

03062



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**"SACARIFICACIÓN DEL BAGACILLO DE
CAÑA DE AZÚCAR POR LA ACCIÓN
COMBINADA DE SISTEMAS
CELULOLÍTICOS HETEROGENEOS"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA.
ÁREA BIOTECNOLOGÍA.**

P R E S E N T A :

Q. F. B. OSCAR GARCÍA KIRCHNER



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.

*Este trabajo fue realizado en el
Departamento de Biología Molecular
y Biotecnología del Instituto de
Investigaciones Biomédicas de la
U. N. A. M. bajo la tutoría del
Dr. Carlos Huitrón V.*

Dedicado

a quien más quiero

en este mundo:

A mí mismo.

*Sin dejar de considerar que "yo soy" miembro de una
Familia aún conformada por Padre, Madre, Hermano,
una Compañera y mis hijos Cristián Rodrigo y Percibald Axel.*

G R A C I A S

P O R S U A P O Y O .

*Asimismo, en un gesto de agradecimiento, entrego la semilla germinada
después de haberla visto crecer, valió el placer esperar, de vosotros será
la cosecha.*

A la memoria del Dr. Lino Díaz de León.

REFLEXIONES:

*He aprendido
que la medida del éxito
no es tanto por la posición
que uno ha alcanzado en la vida,
como por los obstáculos
que se han tenido que superar
en el intento por alcanzar las metas.*

De esta forma resulta necesario:

___ *Olvidar los errores del pasado y perseverar para las más
grandes obras del futuro* ___

Sin embargo conviene considerar los siguientes pensamientos:

*El método científico, si bien en
sus fórmulas mas refinadas
puede juzgarse complicado, es
en esencia de una notable
sencillez. Consiste en observar
aquellos hechos que permitan al
observador descubrir las leyes
generales que los rigen.*

Bertrand Russell

*Ya que: Quienes someten la Ciencia a sus intereses,
despojándola de su libre expresión, la reducen,
por decirlo así, a la esclavitud.*

*Fragmento de un Discurso de
Hipócrates al Senado y al pueblo
de Abderita (Trad. Conrado Tostado).*

Por lo mismo:

*“Doy gracias por haber transitado por este lugar donde
hay tanto por aprender y descubrir”.*

O. G. K.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
1.0 INTRODUCCIÓN	4
2.0 ANTECEDENTES	10
2.1 Características bioquímicas de las celulasas	12
2.1.1 Propiedades de las celulasas	14
2.1.2 Actividades enzimáticas predominantes de las preparaciones de celulasas	17
2.2 Mecanismo de acción de las celulasas	18
2.3 Fuentes de celulasas	21
2.3.1 Microorganismos con actividad celulolítica	21
2.4 Producción de celulasas	22
2.4.1 Aplicaciones actuales y potenciales de las celulasas	26
2.5 Características estructurales de la celulosa	28
2.5.1 Materiales lignocelulósicos y residuos agroindustriales	30
2.6 Sacarificación de los materiales lignocelulósicos	33
2.6.1 Hidrólisis ácida	33
2.6.2 Hidrólisis enzimática	34
2.7 Pretratamientos para incrementar la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de la celulosa	36
2.7.1 Pretratamientos físicos	39
2.7.2 Pretratamientos químicos	39
2.7.3 Pretratamientos biológicos	40
2.8 Alternativas biotecnológicas para el aprovechamiento de los materiales celulósicos y residuos agroindustriales	41
2.9 Capacidad sacarificante de sistemas celulolíticos heterogéneos y el efecto de sinergismo cruzado	41
2.9.1 Características de los sistemas celulolíticos evaluados con base a las actividades enzimáticas predominantes	47
3.0 MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.1 Microorganismos	50
3.2 Propagación de las cepas	50
3.3 Materiales celulósicos	51
3.4 Medios de cultivo para la producción de celulasas y xilanasas	51
3.5 Preparación del inóculo	52
3.6 Condiciones de cultivo para la producción de celulasas y xilanasas	53
3.7 Determinación de la actividad celulolítica sobre papel filtro	54
3.8 Determinación de la actividad celulolítica sobre CMC	54
3.9 Determinación de la actividad de beta-glicosidasa	55

	Página
3.10 Determinación de la actividad xilanolítica	55
3.11 Recomendaciones de la IUPAC para expresar las unidades de la actividad enzimática para los ensayos de celulasas	56
3.12 Determinación de proteína soluble	59
3.13 Obtención y conservación de los filtrados de cultivo con actividad celulolítica y xilanolítica	60
3.14 Concentración de los filtrados de cultivo con actividad celulolítica y xilanolítica	60
3.15 Sacarificación del papel filtro y bagacillo de caña sin pretratamiento	61
3.15.1 Sacarificación a tiempos cortos de hidrólisis	61
3.16 Sacarificación del bagacillo de caña a tiempos largos de hidrólisis en un reactor en lote con agitación.	62
3.17 Relación volumétrica seleccionada de acuerdo a la producción de azúcares reductores	63
3.18 Sacarificación del bagacillo de caña sin pretratamiento en un reactor en lote de 5 litros con agitación	64
4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
4.1 Medio y condiciones de cultivo para la producción de celulasas y xilanasas	66
4.2 Modificación al medio de cultivo original con reactivos grado industrial	67
4.3 Estandarización del contenido de proteína soluble y concentración de las actividades enzimáticas de los filtrados de cultivo con actividad celulolítica y xilanolítica	77
4.4 Sacarificación del papel filtro y bagacillo de caña sin pretratamiento a tiempos cortos de hidrólisis	78
4.5 Sacarificación del bagacillo de caña en una reactor en lote de 1000 mL con agitación	90
4.6 Evaluación de las condiciones de sacarificación del bagacillo de caña sin pretratamiento en un reactor de 1000 mL con la relación volumétrica 40/60 de los filtrados de cultivo de <i>Penicillium sp.</i> y <i>A. terreus</i>	96
4.7 Evaluación de las condiciones de sacarificación del bagacillo de caña sin pretratamiento con el sistema celulolítico mixto de <i>Penicillium sp.</i> y <i>A. terreus</i> en un reactor en lote de 5 L con agitación	109
5.0 CONCLUSIONES	114
6.0 BIBLIOGRAFÍA	117

RESUMEN

La celulosa es una fuente de carbono alternativa que se encuentra disponible en grandes cantidades en los vegetales y puede contribuir a la solución de los problemas para la obtención de energía, productos químicos y alimentos, aprovechando su potencial biotecnológico por medio de su bioconversión en azúcares solubles utilizando enzimas y/o bacterias, actinomicetos y hongos.

La conversión biológica de la celulosa para la obtención de azúcares solubles es realizada en condiciones suaves de temperatura, pH y presión, sin que cause problemas de deterioro ambiental lo que representa ventajas sobre el preceso químico. La celulosa nativa es hidrolizada enzimáticamente por un grupo de enzimas conocido como celulasas las cuales actúan sobre el mismo sustrato pero en diferente sitio de reacción para la conversión a glucosa.

Para la completa hidrólisis de la celulosa, se requieren cuando menos tres tipos de actividades enzimáticas diferentes: endo-beta-glucanasas (E.C. 3.2.1.4), exo-beta-glucanasas (E.C. 3.2.1.91) y beta glucosidasas (E.C. 3.2.1.21), las cuales actúan en forma sinérgica.

En México, existen subproductos agro-industriales que contienen principalmente celulosa y hemicelulosa (xilanos), que son subutilizados, no son tóxicos, están disponibles, se encuentran concentrados en los sitios de producción y pueden ser una fuente importante de azúcares solubles, tal es el caso del bagacillo de caña de azúcar, la pulpa de henequén y la cáscara de limón.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo está centrado en la evaluación de la sacarificación enzimática del bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento, utilizando sistemas celulolíticos heterogéneos, compuestos por las combinaciones entre los filtrados enzimáticos que presentan alta actividad celulolítica y xilanolítica producidos por los microorganismos: *Aureobasidium sp.* (CH-M-1018), *Penicillium sp.* (CH-M-1001) y *Aspergillus terreus* (CH-M-1013).

De esta forma, Inicialmente fue evaluada la actividad celulolítica obtenida sobre papel filtro y carboximetilcelulosa (CMC), la actividad de β -glucosidasa así como también la actividad xilanolítica cuando los tres hongos se cultivaron en bagacillo de caña de azúcar como única fuente de carbono.

Con los filtrados de cultivo obtenidos de la fermentación sumergida, se realizaron los ensayos de sacarificación enzimática *in vitro* del papel filtro y del bagacillo de caña de

azúcar en forma individual así como mediante la acción combinada de dos diferentes filtrados libres de células.

En todas las combinaciones probadas con los filtrados provenientes de *Aureobasidium sp.* (Ab), *Penicillium sp.* (Pe) y *Aspergillus terreus* (At) en las proporciones volumétricas (Ab: Pe-80:20 y 60:40) (Ab: At-80:20 y 60:40) (Pe: At-80:20, 60:40 y 40:60), se obtuvo una sacarificación mayor, es decir, la concentración de azúcares reductores que se obtuvieron a partir del papel filtro y del bagacillo de caña de azúcar fue más alta en las mezclas que en la suma de las actividades medidas por separado.

Se observó que las combinaciones de filtrados entre Ab: Pe y Ab: At 60:40, así como la combinación entre Pe: At 60:40 y 40:60, fueron las que mostraron mayor sacarificación del bagacillo de caña. Por lo mismo, se procedió a evaluar el comportamiento de la combinación Pe: At a las proporciones señaladas, pero ahora en un reactor agitado de 1 litro, bajo las mismas condiciones de hidrólisis y determinando la producción de azúcares reductores a diferentes intervalos durante 48 horas.

Una vez comprobado que la mejor proporción a nivel de reactor de 1 litro fue la de 40:60 de la combinación Pe: At, se probó a un volumen mayor utilizando un reactor de 5 litros con agitación bajo las condiciones de pH y temperatura óptimas determinadas previamente en el reactor de un litro y utilizando una concentración de 75 g de bagacillo de caña de azúcar nativo en 2500 ml de solución amortiguadora de citratos o sea manteniendo una concentración de 3.0% (w/v) de sustrato.

En este reactor agitado fue posible lograr un 43 % de conversión del bagacillo nativo en azúcares solubles; este efecto fue comparado con respecto a cada filtrado por separado bajo las mismas condiciones, lográndose obtener un 15.8 % de conversión con el filtrado de *Aspergillus terreus* y 14.5% con el de *Penicillium sp.*, respectivamente.

De esta forma, bajo las mismas condiciones de operación y la misma relación volumétrica inicialmente evaluada (0.5 ml de filtrado, 50 mg de sustrato y 1.0 ml de solución amortiguadora) en ambos sistemas de reacción fue posible lograr un incremento del 87% en la sacarificación del bagacillo de caña por efecto de la mezcla de filtrados celulolíticos de dos microorganismos, con respecto a la obtenida con el filtrado de *Penicillium sp.*, al actuar en forma individual. Esto permitió demostrar un efecto de sinergismo cruzado con este sistema celulolítico heterogeneo.

El incremento obtenido en la sacarificación del bagacillo de caña por el sistema mixto puede atribuirse a una complementación entre las actividades celulolítica y xilanolítica entre el sistema heterogeneo conformado por actividades enzimáticas complementarias. También se puede considerar que por efecto de la mezcla de filtrados se logró una mejor integración entre las actividades de endoglucanasas de los dos sistemas, aunque tampoco se puede dejar de tomar en cuenta el efecto de la beta-glucosidasa y de las xilanasas que se encuentran en mayor proporción en el filtrado de cultivo de ***Aspergillus terreus***.

1.0 INTRODUCCIÓN

Las celulasas son un conjunto de enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos beta-(1,4) de la celulosa produciendo azúcares solubles. El interés biotecnológico de estas enzimas radica en el potencial que ofrecen de utilizarlas en un bioproceso industrial, para la obtención de glucosa en una reacción de sacarificación a partir de residuos celulósicos urbanos y agrícolas que se obtienen como subproductos de procesos industriales.

Se estima que al año se sintetizan 180 billones de toneladas de celulosa principalmente por las plantas (Clarke, 1997), por lo que constituye una de las reservas de energía renovable más abundante en la naturaleza.

En nuestro medio, esos materiales son muy abundantes, pero son subutilizados y son considerados como desechos que contribuyen a elevar los niveles de contaminación ambiental debido a que se vierten en los ríos y lagunas de la región donde son producidos. Estos materiales lignocelulósicos, en particular los considerados como subproductos agrícolas, proporcionarían el sustrato para la obtención de azúcares solubles por medio de una hidrólisis enzimática los cuales serían utilizados en diversos procesos de fermentación (Saddler y cols., 1984; Vallander y Eriksson, 1985; Araujo y D'Souza, 1986; Waldron y Eveleigh, 1986). Sin embargo, la celulosa de los vegetales, es difícil de ser degradada debido a varios factores entre los que sobresalen: su insolubilidad, el alto grado de cristalinidad y la asociación existente con la hemicelulosa y la lignina.

Con el fin de lograr una hidrólisis total de la celulosa se requiere someter al material que la contiene a un pretratamiento (físico, químico o biológico) para hacerla más susceptible al ataque enzimático, así como de un sistema enzimático completo; ya que el término celulasas, no se refiere a una sola enzima sino más bien a un complejo multienzimático constituido de cuando menos 3 actividades diferentes que actúan en

conjunto de forma simultánea para realizar una completa biodegradación de la celulosa hasta D-glucosa (Walker y cols., 1992; Wood y cols., 1989). De hecho todos los organismos conocidos que degradan la celulosa cristalina, producen una serie de enzimas celulolíticas con distintas especificidades que actúan conjuntamente y en forma complementaria para degradarla. La celulosa nativa o pura, contenida en diversos materiales lignocelulósicos, para ser hidrolizada completamente hasta glucosa requiere la acción concertada de un mínimo de tres tipos básicos de actividades que incluyen a: las **endoglucanasas** (1,4 beta-glucan 4 glucanohidrolasa; E.C. 3.2.1.4), las **exoglucanasas** o **celobiohidrolasas** (1,4 beta-glucan 4 celobiohidrolasa; E.C. 3.2.1.91) y la **beta-glucosidasa** (beta-glucósido glucohidrolasa, E.C. 3.2.1.21), (Kanda, 1980).

Se conocen diversos organismos capaces de producir celulasas distribuidos en grupos taxonómicos variados que se encuentran en toda la "biota" donde existan materiales lignocelulósicos; sin embargo, las enzimas con actividad celulolítica provenientes de estas fuentes, difieren en sus características moleculares, en la actividad catalítica, en su especificidad al sustrato y en el grado de adsorción a la celulosa (Ryu y Mandels, 1980). Los hongos son organismos muy importantes en la descomposición de la celulosa y en el reciclamiento del carbono en la naturaleza (Carlile y Watkinson, 1997); por lo general, producen sistemas enzimáticos extracelulares completos, debido a esto se les considera buenas fuentes de celulasas de aplicación industrial, a diferencia de las bacterias celulolíticas. De hecho, solamente aquellos organismos que poseen actividad de exoglucanasa además de la endoglucanasa (como los hongos filamentosos celulolíticos), son capaces de hidrolizar la celulosa nativa o cristalina.

