chemical and energy resource.:Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 5.John Wiley & Sons,New York. p. 193 (1975).

Memoria Estadística de la Cámara Nacional de las Industrias de la celulosa y papel.Area de Documentación.SPP. p. 39-56 (1981).

Moo-Young M.A.:Process Biochemistry;32-34,diciembre (1976).

Moo-Young M.A.,Chahal D.S.,Shan J.E. y Robinson C.W.:Biotechnol. Bioeng. 19;527-538 (1977).

Montenecourt B.S.y Eveleigh D.E.:Appl. Environ. Microbiol.,34; 178-183 (1977)a.

Montenecourt B.S. y Eveleigh D.E.:Appl. Environ. Microbiol.,34; 777-782 (1977)b.

Montenecourt B.S. y Eveleigh D.E.:Adv. Chem. Ser.,181;279-301 (1979).

Myers M.G. y Eberhart B.:Biochem. Biophys. Res. Commun.,24;782 (1966).

Murao S.,Kanamoto J. y Arai M.:J. Ferment. Technol. Vol. 57,No. 3 p. 151-156 (1979).

Mukhopadhyay S.N.,Ghose T.K.:Biotechnology Letters Vol. 1,No. 5, 205-210 (1979).

Molienda de caña 1978.UNPASA (1978).

Linko M.:Adv. Biochem. Engg. 5,25-58 (1977).

Loginova L.G. y Tashpulatov.:Z. Microbiologiya 34;258 (1965).

Lowry O.H.,Rosenbrough M.J.,Farr A.L. y Randall R.J.:J. Biol. Chem,193;256 (1951).

Mandels M. y Reese E.T.:J. Bacteriol. 73,269-279 (1957).

Mandels M. y Reese E.T.:J. Bacteriol. 79,816 (1959).

Mandels M.:J. Bacteriol. 83,400 (1962).

Mandels M. y Weber J.:J. Adv. Chem. Series,95;391-414 (1969).

Mandels M.,Weber J. y Parizek R.:Appl. Microbiol.,21(1),152-154 (1971).

Mandels M.,Reese E.T.:J. Biochem. 71,999 (1972).

Mandels M.,Hontz L.,Nystrom J.:Biotechnol. Bioeng. 16,1471 (1974).

Mandels M.:Biotechnol. and Bioeng. Symp. 81-105 (1975) John Wiley & Sons.

Mandels M.,Stenberg D. y Andreotti R.E.: In Proceedings of the Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose.,M.Bailey,T.M. Enari y M. Linko,Eds.(AULANKO,Finland) p. 81 (1975).

Mandels M.:Microbial sources of cellulases.:Biotechnol. and Bioeng., Symp. NO. 6,21-34 (1976).

Mandels M.,Medeiros J.E.,Andreotti R.E. y Bissett F.H.:Biotechnol. Bioeng.,23;2209-2026 (1981).

- Nisizawa T., Susuki H. y Nisizawa K.: J. Biochem. 71, 999-1007 (1972).
- Nisizawa T., Susuki H., Nakayama K.: J. Biochem. 70, 375-385 (1971).
- Nisizawa K., Tomita Y., Kanda T., Susuki H., Wakabayashi K.: Ferment. Technol. Today (Teruri G.) 719, Soc. Ferment. Technol. Japan Osaka (1972).
- Nystrom J.M., Allen A.L.: Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 6, 55 (1976).
- Osaman H.G., Herrera A., Casado G., Llama E. y Bell A.: Utilización del bagazo para la producción de biomasa bacteriana. Ciencias, serie 5, No. 9; 1-29, Universidad de la Habana (1972).
- Pathak A.N. y Ghose T.K.: Process Biochem. 35 (1973).
- Peitersen N.: Biotechnol. Bioeng. 17, 361 (1975).
- Pettersson L.G.: In Symposium on Enzymatic Hydrolysis of cellulose., M. Bailey, T.M. Enari y M. Linko Eds. (AULANKO, Finland) p. 319-326 (1975).
- Reese E.T., Siu R.G.H. y Levinson H.S.: J. Bacteriol. 53, 481-497 (1950).
- Reese E.T.: Appl. Microbiol. 4 (1) 39-45 (1956).
- Reese E.T. y Maguire A.: Appl. Microbiol. 17 (2), 242-245 (1969).
- Reese E.T. y Maguire A.: Dev. Ind. Microbiol. 12; 212-224 (1971).
- Reese E.T., Mandels M., Weis A.H.: Advances in Biochemical Engineering., 2, 181 (1972).
- Reese E.T.: Biotechnol. & Bioeng. Symp. 3, 43-62 (1972).
- Reese E.T.: Biotechnol. & Bioeng. Symp. No. 5, 77 (1975).
- Reese E.T.: Biotechnol. & Bioeng. Symp. No. 6, 91-97 (1976).