A este respecto, las celulasas producidas comercialmente provienen principalmente de *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* y *Penicillium funiculosum* (Peterson, 1987); resultando *Trichoderma* y las cepas mutantes derivadas del mismo, los productores de

celulasas mejor conocidos y mas estudiados. Pero aunque se conoce su capacidad celulolítica extracelular así como la de otros hongos filamentosos, el principal problema para la utilización a gran escala de sus preparaciones enzimáticas en la producción de azúcares solubles sigue siendo la baja velocidad de hidrólisis de los materiales celulósicos (Linko, 1977), así como los bajos rendimientos en la producción de estas enzimas.

Trichoderma viride es considerado como el mejor productor de celulasas (Mandels, 1975). Sin embargo, debido a la relativamente baja actividad específica de la enzima, para actuar sobre la porción cristalina de la celulosa, se necesita una relación enzima-sustrato alta, que es difícil de obtener actualmente. Este hecho puede ser causado por la falta o disminución de la concentración de alguno de los componentes del sistema enzimático celulolítico.

Vale la pena recordar que no todos los microorganismos celulolíticos tienen la capacidad de producir sistemas enzimáticos extracelulares suficientemente activos y en donde se encuentren todos los componentes necesarios, para degradar a la celulosa cristalina. De hecho, muchos microorganismos capaces de crecer sobre celulosa nativa no producen en forma extracelular la actividad enzimática capaz de degradar "in vitro" a ese tipo de celulosa. Existen otros microorganismos que únicamente producen en forma extracelular endoglucanasas o beta-glucosidasa, por lo cual tampoco hidrolizan a la celulosa cristalina. Sólo aquellos filtrados de cultivo, que poseen además, la actividad de exoglucanasa (como *T. reesei*) son capaces de hidrolizar a este tipo de celulosa. Sin embargo, la actividad de beta-glucosidasa en este hongo es deficiente, lo cual limita su capacidad sacarificante para llegar hasta glucosa como producto final.

Considerando este aspecto, la adición de esa enzima proveniente de otras fuentes, actúa en forma complementaria y ha servido para aumentar la velocidad y el grado de

sacarificación de la celulosa, debido a que ocurre una hidrólisis y por lo tanto una disminución de la concentración de celobiosa, que es un potente inhibidor de las exoglucanasas (Mandels y Andreotti, 1978).

Otro factor que interviene en la reacción hidrolítica de los materiales lignocelulósicos es el sinergismo existente entre los componentes que conforman el sistema enzimático, (Wood y Mc Cree, 1975; Petterson, 1975). Por sinergismo se entiende que la producción de azúcares solubles por efecto de la mezcla de los diferentes componentes enzimáticos del sistema celulolítico es mayor que la suma de la acción de cada uno de ellos por separado. Puede presentarse como sinergismo entre enzimas de un mismo microorganismo y sinergismo cruzado entre dos cepas microbianas diferentes. En este sentido, es importante contar con cepas celulolíticas, que posean sistemas enzimáticos completos que pueden actuar en forma complementaria y sinérgica con los de otros microorganismos. Considerando lo anterior, sería posible aumentar la eficiencia de las celulasas y lograr mejores rendimientos en la reacción de sacarificación, produciendo mayor concentración de azúcares a partir de los materiales celulósicos de desecho. Por lo mismo, sería conveniente intentar obtener sistemas celulolíticos mas eficientes en la degradación de la celulosa organizada, por la combinación "*in vitro*" de enzimas celulolíticas de diferentes cepas microbianas.

De hecho, varios estudios han demostrado que es posible establecer un sinergismo cruzado entre celulasas provenientes de sistemas microbianos distintos (Beldman y cols., 1988; Henrissat y cols., 1985; Klyosov, 1980; Walker y cols., 1992; Wood, 1992; Wood y cols., 1989; Woodward y cols., 1988). Algunas celulasas de hongos y bacterias han sido identificadas, caracterizadas y estudiadas por su habilidad de actuar sinérgicamente (Walker y cols., 1992; Kanda y cols., 1980; Wilke y cols., 1976; Woodward y cols., 1988;

Knowles y cols., 1987; Fan y Beardmore, 1980; Focker y cols, 1984; Ryu y cols., 1982; Welmar y Watson, 1985; Gharpuray y cols., 1983; Irwin y cols. 1993).

Un ejemplo de sinergismo cruzado es el trabajo de Lamed y cols. (1983) en el cual se logra un aumento de 10 veces en la degradación de la celulosa microcristalina por medio de la hidrólisis de la celobiosa acumulada al combinar la beta-glucosidasa purificada de *A. niger* con el sistema celulolítico de *Clostridium thermocellum*. El sinergismo ha sido estudiado empleando componentes enzimáticos purificados de los sistemas celulolíticos. Este hecho fue importante en su momento porque sólo de esta forma se pudo comprobar claramente la existencia de dicho fenómeno. Como ya ha sido mencionado, la mayor parte de los estudios reportados se refieren al sinergismo entre los componentes celulolíticos, pero prácticamente no existen estudios sobre sinergismo de celulasas con otras enzimas extracelulares relacionados a la degradación de materiales celulósicos nativos.

Desde el punto de vista Biotecnológico es importante la utilización de sistemas celulolíticos complementados o mejorados por la combinación de componentes enzimáticos de sistemas celulolíticos fraccionados y/o purificados, por la combinación de sistemas celulolíticos completos, o por la mezcla de filtrados libres de células provenientes de dos o más cepas con diferentes perfiles enzimáticos, de tal forma que se puedan obtener combinaciones o sistemas heterogéneos que sean mas eficaces para la sacarificación no sólo de la celulosa, sino también de materiales celulósicos de desecho que se producen en agroindustrias ya establecidas.

Nuestro grupo de trabajo ha estado interesado en la sacarificación de un material celulósico nativo y de desecho que es rico en celulosa y hemicelulosa y que puede servir como fuente de azúcares utilizables en diferentes bioprocesos con aplicación industrial. En México, el bagacillo de caña de azúcar es una alternativa para ese fin, dado que

potencialmente representa una fuente de azúcares; es un recurso natural renovable que se produce en grandes volúmenes anualmente en las regiones tropicales y subtropicales en donde se localizan los ingenios azucareros y es además subutilizado. Sin embargo, los intentos para su utilización biotecnológica hasta ahora han requerido que se someta a pretratamientos para disminuir la cristalinidad de la celulosa y su asociación con otros componentes químicos, con el fin de aumentar su degradabilidad y por tanto la concentración de azúcares solubles.

La principal desventaja que tienen los diversos métodos de pretratamiento conocidos, es el costo que representa su aplicación. Por lo mismo resulta interesante intentar obtener sistemas enzimáticos mas efectivos para la degradación completa de la celulosa organizada y de los materiales celulósicos nativos por medio de la combinación "in vitro" de sistemas celulolíticos completos, obtenidos de diferentes cepas de hongos filamentosos, que presenten perfiles enzimáticos extracelulares distintos de las actividades celulolíticas predominantes, así como de otras enzimas relacionadas con las celulasas.

Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo está centrado en la evaluación de la sacarificación enzimática del bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento, utilizando sistemas celulolíticos heterogéneos, es decir, efectuando diferentes combinaciones entre los filtrados de cultivo libres de células con actividad celulolítica y xilanolítica producidos por el hongo levaduriforme *Aureobasidium sp. (CH-M-1018)* y por los hongos filamentosos *Penicillium sp. (CH-M-1001)* y *Aspergillus terreus (CH-M-1013)*.

2.0 ANTECEDENTES

La celulosa es un polisacárido lineal formado por residuos de glucosa unidos por enlaces beta 1-4. Estas cadenas lineales de celulosa interaccionan entre sí por medio de enlaces de puentes de hidrógeno, dando lugar a la formación de microfibrillas con regiones altamente ordenadas que le dan las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático y que se conocen como regiones cristalinas. Cuando a lo largo del haz de cadenas se rompen los puentes de hidrógeno, se forman regiones denominadas amorfas, que permiten su hidratación y mejor accesibilidad al ataque enzimático.

La celulosa nativa que se encuentra en los materiales de origen vegetal, es bastante difícil de degradar debido a sus características estructurales, su cristalinidad y su asociación con otros materiales como la lignina. Para realizar la degradación de la celulosa cristalina pura así como la contenida en los materiales lignocelulósicos, se requiere de la participación en forma complementaria y sinérgica de un sistema enzimático celulolítico completo, y por lo general, es necesario someter al material lignocelulósico a un pretratamiento para hacerlo más susceptible a la acción enzimática.

Por este motivo, la descomposición de estos materiales en la naturaleza es un proceso microbiológico muy lento, ya que la lignina que recubre las fibras de celulosa es resistente a la degradación. Dentro de los organismos que producen enzimas capaces de degradar a la celulosa, se encuentran incluidas plantas (vegetales); por ejemplo la enzima necesaria para la maduración del aguacate (Award y Lewis, 1980); pero en realidad los microorganismos representan la gran mayoría de los productores de celulasas conocidos. Dentro de los ejemplos más representativos se encuentran: *Trichomitopsis termopsidis*, un protozoario que establece una relación simbiótica con las termitas (Odelson y Breznak, 1985); *Thermonospora curvata*, un actinomiceto termofílico (Wood y cols., 1984); *Trichoderma pseudokoningii*, un hongo filamentosamente

(Sidhu y Sandhu, 1985); *Trichosporon cutaneum* una levadura (Stevens y Payne, 1977) y *Ruminococcus flavefaciens*, una bacteria anaerobia del rumen (Lathan y Wolin, 1977; Ozkan y cols., 2002).

Los hongos son los organismos más estudiados como degradadores de los materiales lignocelulósicos (Taj-Alden y cols., 1990), ya que por lo general son de 50 a 1000 veces más celulolíticos que las bacterias más activas (Saddler y cols., 1984), y por lo tanto resultan esenciales en el reciclamiento del carbono en la naturaleza, que por medio de la fotosíntesis se regenera anualmente.

De este modo las mejores fuentes de celulasas conocidas corresponden a especies de *Trichoderma*, *Phanerochaete*, *T. emersonii*, *Penicillium*, *Aspergillus niger*, *Sclerotium rolfsii* y el hongo de la pudrición blanca *Sporotrichum pulverulentum* (Tanaka y Matsumo, 1985; Saddler, 1986). De éstos, *Trichoderma reesei*, un hongo filamentoso mesofílico y las mutantes derivadas de él, es uno de los productores de celulasas mejor conocidos (Chadhary y Tauro 1982).

Sin embargo, aunque las celulasas tienen algunos usos, el interés biotecnológico de estas enzimas y su principal aplicación práctica radica en utilizarlas para hidrolizar en mayor escala los diversos materiales lignocelulósicos existentes, que representan una fuente potencial de azúcares solubles que puedan ser utilizables en otros bioprocesos. La glucosa obtenida después de la completa hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos puede ser utilizada como sustrato de fermentaciones para la producción de: proteína unicelular, etanol, aminoácidos y otros productos (Wright y cols., 1988).

Como es posible apreciar, existen diversos factores que influyen en mayor o menor grado en la hidrólisis enzimática de la celulosa, por lo cual conviene analizar en forma particular a cada uno por separado.

2.1.-Características bioquímicas de las celulasas.

Las celulasas son enzimas hidrolíticas que forman parte de un complejo, que requiere la participación sinérgica de sus componentes para el completo rompimiento de los enlaces beta-1,4 de la celulosa, hasta unidades monoméricas de glucosa.

Las celulasas son enzimas inducibles como un sistema multienzimático compuesto de 5 o más enzimas diferentes (Knowles y cols., 1987), aunque tradicionalmente se conocen 3 clases: las **endoglucanasas**, las **exoglucanasas** o **celobiohidrolasas** y las **beta-glucosidasas**. En la figura 1 es posible observar lo anteriormente señalado.

En las bacterias, las actividades celulolíticas son producidas en pequeñas cantidades (menos de 0.1 g/l)-(Lamed y cols., 1983), y en el caso de *Clostridium thermocellum* forman un complejo multienzimático; el celulosoma, el cual es difícil de disgregar sin que exista una pérdida en la actividad de los componentes individuales. Los microorganismos que producen sistemas celulolíticos en forma de complejos (celulosomas) se encuentran típicamente en ambientes anaerobios en donde existen en consorcio con otras especies microbianas tanto celulolíticas como no-celulolíticas (Bayer y cols., 1994; Ohara, 2000; Schwarz, 2001).

Los celulosomas son protuberancias producidas sobre la pared celular de las bacterias celulolíticas cuando crecen sobre un material celulósico. Esas protuberancias son complejos enzimáticos estables que están unidos firmemente a la pared celular pero son lo suficientemente flexibles para pegarse también en la porción cristalina de la celulosa.

Las celulasas de hongos pueden obtenerse en mayores cantidades (más de 20 g/l) (Montenecourt, 1983) y no forman complejos físicos entre los componentes, pero actúan en forma sinérgica.

La composición de complejo enzimático de celulasas, varía según el origen, es decir, de acuerdo al microorganismo del cual proviene. Los componentes de los sistemas

celulolíticos se clasifican inicialmente con base en su modo de acción catalítica; sin embargo, recientemente también han sido consideradas sus propiedades estructurales (Henrissat y cols., 1998).

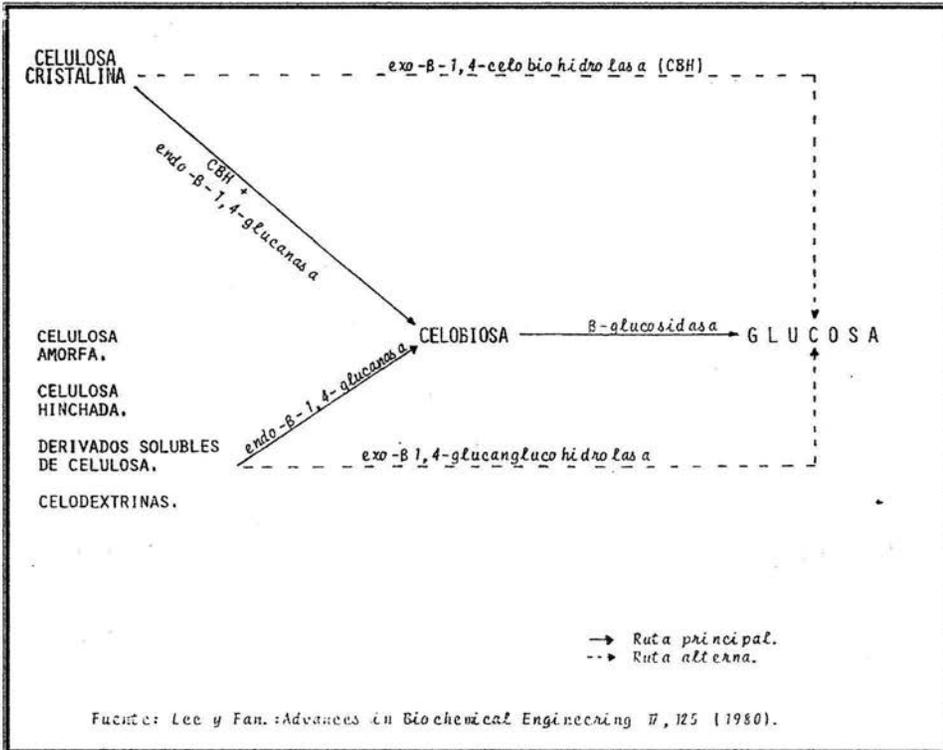


Figura 1.- Esquema representativo de las posibles vías para la degradación enzimática de la celulosa.

2.1.1.-Propiedades de las celulasas.

Las celulasas obtenidas de fuentes diversas, difieren en sus características moleculares, grado de adsorción a la celulosa, actividad catalítica y en la especificidad al sustrato (Reese y Mandels, 1980). Otro aspecto importante es que la composición de las enzimas que conforman el sistema de celulasas no es uniforme con respecto al tipo de actividad de cada componente, sobre todo en las diversas preparaciones comerciales de las que se dispone. Una característica general de la mayoría de las celulasas es una estructura modular que por lo general incluye tanto un sitio catalítico como también un módulo de unión al carbohidrato (CBD).

Este último actúa uniéndose a la superficie de la celulosa con la finalidad de facilitar la hidrólisis haciendo llegar el sitio catalítico a una posición cercana al sustrato. La presencia de estos sitios de unión (CBD) es particularmente importante para el inicio de acción de las exo-glucanasas (Terri y cols., 1998).

Aún no se encuentra aún bien definido el mecanismo de acción y el sinergismo que se presenta entre ellas para realizar su acción, y así llevar a cabo la completa hidrólisis de la celulosa. Lo anterior se debe en parte a que se ha demostrado que cada tipo de componente que integra determinado sistema enzimático con actividad celololítica, consiste de una multiplicidad de formas con aparente doble función.

El peso molecular de las celulasas varía de 38,000 a 75,000. Por lo mismo, las celulasas no pueden penetrar fácilmente a través del sello de lignina que recubre a las fibras de celulosa. De este modo, el principal problema que se presenta en este caso, es la poca accesibilidad que tiene el sustrato a las enzimas (Tsao y cols., 1978).

Las celulasas (endo-glucanasas, celobiohidrolasas y beta-glucosidasa) obtenidas a partir de hongos filamentosos, han sido purificadas (como puede observarse en las Tablas 1, 2 y 3).

Los estudios de purificación y fraccionamiento han mostrado que los tres tipos de enzimas celulolíticas se presentan en formas múltiples. Han sido aisladas de *T. reesei* y *T. koningii*, cuando menos de cuatro a cinco diferentes endoglucanasas y dos celobiohidrolasas. Varias de ellas son glicoproteínas con una gran variación en el contenido de polisacárido.

TABLA 1
CELOBIOHIDROLASAS DE HONGOS

MICROORGANISMO	ENZIMA	PESO MOLECULAR	PUNTO ISOELÉCTRICO	CONTENIDO DE CARBOHIDRATO (%)	Ref.
<i>Trichoderma reesei</i>	CBH I	60 000	3.9	(+)	Pettersson y cols., 1981
	CBH II	60 000	5.6	(+)	
<i>Trichoderma koningii</i>	CBH ₁	62 000	3.8	33	Wood, 1981
	CBH ₂	62 000	3.95	9	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	CBH	48 600	4.30	0	Eriksson, 1975

(+) Carbohidrato presente sin reportar el contenido.

Ref. Enari, (1983).

TABLA 2
ENDOGLUCANASAS DE HONGOS

MICROORGANISMO	ENZIMA	PESO MOLECULAR	PUNTO ISOELÉCTRICO	CONTENIDO DE CARBOHIDRATO (%)	Ref.
<i>Trichoderma reesei</i>	I	20 000	7.5	(-)	Pettersson y cols., 1981
	II	40 000	4.6	0	
<i>Trichoderma koningii</i>	E ₃	43 000	4.72	(-)	Wood, 1981
	E _{3a}	48 000	4.32	(-)	
	E _{3b}	48 000	4.32	(-)	
	E ₄	31 000	5.09	(-)	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	T ₁	32 300	5.32	10.5	Eriksson, 1975
	T _{2a}	36 700	4.72	0	
	T _{2b}	28 300	4.40	7.8	
	T _{3a}	37 500	4.65	4.7	
	T _{3b}	37 000	4.20	2.2	

(-) No hay reporte sobre el contenido de Carbohidrato.

Ref. Enari, (1983).

TABLE 3
 β-GLUCOSIDASAS DE HONGOS

MICROORGANISMO	PESO MOLECULAR	PUNTO ISOELÉCTRICO	CONTENIDO DE CARBOHIDRATO (%)	Ref.
<i>Trichoderma reesei</i>	47 700	5.74	0	Berghem y Petterson , 1974
<i>Trichoderma reesei</i>	35 000	(-)	0.01	Enari y cols., 1980
	130 000	(-)	(-)	
<i>Trichoderma koningii</i>	39 800	5.53	0	Wood, 1981
	39 800	5.83	1-2	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	165 000 – 172 000	(-)	(-)	Deshpande y cols., 1978
	175 000 – 182 000	(-)	(-)	
<i>Aspergillus oryzae</i>	218 000	4.3	10	Mega y Matsushinia, 1979
<i>Aspergillus niger</i>	150 000	(-)	0.03	Enari y cols., 1980

(-) No hay reporte sobre el contenido de Carbohidrato.

Ref. Enari, (1983).

2.1.2.-Actividades enzimáticas predominantes en las preparaciones de celulasas.

El sistema celulolítico de *Trichoderma* es de los que ha sido evaluado más ampliamente (Terri y cols., 1992). El modo de acción de cada componente se muestra en la Fig. 2.

Una descripción resumida de cada uno de ellos, así como de su modo de acción, es la siguiente:

Endo-beta-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4). Contiene varios componentes (dos o más) que varían en su grado de acción al azar. Uno de ellos puede ser la enzima que actúa sobre la celulosa cristalina: sin embargo, actúa en forma aleatoria, principalmente sobre CMC, celulosa hinchada con H_3PO_4 (celulosa *Walseth*) y celodextrinas. Este componente no actúa sobre celobiosa. Los principales productos de su acción son la celobiosa y la celotriosa.

Exo-beta-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.91). Presenta varias formas. La beta-1,4-glucan-glucohidrolasa la cual remueve una sola unidad de glucosa de la porción terminal no reductora de la cadena de celulosa. Esta enzima actúa sobre la celulosa *Walseth*, CMC y las cadenas de celodextrinas de 4 a 7 unidades producidas por la acción de la endoglucanasa; sin embargo, ataca con dificultad a la celulosa insoluble.

La beta 1,4-glucan celobiohidrolasa (**CBH**) remueve una unidad de celobiosa de la porción no terminal de la cadena. Este componente es el que tiene la mayor afinidad por la celulosa pero no ataca la CMC y actúa muy lentamente sobre la celulosa hinchada con H_3PO_4 . Aunque no es capaz de atacar la celulosa cristalina en forma significativa, puede degradar los substratos celulósicos, removiendo en forma sucesiva residuos de celobiosa de las cadenas terminales. Sin embargo, cuando la CBH es re-combinada con los demás componentes del sistema enzimático, contribuye aumentando la hidrólisis del algodón o de la celulosa cristalina.

Las celobiohidrolasas I y II (CBH₂) representan aproximadamente el 60 y el 70% respectivamente de las celulasas secretadas por *Trichoderma reesei* (Goyal y cols., 1991).

β-glucosidasa. (EC. 3.2.1.21). Hidroliza la celobiosa y los celo-oligosacáridos de cadena corta a glucosa. No tiene efecto sobre la celulosa. Hidroliza rápidamente la celobiosa y la celotriosa, pero su velocidad disminuye marcadamente cuando existe un incremento en el grado de polimerización, lo cual es un efecto contrario al de las exo-beta-1, 4 glucanasas que actúan de preferencia sobre los celo-oligosacáridos de cadena larga.

Se sabe que al estar aisladas, estas enzimas ejercen muy poca actividad sobre la celulosa pura. Sólo la asociación de las diferentes actividades hace posible la hidrólisis completa de los materiales celulósicos, debido particularmente a un sinergismo muy marcado entre las endo y las exoglucanasas. Wood y Mc Crae (1978) señalaron que se requiere la formación de un complejo entre las endoglucanasas y la celobiosahidrolasa, sobre la superficie de la cadena de celulosa, para la manifestación de sinergismo entre ellas. La composición del sistema enzimático en estas diferentes actividades es primordial para una mayor eficiencia del sistema. Si alguna de las actividades no es significativa, todo el sistema será afectado (Paquot y Thonart, 1986).

2.2.-Mecanismo de acción de la celulasas.

La velocidad de reacción en la hidrólisis enzimática se ve afectada tanto por características estructurales de la celulosa, incluyendo la cristalinidad, el grado de polimerización, el tamaño de partícula y el área de superficie accesible al ataque (Fan y cols., 1980); así como por el modo de la acción enzimática. La reacción es catalíticamente heterogénea, se encuentra caracterizada por un reactante insoluble (celulosa) y un catalizador soluble (celulasas).

La velocidad de la reacción durante la hidrólisis enzimática de la celulosa se encuentra en función del área superficial del sustrato, ya que se requiere como un prerequisite de la reacción, un contacto físico directo entre las moléculas de celulosa y las celulasas (Klyosov y Rabinowitch, 1980). De hecho, se ha demostrado que existe una correlación entre la cantidad de enzima adsorbida y la velocidad de la reacción enzimática (Stone y cols., 1969), por lo que la cantidad de enzima adsorbida depende del área superficial interna del sustrato insoluble y se ha llegado a establecer que a una mayor área superficial, existe una velocidad de hidrólisis mayor.

Es importante también tomar en cuenta que el grado de sacarificación obtenido, depende del tipo de celulosa utilizada y también del grado de inhibición ocasionado por producto final o intermediario; ya que la glucosa obtenida en la hidrólisis enzimática, se encuentra a un nivel de 50 g/l (Mandels y Weber, 1969). A concentraciones de glucosa mayores de 20 g/l, existe una inhibición muy significativa de la actividad catalítica de las celulasas (Gusakov y cols., 1987), por lo que también se utilizan bajas suspensiones de los materiales lignocelulósicos evaluados (10 g/l), con la finalidad de evitar ocasionar un efecto inhibitorio por producto final, cuando se logren niveles de conversión elevados (Sinitsyn y cols., 1991).

El mecanismo de acción de cada componente en el proceso de hidrólisis de los materiales lignocelulósicos, consiste en que las endoglucanasas se adsorben a la superficie de la celulosa, atacando el interior del polímero y obteniéndose nuevas cadenas cortas. Posteriormente, la exoglucanasa remueve las unidades de celobiosa de esas cadenas por el extremo terminal no reductor. La celobiosa producida durante esta reacción puede acumularse en la solución y ejercer un efecto inhibitorio sobre la actividad de exoglucanasas. Durante la etapa final en la fase acuosa, la beta-glucosidasa remueve unidades de glucosa a partir de la celobiosa, por lo que la

acumulación de glucosa ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad de esta enzima. A concentraciones elevadas de glucosa se presenta el efecto de transglucosidación obteniéndose de nuevo celobiosa, con lo cual puede presentarse otra limitante en el proceso de hidrólisis (Wright y cols., 1988).

Un aspecto que tiene mucha importancia en esta reacción, es el efecto sinérgico existente entre los componentes del sistema enzimático de las celulasas, y que cada tipo de enzima puede existir en una multiplicidad de formas con aparente doble función (Mandels, 1982). Por consiguiente, el determinar cual es el balance en el sistema en cuanto a la cantidad de enzima necesaria para efectuar una hidrólisis más eficiente, es importante.

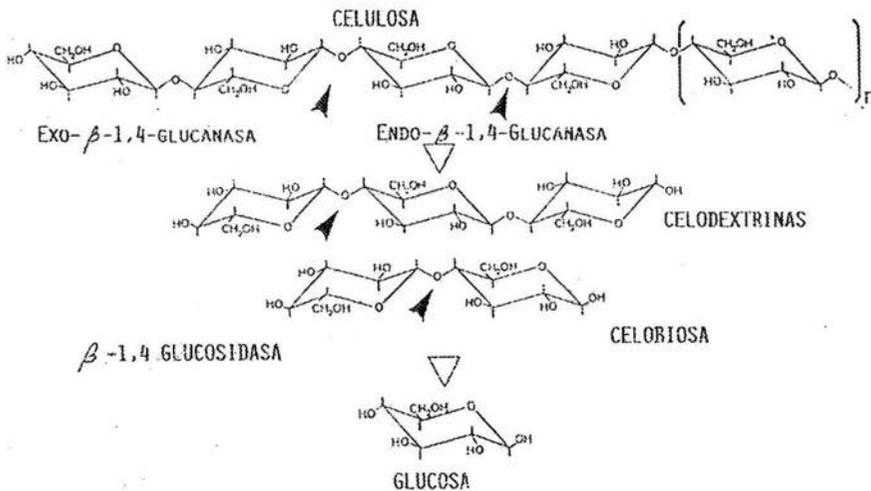


Fig. 2.- Estructura glucosídica de una fibra de celulosa y de las enzimas involucradas en la hidrólisis de la celulosa.

Mc Neil, et al (1984).

2.3.-Fuentes de celulasas.

2.3.1.-Microorganismos con actividad celulolítica.

Las celulasas pueden obtenerse tanto de bacterias como de hongos. Las bacterias celulolíticas incluyen especies aeróbicas de las familias *Pseudomonales* y *Actinomicetales*, anaerobios facultativos como *Bacillus* y *Cellulomonas* así como también anaerobios estrictos como *Clostridium*.

Aunque existe un gran número de microorganismos celulolíticos, las celulasas de hongos se encuentran disponibles en el mercado. Sin embargo, se ha encontrado un gran número de especies bacterianas cuyas enzimas poseen características similares y en muchos casos han demostrado superar las propiedades de las de origen fúngico. Entre las bacterias celulolíticas aerobias, el género *Cellulomonas* produce una amplia variedad de glucanasas y tiene la capacidad de degradar varios carbohidratos, como xilana, almidón y celulosa (Chaudhary y cols., 1997; Doi, 2003; Fuchs, 2003).

Sin embargo, comparadas con los hongos, las bacterias celulolíticas producen bajos niveles de actividad celulolítica y las mejores productoras de celulasas pertenecen al género *Clostridium* (Persson y cols., 1991). Actualmente se conoce que las bacterias anaerobias producen un único complejo multienzimático extracelular llamado celulosoma (Schwarz, 2001).

Otras bacterias y hongos producen sistemas celulolíticos que degradan celulosa modificada como la carboximetilcelulosa (CMC) pero que no pueden atacar celulosa de tipo cristalino (Enari y cols., 1975; Goksoyr y cols., 1975). Varios organismos termofílicos han sido probados como fuentes potenciales de celulasas termoestables (Goksoyr y cols., 1975; Mandels, 1975; Stutzenberg, 1972). Sin embargo, las enzimas celulolíticas de tales microorganismos no resultaron necesariamente más estables a elevadas temperaturas que las de los mesófilos (Mandels, 1975).