- Reese E.T.:In advances in Phytochemistry (Loewus F.A. y Runeckles V.C. eds.) Vol. 11 p. 311 (1977).
- Reed G.:Enzymes in Food Processing.,Second Edition. p. 97-107,1975.
- Ritter G.Z.:Allgem, Mikrobiol. 4,295 (1964).
- Roberts J.D.,Stewart R.,Caserio M.C.:Organic Chemistry,p. 405-406 W.G. Benjamin Inc. New York. 1971.
- Rockwell P.I.:LSU Proyect Description in Single Cells Proteins from Cellulose and Hydrocarbons.Noyes Data Corporation,London (1976).
- Romaneli R.A.,Houton C.W. y Barnett S.M.:Appl. Microbiol. 30; 276-281 (1975).
- Saddler J.N.:Enzyme Microbiol. Technol. Vol. 4,p. 414-417 (1982).
- Sadana J.C.,Shewale J.G. y Desphande M.V.:Appl. Environ. Microbiol., 38,730-733 (1979).
- Selby K.,Maitland C.C. y Thompson K.V.A.:Biochem. J. 88,269-288 (1963).
- Selby K. y Maitland C.C.:Arch. Biochem. Biophys. 118,254 (1967).
- Selby y Maitland C.C.:Biochem. J. 104,716 (1967).
- Selby K.:In 1st. Intern. Biodeterior. Symp.;Biodeterioration of Materials. Vol. 1,Applied Science Pub. Ltd.,London p. 62 (1968).
- Semeniuk G. y Carmichel J.W.:Can. J. of Botany 44,105 (1966).
- Shoemaker S.P. y Brown R.D.:Biochim. Biophys. Acta,523;133-147 (1978).

Shibata S., Nisizawa K.: J. Biochem. 78,499 (1975).

Simmons E.G.: Abst. 2nd Int. Myc. Cong. 618 (1977).

Srinivasan V.R. y Han Y.W.: Adv. Chem. Series 95,447-468 (1969).

Stewart J.C., Stewart C.S. y Heptinstall J.: Biotechnology Letters Vol. 4 No. 7,459-464 (1982).

Stenberg D.: Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 5,107 (1975).

Stenberg D. y Dorval S.: Biotechnol. Bioeng. 21,181-191 (1979).

Storvick W.O. y King K.M.: J. Biol. Chem. 235,303-307 (1960).

Streamer M., Eriksson K.E., Pettersson B.: Eur. J. Biochem. 59,607-613 (1975).

Suzuki H., Yamane K. y Nisizawa K.: "Cellulases and their applications" Adv. Chem. Ser. 95,60 (1969).

Suzuki H.: In Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose. Aulanko, Finland, SITRA, Helsinki. p. 155 (1975).

Tangnu S.K., Blanch H.W. y Wilke C.R.: Biotechnol. Bioeng. 23,1837 (1981).

Toyama J.: Adv. Chem. Series 95,359 (1970).

Toyama N., Ogawa K.: In proc. 4th Intern. Fermentation Technology Today., Soc. Ferment. Technol., Ogaka p. 743 (1972).

Toyama N., Ogawa K.: In cellulose as a chemical and energy resource. Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 5. John Wiley & Sons. New York. p. 225-375 (1975).

Ueda K., Ishikawa S. y Asai T.: J. Agr. Chem. Soc. 26,35 (1952).

Vilela L.C., Torillo A.R., Ocampo A.T. y Rosario E.J.: Agr. Biol. Chem. 41,235-238 (1977).

Virkola N.E.: In Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose. Aulanko, Finland. SITRA, Helsinki, p. 319 (1975).

Walseth C.S.: TAPPI 35,228 (1952).

Whitaker D.R.: Arch. Biochem. Biophys. 49,257 (1954).

Wood T.M.: Biochem. J. 115,457 (1969).

Wood T.M.: Biochem. J. 109,217 (1968).

Wood T.M.: In Proc. 4th Intern. Symp., Fermentation Technology Today G. Teruri., Ed., Soc. Ferment. Technol. Osaka p. 711 (1972).

Wood T.M. y McCrae S.I.: Biochem, J. 128,1183-1192 (1972).

Wood T.M.: Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 5 p. 111 (1975).

Wood T.M. y McCrae S.I.: Carbohydr. Res. 57,117 (1977).

Wood T.M. y McCrae S.I.: Adv. Chem. Ser. 181.181 (1979).

Wood T.M.: In Abstr. 6th Int. Ferment. Symp. London, Canada p. 87 (1980).

Wood T.M., McCrae S.I. y Macfarlane C.C.: Biochem, J. 189;51-61 (1980).

Woodward J. y Wiserman A.: Biochim., Biophys. Acta 527,8 (1978).

Impresiones
arios al Instante s.a. de c.v.
REP. DE COLOMBIA No. 6, 1er. Piso
(CALLE 500 CON BRASIL)
MEXICO 1, D. F.
526 04-72 529-11 00