Las celulasas mas activas para una reacción de sacarificación son las obtenidas de hongos filamentosos como *Trichoderma reesei*, *T. viride*, *T. lignorum* (Mandels y cols., 1974; Mandels, 1975) o también con *T. koningii* (Halliwell y Griffin, 1973) *T. pseudokoningii* (Zhu y cols., 1982). Sin embargo, no todos los microorganismos celulolíticos, aunque posean la característica de aprovechar la celulosa, tienen la capacidad de producir sistemas enzimáticos lo suficientemente activos para que se encuentren todos los componentes necesarios o bien éstos estén en las cantidades requeridas para una completa hidrólisis de la celulosa.

El probar nuevos microorganismos celulolíticos aún no ha conducido a sistemas de celulasas con una mayor actividad específica o bien a una mayor eficiencia en la reacción de sacarificación. Por ejemplo, el desarrollo de nuevas mutantes en las cepas de *Trichoderma* ha dado lugar a mayor cantidad de enzima producida y ligeros incrementos en la productividad, pero las propiedades o balance de las actividades enzimáticas presentes en el sistema, no han sido modificadas (Mandels, 1982).

2.4.-Producción de celulasas.

Existe gran interés en la producción de enzimas con actividad celulolítica para ser utilizadas en la hidrólisis enzimática de diversos materiales celulósicos. Los trabajos existentes al respecto, se diferencian en el microorganismo productor, las mutantes obtenidas del mismo, o bien el tipo de material utilizado como inductor de la actividad celulolítica (Mandels y Weber, 1969; Mandels, 1982; Deubald y Crawford, 1987; Mohagheghi y Grohman, 1988; Gallo, 1981; Hannele y Siegler, 1985; Scharffner y Toledo, 1991; Lynd y Zhang, 2002). Los avances al respecto, se encuentran enfocados a la obtención de altas concentraciones de enzima con una elevada actividad específica ya que la clave del proceso de hidrólisis se relaciona con este aspecto.

Los hongos filamentosos son capaces de producir extracelularmente las celulasas, por lo que algunos de ellos son utilizados a nivel industrial para la producción de celulasas por cultivo semisólido (Toyama, 1976) y por fermentación sumergida (Nystrom y Allen, 1976). Las celulasas de origen fúngico son las que actualmente siguen dominando con respecto a las aplicaciones de estas enzimas a nivel industrial (Nieves y cols., 1998; Sheehan y Himmel, 1999).

Trichoderma viride es el microorganismo más utilizado para la producción de celulasas. Las cepas de este hongo filamentoso producen todos los componentes requeridos para una hidrólisis completa de la porción cristalina de la celulosa; sin embargo, tiene bajos niveles de beta-glucosidasa y no ataca a la lignina (Mandels y cols., 1971; Ryu y Mandels, 1980). Por lo mismo, la búsqueda de nuevas y posibles fuentes de celulasas es conveniente y se ha intentado producirlas con otros hongos como: *Aspergillus foetidus*, *A. fumigatus* y *A. niger*. Las celulasas de estos hongos tienen buena actividad de endoglucanasa y beta-glucosidasa, pero baja de exoglucanasa, con lo cual su capacidad para hidrolizar celulosa cristalina es muy limitada, como ha sido señalado. Por consiguiente, la composición del complejo enzimático varía según el origen, es decir, según el microorganismo celulolítico del cual proviene: La tendencia actual es seleccionar la cepa con mayor capacidad de producción de actividad celulolítica según el material celulósico que se pretende aprovechar, ya que la producción de celulasas representa una parte importante del costo total del proceso de sacarificación.

Considerando los trabajos de Reese, Mandels (1957) y colaboradores (1969); *T. viride* es el microorganismo productor mas potente de celulasas y la mayoría de los estudios sobre la fisiología de la formación de celulasas se han llevado a cabo con este organismo. Los estudios realizados con este hongo no deben dejar de considerar a otros microorganismos productores de celulasas con diferentes características, ya que, aún

entre la misma especie, existen diferencias significativas en la producción de celulasas para cada cepa aislada (Mandels y Weber, 1969). Otra opción que no debe dejarse a un lado es continuar con el aislamiento de nuevos microorganismos celulolíticos que tengan mayor actividad específica, resistencia a inhibición por producto y a la inactivación térmica (Showhat y cols., 1993).

Prácticamente todos los reportes sobre la producción de celulasas se basan en experimentos realizados a nivel de laboratorio en cultivos por lote por fermentación líquida o sumergida. También se han realizado cultivos continuos o semicontínuos, efectuando un mayor o menor control de los parámetros de la fermentación. Como la purificación de la enzima presenta algunos problemas, en muchas ocasiones se utiliza de manera directa el caldo de la fermentación, adicionándose al desperdicio celulósico por sacarificar.

Las condiciones de cultivo para la producción de las enzimas parece depender de una relación compleja que involucra la participación de varios factores como son el tamaño del inóculo, la fuente de carbono (calidad de la celulosa), el valor del pH, la temperatura, la presencia de inductores y/o inhibidores y agentes tensoactivos, el volumen de operación, la aireación, el tiempo de crecimiento y el de producción, por lo cual es difícil hacer generalizaciones acerca de los efectos de cada uno de esos factores en forma individual (Goksoyr y Erikson, 1980).

Así, una producción de celulasas, económicamente atractiva puede depender de la selección de un buen microorganismo celulolítico, del mejoramiento genético del mismo, de la elección de un sustrato apropiado y del mantenimiento de las condiciones de cultivo durante el proceso de fermentación. Estos factores, detectados en varios trabajos, influyen directa o indirectamente para lograr preparaciones enzimáticas que puedan ser utilizadas para la sacarificación de diversos materiales lignocelulósicos y

obtener una cantidad de azúcares solubles que sea utilizada en otros procesos biotecnológicos.

En Japón, el proceso tipo Kojii se ha utilizado para la producción comercial de celulasas a partir de *T. viride* utilizando paja de trigo y ha resultado ser bastante efectivo para la producción de elevados niveles de celulasas. Sin embargo, tiene la desventaja que requiere un considerable manejo, debido a que es bastante laborioso (Goksoyr y Erikson, 1980). También han sido generadas 2 patentes japonesas para la producción de celulasas por fermentación sumergida en un medio con sales nutritivas, junto con paja de trigo al 12.5% (Béguin y Aubert, 1994).

Las celulasas disponibles comercialmente por lo general, son producidas por una fermentación controlada usando cepas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride* aunque sólo las de *Aspergillus* han sido autorizadas por la FDA (por sus siglas en inglés) en los Estados Unidos, para su uso en alimentos.

Actualmente se dispone de preparaciones comerciales muy activas como la celulasa *Onozuka* y la *Novozym* obtenidas a partir de *T. viride* y *A. niger*, respectivamente, pero aún éstas no son capaces de sacarificar adecuadamente los desechos lignocelulósicos, ya que sólo se han obtenido soluciones con un contenido del 10-15 % de azúcares en las condiciones mas favorables (Toyama y Ogawa, 1972).

En México no se producen industrialmente celulasas, ni otro tipo de enzimas glicosídicas de interés comercial como las xilanasas y pectinasas, aún cuando existe una demanda creciente de estas enzimas así como algunos materiales como el bagacillo de caña de azúcar y otros subproductos agroindustriales para producirlas.

2.4.1.-Aplicaciones actuales y potenciales de las celulasas.

Con base en sus propiedades, las celulasas han encontrado aplicación en las industrias de detergentes, la papelera, textil y alimenticia. En la industria de alimentos son utilizadas por su capacidad de romper la pared celular de los vegetales, facilitando así la extracción de componentes importantes tales como saborizantes de frutas y vegetales, proteínas, agar de algas marinas y almidón de maíz. Igualmente, se emplean en las industrias farmacéutica y textil. Sin embargo, la mayor parte de estas aplicaciones actualmente están restringidas por el alto costo que implica obtener el complejo enzimático. Como ejemplos puede mencionarse la utilidad para la extracción de aceite calidad farmacéutica o de fragancias, en la industria para la elaboración del papel, para modificar características tales como la resistencia física y la absorción.

También, las celulasas pueden ayudar a disminuir la contaminación, actuando en la digestión de residuos de excreción en fosas sépticas y drenaje, así como sobre la acumulación de desechos sólidos.

Las celulasas han sido introducidas en la industria papelera para mejorar la manufactura del papel reciclado (Pommier y cols., 1989; Stork y cols., 1995) ya que ha sido reportado por Blanco y cols., 1999; Pere y cols., 1999 que el tratamiento controlado con celulasas puede mejorar las propiedades mecánicas del papel.

Con el propósito de agrupar y resaltar las aplicaciones actuales y potenciales de las celulasas; a nivel industrial y algunas otras, se elaboró el siguiente cuadro:

APLICACIONES DE LAS CELULASAS

EN EL PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS

- Aumentar la digestibilidad.
- Producción de células vegetales unicelulares.
- Extracción de aceites, jugos, proteínas, saborizantes de frutas y vegetales.
- Remover la cubierta de la semilla del frijol de soya.
- Extracción del agar-agar.
- Tratamiento de los granos de arroz para la producción de sake.
- Elaboración de puré de zanahoria libre de fibras.
- Mayor solubilidad de las materias primas utilizadas en la elaboración de cerveza.
- Aumentar la digestibilidad del forraje.
- Procesamiento de residuos de madera como alimento animal.

EN EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN.

- Digestión de algunos residuos de excreción, presentes en fosas sépticas y drenajes.
- Disminución de los desechos lignocelulósicos, presentes en los depósitos municipales.

APLICACIONES FARMACÉUTICAS.

- Ayuda digestiva.
- Eliminación de fibras celulósicas no deseables en algún paso intermedio del proceso utilizado para la elaboración de fármacos.
- Producción de azúcares solubles aplicables en procesos fermentativos directamente relacionados con la industria químico-farmacéutica. (vitaminas y antibióticos).

2.5.-Características estructurales de la celulosa.

La celulosa es un polímero disponible en forma abundante en la naturaleza. Es continuamente biosintetizado por la reducción fotosintética del CO₂, reacción catalizada por la luz del sol. Es un carbohidrato no reductor de fórmula general (C₆H₁₀O₅)_n constituido por unidades de glucosa unidas por un enlace beta 1,4 con un alto grado de polimerización.

La celulosa nativa contiene aproximadamente 10, 000 residuos de anhidroglucosa, los cuales se encuentran unidos para formar una molécula de cadena larga. Su peso molecular es superior a 1.5 millones. Como la longitud de las unidades de anhidroglucosa es de 0.515 nm (= 5.15 Å), la longitud total de la molécula de celulosa nativa es de alrededor de 5 μm (Norkrans, 1950). La celulosa presente en la pulpa de papel y en el papel filtro, por lo general tiene un grado de polimerización de 500 a 2100.

La fibra vegetal está constituida por diferentes macromoléculas de las cuales sólo la celulosa es completamente lineal. Las hemicelulosas y la lignina que la acompañan presentan estructuras ramificadas de composición heterogénea en contraste con los agregados lineales cristalinos de la celulosa. Las fibrillas de celulosa están acompañadas por la hemicelulosa y la lignina en diferentes proporciones, según las distintas capas de la fibra. De este modo, la estructura molecular de la celulosa, de las fibrillas y las microfibrillas, representan características importantes que influyen en la degradación hidrolítica de la celulosa.

Dentro de los parámetros estructurales y fisicoquímicos existentes en la celulosa, que influyen en la susceptibilidad del material a la hidrólisis enzimática, se pueden citar los siguientes:

- Contenido de humedad de la fibra.
- Tamaño y difusibilidad de las moléculas de enzima, en relación al tamaño y propiedades de superficie de los capilares gruesos, espacios entre las microfibrillas y las moléculas de celulosa en las regiones amorfas.
- Grado de cristalinidad.
- Dimensiones de la unidad celular.
- Conformación y rigidez estérica de las unidades de anhidroglucosa.
- Grado de polimerización de la celulosa.
- Naturaleza de las sustancias con las cuales se encuentra asociada la celulosa.
- Naturaleza, concentración y distribución de los grupos sustituyentes.

Así en una fibrilla parcialmente cristalina de celulosa, las regiones amorfas en las micelas presentes en la franja, son las primeramente atacadas, ocasionando un enriquecimiento de las porciones cristalinas. Las regiones cristalinas en turno son solubilizadas gradualmente después de la pérdida de su porción periférica. Este esquema es muy idealizado, considerando la complejidad estructural de la celulosa nativa en los materiales lignocelulósicos, donde la celulosa también contiene tanto regiones cristalinas como amorfas (Bikales y Segal, 1971). Una característica importante de este arreglo cristalino es que las moléculas componentes de las microfibrillas individuales se encuentran lo suficientemente empacadas para evitar la penetración no sólo de las enzimas sino también de pequeñas moléculas como el agua.

El componente amorfo es más reactivo que el cristalino, por lo que cualquier medio que aumente la cantidad de regiones amorfas disponibles, incrementará la velocidad de hidrólisis (Cowling y Kirk, 1976; Fan y cols., 1980; Tsao, 1978).

La lignina forma una barrera física que impide la acción de las moléculas de ácido o de enzima, por lo que los pretratamientos que causan una ruptura de este sello de lignina aumentan el acceso de la enzima o del ácido a la celulosa, con lo que también se logra incrementar la velocidad de hidrólisis, aunque las regiones amorfas del material celulósico son más susceptibles a la degradación. Por lo mismo, es de gran importancia determinar la relación que existe entre el grado de cristalinidad de la celulosa y la eficiencia de una hidrólisis enzimática (Welmar y Watson, 1985; Fan y cols., 1989).

Otros parámetros estructurales y fisicoquímicos como el grado de polimerización (Puri, 1984), el tamaño de partícula (Rivero y Emert, 1988) y la distribución del tamaño del poro (Burns y cols., 1989), son también importantes con respecto a la susceptibilidad que tiene la celulosa a la acción enzimática. Además de todas esas limitaciones impuestas por la estructura de la celulosa, otras limitantes adicionales obedecen a la difusión y transporte de las celulasas al sitio de ataque (Wilson y Mertens, 1995).

2.5.1.-Materiales lignocelulósicos y residuos agroindustriales.

Debido a su abundancia, carácter renovable y bajo costo, los recursos celulósicos representan un material con gran interés a nivel mundial para intentar su aprovechamiento. Ello se ha hecho considerando diferentes puntos de vista ya sea como un sustrato para la producción de proteína unicelular, para obtener glucosa a partir de la hidrólisis de los desechos lignocelulósicos, o también para aumentar la eficiencia de conversión para un mejor aprovechamiento por los rumiantes.

Los residuos celulósicos pueden ser clasificados de acuerdo a su origen en:

a) AGRÍCOLAS: Como bagazo y bagacillo de caña, paja de trigo, paja de cebada, bagacillo de henequén, olotes de maíz, cáscara de arroz, lirio acuático, agave.

- b) DESPERDICIOS DEL PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS: Como cáscara de frutas, pedacera de vegetales, pulpa.
- c) DESPERDICIOS DE MADERA: Como aserrín, astillas, viruta y corteza de madera, corteza.
- d) MUNICIPALES: Como papel, cartón.

De hecho, periódicamente se acumulan cantidades considerables de desperdicios vegetales a causa del carácter intensivo periódico de la agricultura. Todos estos residuos están formados básicamente por 3 componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina, con pequeñas cantidades de resinas y gomas, proteínas, grasas y minerales.

La Tabla 4 presenta la composición aproximada de diferentes desperdicios celulósicos y se puede apreciar que la relación de celulosa/hemicelulosa varía de acuerdo al origen de cada material.

En nuestro país existen varios materiales agroindustriales, que pueden resultar atractivos para aprovecharlos por medio de una sacarificación enzimática. En 1991 fueron procesadas 450 millones de tons. métricas de caña molida para la producción de azúcar y de alcohol, generándose de ahí 245 millones de tons. de subproductos (II Seminario Nacional sobre la Agroindustria de México, 1992). Sin embargo, es necesario considerar ciertos factores para su utilización: se requiere se encuentren disponibles en grandes cantidades, en un área relativamente pequeña, que el contenido de celulosa sea elevado y que no tengan otros usos o aplicaciones. El bagacillo de caña de azúcar reúne las características mencionadas, ya que es un recurso renovable que se acumula en cantidades considerables en los ingenios azucareros y su contenido en celulosa es de 55.4 % (Srivinasan y Han, 1969), por lo cual este desecho o subproducto agroindustrial, además de ser usado como sustrato para producir celulasas, después también podría

servir como sustrato para realizar una sacarificación enzimática, de tal forma que se tendría un aprovechamiento integral del mismo.

En México, por ejemplo, la producción de azúcar durante el ciclo 1989-1990 fue de 3, 909,000 toneladas, provenientes de 704, 592, 000 toneladas de caña molida que produjo 11, 600,500 toneladas aproximadamente de bagazo, del cual, alrededor de un 35 % corresponde a bagacillo (Estadísticas Azucareras, 1989).

En esos años, existían 67 ingenios azucareros en los cuales el bagazo de caña no era aprovechado industrialmente. La utilización que se le dió al bagazo, indicada en toneladas fue: como combustible en los ingenios: 3 962 471; para fabricar papel: 93 085; para fabricar tablas duras: 66 696; como alimento para ganado al mezclarlo con melazas: 14 000 y otros usos: 15 000; lo cual da un total de 4 151 252 toneladas, por lo que 7 461 269 de ellas no tienen utilidad alguna y son desperdiciadas, alguna parte son quemadas en el mismo ingenio.

TABLA 4

COMPOSICION QUIMICA DE ALGUNOS RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS
(% de peso seco)

COMPONENTE	BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR	PAJA DE TRIGO	PAJA DE MAIZ	PAJA DE CEBADA	MADERA DURA
Celulosa	44 – 46	30 – 40	30 – 40	25 – 40	45 – 55
Hemicelulosa	20 – 25	25 – 30	25 – 30	25 – 40	24 – 40
Lignina	10	14.5	15.1	10 – 30	18 – 25

Tsao (1978).

2.6.-Sacarificación de los materiales lignocelulósicos.

Existen dos formas para la hidrólisis: la química y la enzimática. La primera, al ser realizada con ácidos minerales concentrados, requiere de condiciones muy drásticas, un pH muy bajo y por lo general altas temperaturas. Para lograr tenerlas, se necesita la instalación de equipos caros, resistentes a la corrosión, así como de sistemas especiales para la recuperación del ácido utilizado. Otra desventaja considerada es que puede existir descomposición de los azúcares obtenidos, lo cual significa una limitante en la eficiencia de conversión.

La hidrólisis enzimática se realiza bajo condiciones mas suaves y no hay reacciones colaterales. Sin embargo, uno de los principales problemas para los procesos enzimáticos es la poca accesibilidad que presenta el sustrato a las moléculas de enzima. Todos estos factores han influido para que la hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos aún no resulte económicamente atractiva a nivel industrial para la obtención de azúcares solubles utilizables en algunos bioprocesos.

2.6.1.-Hidrólisis ácida.

La sacarificación de la celulosa se conoce desde hace mucho tiempo, puesto que en 1819 Braconnot descubrió que tratándola en H₂SO₄ concentrado, se lograba la producción de azúcares. En esto se basa el procedimiento Schoeller, que trataba la madera por extracción continua bajo presión y percolación. Existen numerosos trabajos al respecto. En Alemania se instalaron varias unidades industriales durante la primera guerra mundial y en los Estados Unidos se realizó un esfuerzo similar en ese sentido. En los primeros años de la posguerra se realizaron estudios orientados hacia la utilización de hidrolizados como una fuente de carbono para fermentaciones (Motter y cols., 1979).

Hay que señalar que paralelamente al procedimiento con H_2SO_4 se han desarrollado otros, especialmente los que emplean HCl; pero a pesar de todas estas investigaciones, efectuadas entre las dos últimas guerras, no se ha logrado ningún desarrollo industrial importante.

Las técnicas de sacarificación de la celulosa por vía ácida pueden agruparse en:

1) Hidrólisis con ácido concentrado a baja temperatura (20-25 °C).

2) Hidrólisis con ácido diluido en caliente (170 °C ó más).

Los procedimientos con ácido sulfúrico diluido se aplican a los materiales verdes sin un secado previo, pero ocasionan problemas de corrosión a alta temperatura. Se aplican principalmente a vegetales con escaso contenido de pentosanos (hemicelulosa).

Los procedimientos con ácido clorhídrico concentrado se aplican mejor a los vegetales ricos en pentosanos y no implican problemas de corrosión tan significativos considerando la temperatura de trabajo.

Durante la hidrólisis, aumenta la aparición de zonas cristalinas con lo que la velocidad de la reacción de hidrólisis disminuye. La celulosa amorfa y las hemicelulosas se hidrolizan con bastante rapidez.

Sin embargo, la hidrólisis ácida presenta también la desventaja de que los azúcares obtenidos pueden degradarse. La xilosa se degrada rápidamente a furfural, la glucosa evoluciona hacia la formación de gentobiosa por reversión (ácido concentrado) o bien hacia hidroximetilfurfural.

2.6.2.-Hidrólisis enzimática.

La hidrólisis enzimática ofrece varias ventajas con respecto a la hidrólisis ácida. Debido a la especificidad de las celulasas, no se obtienen productos indeseables, no se requiere una neutralización del producto, el capital de inversión y los costos de operación son

sustancialmente menores, ya que se realiza bajo condiciones suaves de temperatura y no se requiere un costoso equipo de proceso resistente a la corrosión. Es posible obtener productos con alta pureza y utilizarlos sin tener que aplicar procedimientos de separación y de purificación complejos. Además de lo antes señalado, con los recientes avances logrados mediante técnicas de ingeniería genética, se han obtenido cepas celulolíticas altamente eficientes con lo cual se pretende llevar el proceso de hidrólisis enzimática a una viabilidad comercial. Las únicas ventajas de la hidrólisis ácida con respecto a la enzimática, serían el corto tiempo de reacción requerido y la capacidad de usar la celulosa sin un pretratamiento, que por lo general resulta costoso (Converse y cols., 1989).

Se han realizado numerosas investigaciones con respecto a la hidrólisis enzimática en las dos últimas décadas. Katz y Reese (1968) usaron una celulasa concentrada de *T. viride* y produjeron hidrolizados que contenían un 30 % de glucosa, pero el experimento fue realizado a una escala muy pequeña (1 ml) y cuando fue realizado en una escala mayor, los rendimientos obtenidos fueron considerablemente menores.

Toyama y Ogawa (1972) estudiaron la sacarificación de desechos celulósicos agrícolas como la paja de trigo y el bagazo delignificado con NaOH, utilizando la preparación comercial de celulasa de *T. viride* conocida como *Meicelasa* y una concentración de sustrato del 10 %, con un pH de 5.0 y una temperatura de 45°C durante 48 h, obteniendo soluciones con un 8.5 % de azúcares; al incrementar a 25 % la concentración del sustrato sólo fueron obtenidas soluciones con un 13 % de azúcares. Sin embargo, en la actualidad no existe una planta industrial para la hidrólisis enzimática de materiales celulósicos. El proceso referido, sólo ha sido evaluado a nivel piloto en Estados Unidos, en el Centro de Natick localizado en el estado de Massachusetts. También en Japón,

exisate otra planta piloto para el procesamiento del bagazo seco y paja de arroz utilizando una metodología similar.

2.7.- Pretratamientos para incrementar la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de la celulosa.

El contenido de lignina y la cristalinidad de la celulosa son, entre otros, las limitantes más frecuentes que influyen para lograr una eficiencia óptima durante su hidrólisis.

Han sido desarrolladas varias clases de pretratamientos de los materiales celulósicos para mejorar la eficiencia (Kosaric y cols., 1980), ya que la velocidad de hidrólisis enzimática se encuentra muy relacionada con el área de superficie accesible a las celulasas (Grethlein, 1985; Burns y cols., 1989) por lo cual, a una mayor área superficial de la celulosa, la hidrólisis procederá más rápidamente.

De los factores antes mencionados, el área de superficie y la cristalinidad son considerados como los más importantes para realizar una hidrólisis enzimática en forma exitosa (Detroy y cols., 1980). El área de superficie expuesta al ataque se considera importante puesto que es necesario un contacto físico directo entre las moléculas de enzima y la superficie de las cadenas de celulosa. Esto se puede considerar como un pre-requisito para la hidrólisis y por lo mismo muchas veces se requiere efectuar un pretratamiento previo a la reacción hidrolítica.

Lin y cols., (1985) establecen que el área de superficie es el principal factor que determina el grado de hidrólisis enzimática de la celulosa.

La velocidad de hidrólisis también depende de la cantidad de enzima adsorbida a la celulosa. Las celulasas se adsorben no sólo a la celulosa sino también a la lignina y la hemicelulosa (Ooshima y cols., 1990; Converse y cols., 1989), por lo que la cantidad de enzima que se asocia con esos materiales no necesariamente cadenas de celulosa, no

participa en el proceso de hidrólisis. En otras palabras, aunque el área de superficie accesible sea lo bastante amplia para ser rápidamente hidrolizada, la velocidad puede ser reducida en forma significativa por la presencia de la lignina y de la hemicelulosa. De este modo, el propósito del pretratamiento es aumentar el área de superficie accesible en la celulosa y disminuir el área de superficie de la lignina y la hemicelulosa, por lo que se requiere de una remoción efectiva de estos compuestos presentes en los materiales lignocelulósicos (Kurakate y cols., 1991).

La biodegradación de los materiales lignocelulósicos nativos sin tratamiento es muy lenta, dando lugar a una baja degradación, por lo general, menor al 20 % (Dunlop y cols., 1976; Fan y cols., 1980; Gharpuray y cols., 1983). Esta baja velocidad y grado de conversión afectan el desarrollo de un proceso hidrolítico económicamente factible. Con el fin de incrementar la susceptibilidad del material lignocelulósico, se requiere una modificación estructural por medio de varios tipos de pretratamiento. Algunos han demostrado su eficiencia para romper el complejo lignina-carbohidrato y otros en deshacer la estructura altamente ordenada de la celulosa.

Los tipos de pretratamientos comunmente utilizados han sido revisados ampliamente por Millet y cols. 1975; Dunlop y cols. 1976. Entre los mas significativos conviene mencionar: el molido, el tratamiento con álcali, con dióxido de azufre, el uso de solventes como el *caloxen* y agentes hinchantes. También ha sido probada la explosión de vapor y algunas combinaciones de ellos (Laser, 2002). Sin embargo, el factor que más influye en la elección de algún pretratamiento del material celulósico por utilizar es el costo del mismo en el producto final que se pretende obtener.

La Tabla 5 resume varios métodos de pretratamiento que pueden aumentar la digestibilidad de la celulosa, los cuales son clasificados dependiendo del principal tipo de acción sobre el sustrato como métodos físicos, químicos y biológicos. Algunos

procesos son combinaciones de 2 o más técnicas aplicadas en forma secuencial o paralela.

TABLA 5

MÉTODOS USADOS PARA EL PRETRATAMIENTO DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS.

Físico	Químico	Biológico
Molino de bolas Molino de 2 rodillos Molino de martillos Molino coloidal Molino de energía vibracional Vapor a alta presión Extrusión Expansión Pirólisis Radiación de alta energía	Alcalis: Hidróxido de sodio amoníaco sulfito de amonio Acidos: Ac. Sulfúrico Ac. Clorhídrico Ac. fosfórico Gas: Dióxido de cloro Dióxido de N₂ Dióxido de azufre Agentes oxidantes: Peróxido de hidrógeno Ozono Solventes de celulosa: Cadoxen CMCS Extracción de la lignina con solventes: Extracción con etanol-agua Extracción con benceno-etanol Extracción con etilenglicol Extracción con butanol-agua Agentes de hinchamiento	Hongos

Fan. et al (1982).

2.7.1.-Pretratamientos físicos.

Se clasifican en 2 categorías generales: pretratamientos mecánicos y no-mecánicos (Fan y cols., 1989). En el pretratamiento mecánico se utilizan fuerzas físicas que dividen el material lignocelulósico en partículas finas para hacerlo más susceptible a la hidrólisis. Por ejemplo, molino de bolas (Dewey y Bokless, 1982; Fan y cols., 1989), molino coloidal (Mandels y cols. 1971), molino de martillos (Mandels y cols., 1971; Fan y cols., 1989), desgaste mecánico (Eley y Clifford, 1988). En los pretratamientos físicos no mecánicos se utiliza un sistema físico para disminuir la cristalinidad de la celulosa y aumentar el área de superficie. Por ejemplo: pirólisis (Chang y cols. 1981; Fan y cols., 1989), explosión de vapor (Chang y cols., 1981; Fan y cols., 1989), explosión por congelación (Dale y Moreira, 1982).

2.7.2.-Pretratamientos químicos.

han sido ampliamente utilizados para remover la lignina y hemicelulosa que rodea a la celulosa, así como para destrucción de la estructura cristalina de la celulosa.

Algunos métodos son:

- 1) El tratamiento con álcalis: Hidróxido de sodio (Fan y cols., 1989), peróxido alcalino (Gould, 1983).
- 2) El tratamiento con ácidos: H_2SO_4 (Fan y cols., 1989), HCl, $ZnCl_2$ (Wilke y cols., 1976), H_3PO_4 (Shall y Brewil, 1989).
- 3) El tratamiento con gases: ClO_2 (Mandels y cols., 1971), O_3 (Wright y cols., 1988), SO_2 (Chang y cols. 1981).
- 4) Agentes oxidantes: Na ClO_2 , $KBrO_3$, KIO_3 , $KMnO_4$, $K_2S_2O_8$, $KClO_4$, NaOCl, H_2O_2 , NO_2 , ClO_2 , SO_2 , O_3 (Fan y cols., 1989).

2.7.3.-Pretratamientos biológicos.

Por lo general utilizan microorganismos que atacan a la madera que pueden degradar la lignina y aunque podría ser una técnica prometedora, su baja velocidad no ha permitido usarlos a gran escala en un proceso industrial (Janshekar y Fietcher, 1989; Shurz, 1978).

Se ha encontrado que únicamente ciertos hongos pueden atacar a la lignina y éstos se encuentran clasificados en dos categorías: hongos de la pudrición blanca y hongos de la pudrición oscura. Esta denominación se basa en los cambios físicos causados en la madera por efecto de su acción sobre la misma. Los hongos de la pudrición oscura causan únicamente cambios menores en la estructura de la lignina, mientras que los de la pudrición blanca son capaces de degradarla completamente (Kira y cols., 1977).

En la Tabla 6 se pueden observar algunos hongos que podrían ser usados como una alternativa biotecnológica a este respecto.

TABLA 6

ALGUNOS MICROORGANISMOS QUE ATACAN LA MADERA:

<p><i>Hongos de la pudrición café</i> (Atacan principalmente la celulosa). <i>Piptoporus betulinus</i> <i>Laetiporus sulphureus</i> <i>Trametes quereina</i> <i>Fomitopsis pinicola</i> <i>Gloephyllum saepiarium</i></p>
<p><i>Hongos de la pudrición blanca</i> (Atacan tanto lignina como celulosa) <i>Fomes fomentarius</i> <i>Phellinus igniarius</i> <i>Ganoderma appalanatum</i> <i>Armillaris millea</i> <i>Pleusotus estreatus</i></p>
<p><i>Hongos de la pudrición roja</i> (Atacan tanto lignina como celulosa) <i>Fomitopsos annosa</i></p>

Sahurz J. (1978).

2.8.-Alternativas biotecnológicas para el aprovechamiento de los materiales celulósicos y residuos agroindustriales.

Una de las características mostradas por las celulasas en una reacción de sacarificación de los materiales lignocelulósicos, es una baja eficiencia que se refleja en la velocidad de reacción y en el rendimiento de producción de azúcares que resulten aceptables para otros fines prácticos. Este efecto puede ser ocasionado por la carencia de alguno de los componentes que conforman el sistema enzimático ocasionando una limitante para su acción o también puede presentarse un efecto inhibitorio por producto intermediario (celobiosa) o que el ataque inicial de las cadenas de celulosa presentes en la fibra del material celulósico por hidrolizar no sea suficiente para la acción de los otros componentes del sistema celulolítico.

De este modo; se han intentado varias estrategias para mejorar la eficiencia de la hidrólisis enzimática de la celulosa, desde la búsqueda de una mejor fuente de celulasas, el mejoramiento de la capacidad de biosíntesis en las cepas microbianas conocidas por medio de modificaciones genéticas (Morozova, 1975; Montenecourt y cols., 1981; Gallo y cols., 1978; Farkas y cols., 1985) o bien, la selección de microorganismos celulolíticos con otras características en la producción de actividad a tiempos mas cortos (Larios y cols.,1982).

2.9.-Capacidad sacarificante de sistemas celulolíticos heterogéneos, y el efecto de sinergismo cruzado.

La hidrólisis de la celulosa resulta mas eficiente cuando es realizada por la acción de poblaciones microbianas mixtas (Carlile y Watkinson, 1997). Dentro de las asociaciones microbianas efectuadas para el mejor aprovechamiento de la celulosa, figura la fermentación del bagazo de caña con *Cellulomonas* y *Alcaligenes* para la producción

de proteína unicelular, debido a que se obtiene mayor cantidad cuando los dos microorganismos son usados simultáneamente. La base de este efecto radica en que *Cellulomonas* degrada la celulosa a celobiosa, la cual es consumida entonces por *Alcaligenes*, evitando de esta forma la inhibición de las celulasas por efecto de la celobiosa (Srinivasan y Han, 1969). Se han realizado también fermentaciones de cultivo mixto con el hongo celulolítico *T. reesei* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o *Candida utilis* utilizando, como sustrato paja de cebada tratada con sosa. En comparación con las fermentaciones con *Trichoderma*, el tiempo necesario para lograr una máxima producción de celulasas y proteína unicelular se reduce varios días, probablemente, debido a la remoción de los niveles de glucosa y celobiosa por la levadura, lo cual elimina el efecto represor sobre la producción de la enzima.

Como se mencionó anteriormente la reacción de hidrólisis de la celulosa se encuentra sujeta al efecto de inhibición por producto final (glucosa), o bien por producto intermediario (celobiosa), los cuales son formados durante la reacción, por lo que una relación adecuada de los componentes endo, exoglucanasa y beta-glucosidasa en el sistema de reacción, puede hacer que ésta se lleve a cabo a una velocidad más rápida (Tangnu y cols., 1981).

Se sabe que para obtener elevadas velocidades de sacarificación, es importante la presencia de buenos niveles de beta-glucosidasa en el sistema enzimático. Si el filtrado de cultivo original carece de una adecuada actividad de esta enzima, pueden utilizarse suplementos de beta-glucosidasa de otro microorganismo con el fin de obtener un incremento en la producción de glucosa, o bien una disminución de los niveles de celobiosa, la cual ejerce una potente inhibición de la hidrólisis enzimática de la celulosa, siendo menor el efecto ejercido por la glucosa (Wood y Mc Crae, 1977; Eriksson, 1975; Ghose y Das, 1971).

Como ya ha sido señalado, las celulasas producidas por el hongo *Trichoderma reesei* han sido de las más estudiadas debido básicamente a su elevada actividad hacia la celulosa del tipo cristalino; sin embargo, este sistema celulolítico, es deficiente en beta-glucosidasa (Toyama y Kogawa, 1972; Brandt y cols. 1973). Se ha reportado que para la hidrólisis de celulosa, la adición de beta-glucosidasa de *A. phoenicis* al sistema celulolítico de *T. viride* logra este efecto ya que el tiempo es reducido a la mitad por la adición de 3 U/ml de beta-glucosidasa (Stenberg y cols., 1977).

Se ha intentado la sacarificación de diversos materiales celulósicos con los filtrados de cultivo de la cepa de *Trichoderma viride* QM 9414 por separado (Andren y cols., 1976; Mandels y Andreotti, 1978); agregando una beta-glucosidasa comercial (Ghosh y cols., 1982); también mezclando con otros filtrados provenientes de *Pestalotiopsis westerdijkii* QM 381 (Mandels 1975) o bien de *T. reesei* QM 9414 con *Aspergillus wentii* (Dwevedi y Ghose, 1979) y *T. viride* con *A. ustus* (Manonmaui y Sreekantiah, 1987). También ha sido reportado el sinergismo entre las celulasas de una bacteria *Thermomonospora fusca* y un hongo filamentoso *T. reesei* (Walker y cols. 1992).

Existen diversos estudios de como varios tipos de celulasas actúan sinérgicamente produciendo mayor velocidad y extensión de la hidrólisis de la que puede ser obtenida mediante la suma de las actividades hidrolíticas de las enzimas en forma individual (Beldman y cols., 1988; Henrissat y cols., 1985; Wood y cols. 1989; Woodward y cols., 1988). Estos trabajos sobre el efecto del sinergismo entre los sistemas celulolíticos han demostrado la existencia de dos tipos: el sinergismo entre las endo y exoglucanasas y otro sinergismo entre exocelulasas diferentes (Irwin y cols. 1993) requiriéndose la formación de un complejo entre las endoglucanasas y la celobiohidrolasa sobre la superficie de la celulosa (Wood y Mc Crae, 1977). En la Fig. 3 se presenta un diagrama

ilustrativo con respecto al efecto sinérgico entre los componentes de las celulasas de los hongos filamentosos.

Otros investigadores (Walker y cols., 1992) han demostrado el sinergismo cruzado entre las celulasas de *Thermonospora fusca* y los componentes de celobiohidrolasa (CBHI y CBHII) de *Trichoderma reesei*, detectando que se requiere de cuando menos una mezcla ternaria entre esas celulasas, con el fin de fragmentar e hidrolizar en forma eficiente a la celulosa microcristalina.

A este respecto, David y Thiry (1981) han reportado un efecto sinérgico significativo con una mezcla realizada entre las celulasas de *Trichoderma viride* y las de *Aspergillus niger*. Este efecto se atribuye a la existencia de una mejor balance entre las endo y exoglucanasas presentes así como a la estabilidad térmica de las endoglucanasas de *A. niger*. Las preparaciones de celulasas de *T. reesei*, cuando son suplementadas con la beta-glucosidasa de *Aspergillus*, son las que pueden considerarse a un nivel industrial para realizar algún intento de sacarificación de los materiales lignocelulósicos (Reczey, 1998). Terri (1997), ha reportado que se conocen cuando menos cuatro formas de sinergismo:

- 1) sinergismo endo-exo, el cual se presenta entre las endo y exoglucanasas.
- 2) sinergismo exo-exo existente entre las exoglucanasas actuando sobre las cadenas terminales reductoras y no reductoras de la celulosa.
- 3) sinergismo entre exoglucanasas y beta-glucosidasas, para remover celobiosa (y celodextrinas).
- 4) sinergismo intramolecular, entre los dominios catalíticos y los sitios de unión al carbohidrato (CBD).

Stenberg y cols. (1977) reportaron también que al suplementar una celulasa de *T. reesei* con la beta-glucosidasa de *Aspergillus phoenicis* (durante la sacarificación de la celulosa), se obtiene glucosa como principal producto final y la velocidad de hidrólisis se incrementó en forma significativa.

Por otro lado, se sabe que cuando los componentes de las celulasas son purificados y probados por separado, es posible solubilizar la celulosa de tipo cristalino sólo parcialmente. Sin embargo, al ser reconstituídos de nuevo en su proporción original, son capaces de solubilizar otra vez la porción cristalina de la celulosa. Este comportamiento se ha obtenido en estudios realizados con el fraccionamiento de sistemas celulolíticos como los de *Trichoderma koningii* (Wood, 1968) y *Fusarium solani* (Wood, 1969) donde se demostró que los componentes individuales de cada sistema enzimático presentaron poca capacidad para la solubilización de la fibra de algodón. Ahora bien, cuando fueron combinados de nuevo en sus proporciones originales se recobró el 81 % de la actividad celulolítica de la enzima no fraccionada de *F. solani* y 77 % de la de *T. koningii*.

De este modo, resulta de particular importancia la recomendación de conocer mejor o bien determinar la proporción a la cual se encuentran los componentes enzimáticos de cada sistema celulolítico para conocer si será posible efectuar una hidrólisis enzimática completa. Ello ofrecería otras alternativas, con respecto a la completa utilización de las celulasas durante la hidrólisis sin dejar de considerar el efecto de sinergismo que se presenta entre ellas.

Lo anterior permitiría buscar entre los sistemas celulolíticos que serán evaluados en una reacción de sacarificación una complementariedad para obtener mayor producción de azúcares durante la reacción enzimática por efecto de los diferentes componentes que los conforman y les permiten atacar diferentes zonas de la cadena de celulosa.

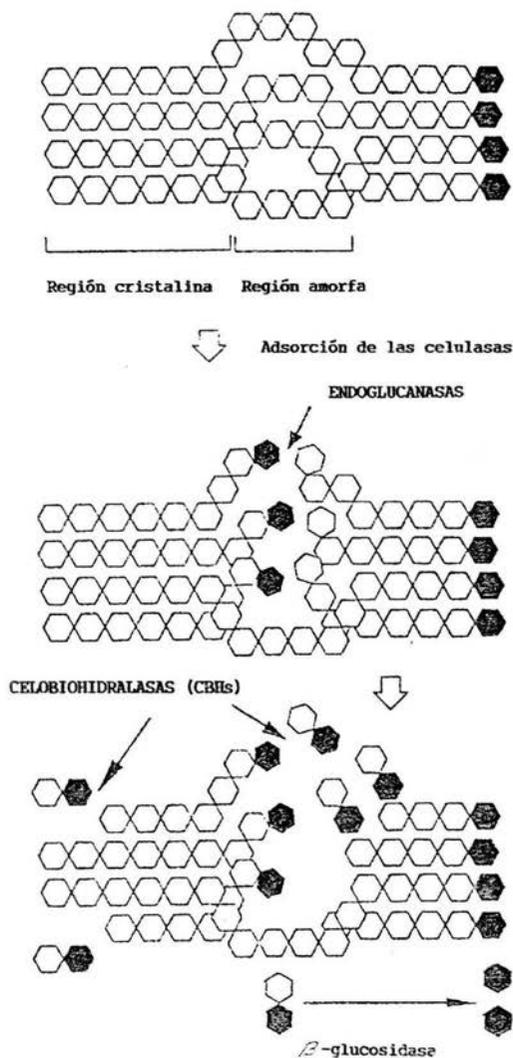


Fig. 3 Diagrama que representa el efecto sinérgico entre las endoglucanasas, las celobiohidrolasas (CBHs), y la β -glucosidasa para las celulasas de los hongos filamentosos. Los residuos de glucosa son indicados por medio de hexágonos, las porciones terminales reductoras aparecen de negro.

Beguin y Aubert (1994)

2.9.1.-Características de los sistemas celulolíticos evaluados con base a las actividades enzimáticas predominantes.

Nuestro grupo de investigación, ha demostrado y cuenta con experiencia para la producción de celulosas por fermentación sumergida y su evaluación en reacciones de sacarificación, utilizando materiales agroindustriales como el bagacillo de caña de azúcar con cepas seleccionadas de hongos filamentosos, que fueron aislados a partir de depósitos naturales de esos residuos (García-Kirchner, 1983). Las cepas celulolíticas aisladas poseen diferentes características morfológicas así como también diferentes niveles de producción de alguna de las tres actividades enzimáticas de celulosas evaluadas sobre diferentes sustratos como el papel filtro (PF), la carboximetilcelulosa (CMC) y el p-nitrofenil-beta-D-glucósido (p-NPG).

Estas cepas fueron seleccionadas previamente debido a la producción de actividad celulolítica extracelular capaz de hidrolizar celulosa microcristalina y diversos materiales lignocelulósicos que contienen tanto porciones cristalinas como amorfas (García-Kirchner, 1983).

A grandes rasgos, es posible mencionar las siguientes características representativas de cada una de ellas:

Aureobasidium sp. CH-M-1018 es un hongo levaduriforme el cual produce un máximo de actividad celulolítica extracelular, en un medio con celulosa microcristalina a las 48 horas, creciendo y produciendo las mismas actividades en un medio con bagacillo de caña sin pretratamiento (Larios y cols., 1982; García-Kirchner, 1983; Huitrón y cols., 1984). También produce celulosas y xilanasas en un medio simplificado a base de bagacillo, sales minerales de grado industrial y agua potable a 37° C (Acuña, 1991).

Penicillium sp. CH-M-1001 fué aislado utilizando un medio con celulosa microcristalina y seleccionado de acuerdo a la velocidad de disgregación del papel filtro (García-Kirchner,

1983) por lo cual se considera que esta cepa tiene la capacidad de producir un sistema enzimático con mayor capacidad de aprovechar la porción cristalina de los materiales celulósicos. De este modo, es posible suponer que el componente predominante en su sistema enzimático con actividad celulolítica es el de exoglucanasa. Esta cepa también produce el mismo patrón de actividades celulolíticas en medios conteniendo celulosa microcristalina y sobre bagacillo de caña sin pretratamiento a 29°C.

Aspergillus terreus CH-M-1013 fué aislado y seleccionado por su rápido desarrollo en un medio líquido y sólido con carboximetilcelulosa, por lo que se considera tiene capacidad de degradación de las porciones amorfas de los materiales celulósicos. Esta cepa, a diferencia de la de ***Penicillium***, produce gran actividad celulolítica sobre CMC y también sobre p-nitrofenol-beta-D-glucósido en un medio con bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento a 37°C. Produce mayor cantidad de actividad de endoglucanasa o de xilanasas y tiene también actividad de beta-glucosidasa.

De este modo es posible señalar que los filtrados de cultivo en actividad celulolítica obtenidos a partir de estas cepas, poseen cantidades variables de los diferentes componentes del sistema enzimático de celulasas, y que también producen xilanasas, las cuales intervienen significativamente en la sacarificación de un material como el bagacillo nativo el cual contiene una porción de hemicelulosa.

Aureobasidium sp., produce una actividad celulolítica aceptable sobre papel filtro de cuando menos un 4 % de sacarificación desde los dos días de cultivo, ***Penicillium sp.***, en forma similar al ***Aureobasidium***, pero a un tiempo de fermentación más largo (4 días) y ***Aspergillus terreus*** una mayor actividad sobre un material amorfo como la carboximetilcelulosa a partir de los dos días de fermentación y una actividad aceptable sobre el papel filtro. La actividad de beta-glucosidasa en los tres casos es muy similar. De igual forma con los filtrados de cultivo libres de células de estos tres hongos, es

posible obtener una cantidad aceptable de azúcares solubles a las 48 horas de hidrólisis durante la sacarificación de diversos materiales lignocelulósicos sin pretratamiento (García-Kirchner, 1983).

3.0 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.-Microorganismos.

Las cepas de hongos filamentosos con diferentes actividades celulolíticas utilizadas en este trabajo: *Penicillium sp.* CH-M-1001 y *Aspergillus terreus* CH-M-1013 y la del hongo levaduriforme *Aureobasidium sp.* CH-M-1018, fueron aisladas en nuestro laboratorio a partir de muestras de suelo de cañaveral y bagacillo almacenado en estado de descomposición. Se obtuvieron del ingenio azucarero "Emiliano Zapata" de Zacatepec, Morelos, de acuerdo a los procedimientos indicados anteriormente (García-Kirchner, 1983; Larios y cols., 1982). Las cepas de *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* fueron caracterizadas taxonómicamente por la Biól. Patricia Lappe en el laboratorio del Dr. Manuel Ulloa, del Departamento de Micología en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

3.2.-Propagación y conservación de las cepas.

La resiembra de las cepas fue realizada a partir de una colonia, propagándola en placas de Petri con medio sólido de agar papa dextrosa (PDA), incubándose a 29°C durante 3 días (en el caso de *Aureobasidium sp.*) y por 5 días para *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus*, hasta obtener una completa esporulación de los hongos.

La conservación de las cepas se realizó en tubos inclinados con medio de PDA sólido, manteniéndolos después de la esporulación a 4°C y efectuando resiembras periódicas a intervalos de 1 mes.

Finalmente, las cepas fueron liofilizadas usando leche descremada como soporte. Los liofilizados se almacenaron a temperatura ambiente y fueron utilizados sólo cuando se requería reactivar la cepa, para producir filtrados con actividad celulolítica.

3.3.-Materiales celulósicos.

Bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento obtenido del ingenio azucarero "Emiliano Zapata" de Zacatepec, Morelos. El bagacillo recolectado fue suspendido en agua potable, mantenido en un cuarto frío a 4° C durante 3 horas, resuspendiéndolo a intervalos de 30 minutos, luego recolectado con un pedazo de gasa hasta exprimir el agua retenida y finalmente secado durante una noche en una estufa con panel de ventilación a 40°C. Posteriormente fue tamizado a un tamaño de partícula de 0.249 mm usando un tamiz de 30 mallas y almacenado a temperatura ambiente en recipientes de plástico tapados. Se utilizó el mismo lote de bagacillo tanto para la producción de celulasas y xilanasas como para las reacciones de sacarificación.

Se utilizó papel filtro *Whatman* No. 1 (tiras de 1 x 6 cm) para el ensayo de actividad celulolítica total, así como en las reacciones preliminares de sacarificación realizadas a tiempos cortos de hidrólisis.

3.4.-Medios de cultivo para la producción de celulasas y xilanasas.

Los medios de cultivo utilizados para la producción de las actividades celulolíticas y xilanolíticas fueron formulados con reactivos de tipo industrial y agua potable, de acuerdo con el originalmente evaluado para *Aureobasidium sp.* (Acuña, 1991). Este medio contiene: 2 % de bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento, 0.14 % de sulfato de amonio, 0.03 % de urea y 0.2 % de fosfato de potasio monobásico (todos grado industrial) y agua potable, pH 4.4 antes de esterilizar. La urea se esteriliza por microfiltración, utilizando una membrana de 0.45 µm y se adiciona al medio de cultivo estéril. Para *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* fue necesario hacer una modificación en la fuente de nitrógeno orgánica, substituyendo la urea por otro material de tipo industrial como el agua de cocimiento de maíz (a una concentración de

1.0 % W/V). Ésta se esteriliza por separado y se agrega al medio estéril. Se utilizó un solo lote de este material durante la etapa de producción de celulasas.

También fue necesario agregar un surfactante (utilizado en la industria de fermentaciones), el *Mazu 6000* a una concentración de 0.15 % v/v para *Penicillium* y de 0.20 % para *Aspergillus terreus*, respectivamente.

La composición de los otros materiales, incluyendo al bagacillo de caña, fue la misma que la del medio original con reactivos industriales y también se utiliza agua potable para su preparación. El pH antes de esterilizar se ajustó a 5.0.

Se utilizó la misma composición en los medios de cultivo. tanto para matraces agitados como a nivel de fermentador de 14 litros. Los matraces conteniendo el medio de cultivo se esterilizaron a 15 psi durante 20 minutos y las jarras del fermentador a 20 psi durante 25 minutos.

3.5.-Preparación del inóculo.

El inóculo utilizado para la producción en matraces agitados consistió de 1 ml para *Aureobasidium* (Acuña, 1991) y de 2 ml para los otros 2 hongos filamentosos *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* por cada 100 ml de medio de cultivo, de una suspensión de esporas en agua destilada con una densidad óptica total de 5 a 540 nm.

Los fermentadores fueron inoculados con micelio de 24 horas de edad, obtenido después de hacer germinar 10 ml de una suspensión de esporas (D.O. 15) en un matraz Fernbach conteniendo 1 litro de medio de cultivo para la inducción del crecimiento (Mandels y Weber, 1969), con bagacillo de caña, 0.2 % de *Tween 80* e incubando a 29°C y 37°C, a 180 rpm durante 24 horas para *Penicillium sp.*, *Aureobasidium sp.* y *Aspergillus terreus*, respectivamente. La cantidad de inóculo usada fue de 1% (v/v).

3.6.-Condiciones de cultivo para la producción de celulasas y xilanasas.

La producción de las actividades celulolíticas y xilanolíticas en matraz agitado se realizó usando matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200 ml del medio de cultivo indicado para cada cepa (previamente descrito), los cuales fueron inoculados como fue señalado. Los matraces fueron incubados a 29°C para *Penicillium sp.* y a 37°C para las cepas de *Aureobasidium sp.* y *Aspergillus terreus*. La agitación fue de 180 rpm durante 6 días para las 3 cepas.

La producción de las actividades enzimáticas a nivel de fermentador se realizó utilizando fermentadores de 14 litros (Labroferm, Mod. FS-314 de New Bruswick Scientific Co.) con un volumen de 10 litros del medio de cultivo correspondiente, los equipos fueron inoculados con el 1 % v/v de medio germinativo. Las condiciones de fermentación fueron: velocidad de agitación 200 rpm, aireación constante de 0.4 vvm, presión 15 psi y la temperatura de 29 y 37°C, como fue indicado para la producción en matraces agitados.

Durante la etapa de producción enzimática se tomaron asépticamente muestras de 10 ml del matraz y de 50 ml de los fermentadores al primer día y posteriormente cada 48 horas hasta completar los 6 días de fermentación. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada.

En el sobrenadante, libre de células y de sólidos de bagacillo suspendidos, se determinó el pH, la proteína soluble y las actividades enzimáticas de celulasas sobre papel filtro, carboximetilcelulosa, p-nitrofenil-beta-D-gluósido (p-NPG) así como la de xilanasas, utilizando xilanos de abedul (*Sigma*, USA)

3.7.-Determinación de la actividad celulolítica total sobre papel filtro.

El método utilizado fue el de Mandels, (1975) el cual consiste en cuantificar los azúcares reductores solubles, utilizando como sustrato una tira de papel filtro *Whatman* No.1 (1x 6 cm) la cual pesa aproximadamente 50 mg. Los azúcares reductores se determinaron con el método del ácido 2,3 dinitrosalicílico (DNS), (Miller, 1959).

El sistema de reacción consiste de 50 mg del material celulósico utilizado como sustrato; 1 ml de amortiguador de citratos 0.075 M, pH 4.8 y 0.5 ml del filtrado de cultivo conteniendo la actividad celulolítica, incubándolo a 50°C durante 60 minutos. Después de transcurrido el tiempo de incubación se adicionan 3 ml de DNS para detener la reacción y los tubos se llevan a ebullición durante 5 minutos. Se enfrían a temperatura ambiente agregando 15.5 ml de agua destilada a cada tubo, se agitan en un agitador vibratorio (*VORTEX*) se dejan reposar y luego se lee la absorbancia a 550 nm en un fotocolorímetro *Spectronic 20 Bausch & Lomb*. En todos los casos se requiere incluir un blanco de reacción, en el cual la reacción se detiene inmediatamente después de la adición del filtrado de cultivo agregando el DNS y sometiéndolo a ebullición a la brevedad posible.

La cantidad de azúcares reductores es calculada a partir de una curva estándar de glucosa después de restar la absorbancia del blanco de reacción. La actividad enzimática se expresa en UPF/ml, de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC (Ghose, 1987).

3.8.-Determinación de la actividad celulolítica sobre CMC.

Fue determinada de acuerdo al método desarrollado en nuestro laboratorio (García-Kirchner, 1983) cuantificando los azúcares reductores liberados para la acción de las celulasas sobre carboximetilcelulosa (*Whatman 23*, GS \geq 1.0). 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. Este sistema se incubó durante 60 minutos a 50°C y los azúcares reductores producidos cuantificados por el método de DNS utilizando glucosa como estándar. En todos los ensayos se incluyeron blancos de enzima, un sustrato y de sustrato sin enzima y la actividad se expresa en U/ml de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC (Ghose, 1987).

3.9.-Determinación de la actividad de β -glucosidasa.

Esta actividad enzimática se determinó utilizando p-nitrofenil-beta-D-glucósido (p-NPG) como sustrato y cuantificando el p-nitrofenol liberado por la acción de la enzima (Stenberg y cols., 1977).

El sistema de reacción consiste de 0.25 ml de p-NFG 6.0mM en amortiguador citratos 0.2 M, pH 4.8, 0.25 ml del filtrado de cultivo correspondiente y 0.5 ml del amortiguador de citratos 0.2 M, pH 4.8. El sistema se incubó durante 10 minutos a 50°C. Exactamente al transcurrir este tiempo, se retira una alícuota de 0.2 ml, la cual se agrega a un tubo de ensayo conteniendo 4.8 ml de carbonato de sodio 0.1 M para desarrollar un color amarillo pálido y se lee la absorbancia a 420 nm. Para la determinación de la actividad se utilizó una curva estándar de p-nitrofenol (NP). La actividad es expresada en U/ml de acuerdo a las indicaciones señaladas por la IUPAC (Ghose, 1987).

3.10.-Determinación de la actividad xilanolítica.

Fue determinada usando xilanos de abedul (*Sigma*, USA) como sustrato y cuantificando los azúcares reductores producidos por el método del DNS, usando una curva estándar de D-xilosa. El sistema de reacción consiste de 1.0 ml de xilanos al 0.75 % en

amortiguador de citratos 0.075 M, pH 4.8 y 0.5 ml del filtrado de cultivo. El sistema se incubó a 50°C durante 15 minutos. La actividad se expresa en U/ml de acuerdo a las indicaciones de la IUPAC (Ghose, 1987).

3.11.-Recomendaciones de la IUPAC para expresar las unidades de la actividad enzimática para los ensayos de celulasas y xilanasas.

Las indicaciones y recomendaciones hechas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) con respecto a los ensayos para la medición de las actividades celulolíticas y xilanolíticas en muestras, filtrados de cultivo y preparaciones enzimáticas, en general aplican principalmente a la estimación de las actividades extracelulares de celulasas obtenidas del hongo filamentoso *Trichoderma reesei*. El motivo de las mismas, es una manera de lograr uniformidad en las unidades reportadas en diversos trabajos de investigación, debido a que la mayoría de los ensayos enzimáticos para este tipo de actividades son por lo general empíricos, y cada laboratorio ha hecho los ajustes necesarios a los métodos, dependiendo de los objetivos perseguidos en los diferentes trabajos.

Ensayo de la Actividad celulolítica total sobre Papel Filtro.

Se seleccionó un valor arbitrario de 2.0 mg de azúcares reductores (como glucosa), obtenida de la hidrólisis de 50 mg de papel filtro, lo cual representa un 4 % de conversión a los 60 minutos de ensayo, como una forma aplicada al cálculo de las unidades de actividad sobre este material (UPF/ml).

Cálculos:

UPF = mg glucosa producida x 0.185

Derivación.- La unidad de actividad sobre papel filtro (UPF) es definida en base a las Unidades Internacionales (UI).

UI = $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ de sustrato convertido.

= $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ de glucosa (azúcares reductores como glucosa) formado durante la reacción de hidrólisis.

= 0.18 mg min^{-1} cuando el producto es glucosa.

La cantidad absoluta de glucosa producida en el ensayo de UPF a la dilución crítica de la muestra es de 2.0 mg:

$$2 \text{ mg GLUCOSA} = 2/0.18 \mu\text{mol}$$

Esta cantidad de glucosa proviene de la acción de 0.5 ml de enzima en 60 minutos.

$$2 \text{ mg glucosa} = 2/0.18 \times 0.5 \times 60 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$$

$$= 0.37 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ (UI ml}^{-1}\text{)}.$$

Así, la cantidad estimada de enzima que produce 2.0 mg de glucosa en el sistema de reacción debe ser de 0.37 unidades, por lo cual, para fines de cálculo de actividades se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{UPF} = \frac{0.37 \text{ Unidades ml}^{-1}}{\text{Conc. de enzima que produce 2.0 mg de glucosa.}}$$

Conc. de enzima que produce 2.0 mg de glucosa.

Sin embargo, cuando se ensayan preparaciones con menores niveles de actividad que producen menos de la cantidad crítica de glucosa (2.0 mg) el cálculo se realiza de la siguiente forma:

UPF = mg. de glucosa x 0.185, ya que:

$$1.0 \text{ mg glucosa} = 1.0/0.18 \times 0.5 \times 60 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$$

$$= 0.185 \text{ unidades ml}^{-1}$$

Ensayo de la actividad sobre carboximetilcelulosa (CMC)

La unidad de actividad sobre CMC se basa también en Unidades Internacionales (UI) y el cálculo es similar al de las unidades sobre PF.

$$1 \text{ UI} = 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ del producto de la hidrólisis}$$

$$= 0.18 \text{ mg min}^{-1} \text{ cuando es glucosa.}$$

La cantidad crítica de glucosa para el ensayo sobre CMC es de 1.0 mg por lo que:

$$1.0 \text{ mg glucosa} = 1.0/0.18 \mu\text{mol.}$$

Esta cantidad de glucosa es producida por 0.5 ml de la preparación a los 60 minutos.

$$1.0 \text{ mg glucosa} = \frac{0.5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}}{0.18 \times 0.5 \times 60}$$

$$= 0.185 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$$

Por lo mismo:

UCMC = mg de glucosa x 0.185, ya que

$$1.0 \text{ mg de glucosa} = 1.0/0.18 \times 0.5 \times 60 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$$

$$= 0.185 \text{ unidades ml}^{-1}$$

Ensayo de la actividad de β -glucosidasa.

El razonamiento es similar al descrito para los ensayos sobre PF y CMC haciendo los ajustes necesarios, de acuerdo al sustrato utilizado que fue el p-nitrofenol beta-D-glucósido, y el producto evaluado de la reacción de hidrólisis, el p-nitrofenol.

Por lo mismo:

$$1.0 \text{ mg de p-nitrofenol} = 1.0/0.139 \times 0.25 \times 10 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$$

$$= 2.878 \text{ unidades ml}^{-1}$$

Para el ensayo realizado se utilizan solo 0.2 ml del filtrado con actividad enzimática por lo cual para:

$$2.878 \times 0.2 = 0.576 \text{ unidades ml}^{-1}.$$

Ensayo de la actividad de xilanasas.

Siguiendo un razonamiento similar a los anteriormente planteados y considerando que el producto de la actividad enzimática fue medido en una curva estándar de xilosa, tenemos:

$$\begin{aligned} 1.0 \text{ mg de xilosa} &= 1.0/0.150 \times 0.5 \times 15 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1} \\ &= 0.888 \text{ unidades ml}^{-1} \end{aligned}$$

Nota: Es recomendable que para los cálculos de las unidades de actividad en los métodos descritos, sea utilizada la preparación enzimática sin diluir, según el sustrato utilizado en el sistema de ensayo correspondiente.

3.12.-Determinación de proteína soluble.

Se realizó siguiendo una modificación del método reportado por Lowry (1951) utilizando una curva estándar de albúmina sérica bovina para su cuantificación, después de eluir los filtrados de cultivo en una columna de *Sephadex* G25 con amortiguador de citratos 0.075 M, pH 4.8 con el fin de remover los azúcares como la xilosa presentes en el filtrado de cultivo y que pueden alterar los blancos de reacción en la dterminación por la metodología utilizada.

3.13.-Obtención y conservación de los filtrados de cultivo con actividad celulolítica y xilanolítica.

Una vez concluida la etapa de producción en matraz agitado o en el fermentador de 14 litros, el caldo de fermentación fue recuperado por decantación, dejándolo reposar en frío durante 3 h para que sedimentaran los sólidos suspendidos.

El líquido decantado de nuevo, fue centrifugado a 10,000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Beckman refrigerada. Posteriormente todo el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 5 micrómetros empleando un sistema de microfiltración *Millipore*. Utilizando este procedimiento fue posible eliminar a las partículas finas de bagacillo que se mantenían en suspensión.

De este modo se obtuvieron 3 lotes de 7 litros cada uno, de filtrados de cultivo con actividad enzimática, a los cuales se les determinaron las actividades celulolíticas y xilanolíticas finales sobre: papel filtro, carboximetilcelulosa, p-nitrofenil-beta-D-glucósido y xilanos de abedul; así como el contenido de proteína soluble.

3.14.-Concentración de los filtrados de cultivo con actividad celulolítica y xilanolítica.

Con el fin de estandarizar las actividades celulolíticas y xilanolíticas obtenidas, así como que el contenido de proteína fuera el mismo, se procedió a concentrar cada lote de 7 litros de cada filtrado de cultivo obtenido. La concentración se realizó utilizando un equipo de ultrafiltración para flujo tangencial Pellicon *Millipore* utilizando una membrana de polisulfona, con un poro de corte de 40,000 MW. De este modo, cada lote se concentró 3 veces, se dividió en volúmenes de 500 ml y fue almacenado en congelación a -18°C, agregando unas gotas de *merthiolate* (cloruro de benzalconio-Lilly) como conservador.

3.15.-Sacarificación del papel filtro y bagacillo de caña sin pretratamiento.

Fueron realizadas 2 tipos de sacarificaciones para evaluar las diferentes relaciones volumétricas de mezclado en los filtrados de cultivo provenientes de los 3 hongos celulolíticos evaluados. Inicialmente y para esta primer etapa, se utilizó el papel filtro y después el bagacillo de caña de azúcar a tiempos de hidrólisis cortos (60 minutos) y finalmente solo el bagacillo a tiempos de reacción largos (48 horas), en un reactor en lote con agitación controlada

3.15.1.-Sacarificación a tiempos cortos de hidrólisis.

Para la hidrólisis del papel filtro, el sistema de reacción consistió de 50 mg del material celulósico (tiras de papel *Whatman* No.1 de 1 x 6 cm), 1 ml de solución amortiguadora de citratos 0.075M, pH 4.8 y 0.5 ml del filtrado de cultivo correspondiente en forma individual ó bien la misma cantidad de la proporción volumétrica necesaria, para tener el mismo volumen de (0.5 ml finales) en el sistema de reacción. El sistema fue mantenido en tubos de ensayo de 22 x 175 mm tapados con *parafilm*, durante 1 hora con una agitación recíproca de 120 oscilaciones/min en un baño de incubación a una temperatura de 50°C, retirando los tubos a intervalos de 15 minutos y deteniendo la reacción con 3 ml del reactivo de DNS para la determinación de los azúcares reductores producidos (Miller, 1959).

Para el bagacillo de caña se utilizaron las mismas condiciones, substituyendo únicamente los 50 mg correspondientes a la cantidad necesaria de sustrato en el sistema de reacción.

En todos los experimentos realizados en este sistema se incluyeron los controles respectivos, un blanco de reacción (tiempo cero) y las proporciones volumétricas de

filtrados de cultivo correspondientes, complementando el volumen final de 0.5 ml con la solución amortiguadora de citratos.

3.16.- Sacarificación del bagacillo de caña a tiempos largos de hidrólisis en un reactor en lote con agitación.

Una vez seleccionadas las relaciones volumétricas mas adecuadas para la hidrólisis del bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento a tiempos de reacción cortos, se procedió a evaluar el sistema a una escala mayor en un reactor agitado. Para tal fin, se utilizaron vasos de precipitados de vidrio de 1000 ml de capacidad en los cuales se suspendieron 20 g del bagacillo sin pretratamiento (obtenido a través de un tamiz de 30 mallas) en 500 ml de solución amortiguadora de citratos 0.075 M, pH 4.8. Una vez logrado un sistema homogéneo se agregaron 100 ml del respectivo filtrado de cultivo (cuando la evaluación se hizo individualmente o bien para las combinaciones, las proporciones volumétricas correspondientes), manteniendo el volumen final de 100 ml requerido en el sistema de reacción. También se incluyeron a manera de control, las preparaciones correspondientes de los filtrados de cultivo sólo, completando al volumen final de 100 ml con la solución amortiguadora de citratos, respectivamente.

Todos los reactores para cada sistema mixto evaluado y sus respectivos controles se colocaron en un baño con agua y se incubaron a 50°C durante 48 horas con una agitación recíproca constante de 130-150 oscilaciones por minuto.

Los vasos de precipitados fueron cubiertos con un tapón de hule y *parafilm* para evitar pérdidas por evaporación durante la incubación; sólo se destaparon para retirar muestras de 10 ml a intervalos de 3 horas hasta completar las 48 horas de incubación, para determinar en el sobrenadante obtenido, después de centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos, la cantidad de azúcares reductores producidos.

La determinación de azúcares se realizó por triplicado en cada muestra evaluada.

3.17.-Relación volumétrica seleccionada de acuerdo a la producción de azúcares reductores.

Una vez comprobado a nivel reactor agitado que la relación volumétrica 40/60, entre los filtrados de cultivo con actividad celulolítica de *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* fue la más adecuada para la sacarificación del bagacillo de caña sin pretratamiento (debido a que fue con la que se logró una mayor cantidad de azúcares solubles), se procedió a optimizar las condiciones de operación del sistema, considerando las principales variables que influyen en su comportamiento. Las variables evaluadas fueron: temperatura de incubación, pH, concentración del sustrato, concentración de la enzima, agitación, el tamaño de partícula del material lignocelulósico, y el ancho y altitud en el reactor, las cuales pudieran influir en el rendimiento del sistema.

Se mantuvieron sin variación: la capacidad del reactor (vaso de precipitados de vidrio de 1000 ml, excepto en los experimentos en los que se utilizó el reactor de configuración tubular), concentración de la solución amortiguadora de citratos 0.075M (500 ml), la relación de mezclado de los filtrados y su volumen final en el sistema (100 ml) cambiando solo una variable en cada corrida, manteniendo constantes las demás en las condiciones inicialmente fijadas, las cuales ya han sido mencionadas.

En todas las pruebas se incluyeron los controles correspondientes sometidos a las mismas condiciones de operación. Éstos consistieron en probar, al mismo tiempo, los filtrados con actividad celulolítica por separado y la proporción correspondiente de cada uno, así como la porción complementaria de solución amortiguadora de citratos para tener el volumen de 100 ml evaluado en el sistema de reacción.

Las determinaciones de azúcares reductores se hicieron por triplicado en las muestras de 10 ml tomadas de cada reactor, a los intervalos de tiempo indicados en las gráficas correspondientes, hasta cubrir un tiempo máximo de hidrólisis de 48 h.

3.18.-Sacarificación del bagacillo de caña sin pretratamiento en un reactor en lote de 5 litros con agitación.

Una vez establecidas las condiciones mas favorables para la sacarificación del bagacillo de caña en un reactor agitado de 1000 ml de capacidad, con el sistema mixto de filtrados con actividad celulolítica de *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* en la proporción volumétrica de mezclado 40 a 60 respectivamente, se procedió a realizar su evaluación en una escala de volumen mayor, empleando ahora un reactor de tanque agitado de 5 litros de capacidad, utilizando una jarra de vidrio sin deflectores (*baffles*) de un fermentador New Brunswick Sci. Co, con 2 impulsores y una turbina tipo Rushton, aprovechando también el panel de control de temperatura y de agitación del equipo.

Fueron resuspendidos 75 g de bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento (obtenido a través de un tamiz de 30 mallas) en 2500 ml de solución amortiguadora de citratos 0.075M, pH 4.6 y una vez lograda la homogeneidad en el sistema (a una velocidad de agitación de 150 rpm) para mantener el bagacillo suspendido en el reactor y a la temperatura de operación de 50 °C; se agregaron lentamente 500 ml de la combinación de filtrados correspondientes, con una actividad total de 0.190 UPF/ml obtenida al mezclar 200 ml del filtrado de cultivo de *Penicillium* y 300 ml del filtrado de cultivo de *Aspergillus terreus* lo cual da la relación de mezclado 40/60, respectivamente. El sistema fue operado por lote en condiciones asépticas cada vez que se realizaba la prueba, así como cuando fueron probados los filtrados en forma individual, para lo cual

se utilizaron también 500 ml de cada uno de ellos con una actividad sobre papel filtro de 0.185 UPF/ml para *Penicillium* y de 0.194 UPF/ml para *Aspergillus terreus*.

La jarra de vidrio del fermentador fue tapada y mantenida en condiciones asépticas y a la presión atmosférica así como a las condiciones señaladas, durante 48 horas, tiempo durante el cual fueron tomadas muestras de 10 ml para la cuantificación de los azúcares reductores producidos por el método del DNS a los intervalos de 3, 6, 9, 12, 18, 24, 34 y 48 horas; realizando las determinaciones por triplicado.

En este caso, todas las corridas se realizaron individualmente por lotes, evaluando cada filtrado por separado. Por su parte, se realizó la combinación de filtrados respectiva, omitiendo los controles de cada filtrado por separado y la porción correspondiente de la solución amortiguadora de citratos.

4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.-Medio y Condiciones de cultivo para la producción de celulasas y xilanasas.

Como se mencionó anteriormente, el objetivo de este trabajo consistió en la evaluación del efecto producido sobre la sacarificación del bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento, de los filtrados de cultivo de tres cepas de hongos con diferentes proporciones en sus actividades celulolíticas y xilanolíticas, actuando en forma individual o mediante diversas combinaciones volumétricas de los filtrados de cultivo obtenidos de ellos. Para lograr este objetivo fue necesario contar en primer lugar con una metodología de cultivo adecuada, para la producción de los filtrados libres de células con los cuales se realizaron los experimentos de sacarificación. Además, como lo señala Gutiérrez-Correa (1997) la producción de las celulasas representa el factor de costo mayor con respecto al proceso de hidrólisis de los materiales lignocelulósicos. De este modo, se recomienda mejorar los rendimientos de la producción de las enzimas obtenidas por fermentación con el fin de hacer el proceso atractivo económicamente.

De acuerdo a las características de los sistemas celulolíticos de cada cepa en particular, se procedió a cultivarlos en un medio simple preparado con sales inorgánicas y otros componentes de tipo industrial, agua potable y usando el bagacillo de caña de azúcar como fuente de carbono para determinar los niveles de actividades enzimáticas producidos, evaluándolas sobre diferentes sustratos celulósicos.

El medio fue previamente formulado y optimizado para *Aureobasidium sp.* (Acuña, 1991), por lo que inicialmente fueron probadas diferentes composiciones de la formulación original, con el fin de obtener la mayor actividad celulolítica en el menor tiempo de fermentación posible. Sin embargo, las actividades celulolítica y xilanolítica obtenidas con las cepas de hongos filamentosos en ese medio fueron un 25 % mas bajas en referencia a los resultados obtenidos con el medio de Mandels en el cual

habían sido previamente seleccionadas (García Kirchner, 1983), sobre todo la actividad sobre papel filtro. Por lo mismo, se realizaron una serie de experimentos en los cuales se comenzaron a modificar algunos de los componentes del medio original pero manteniendo como objetivo el que siguiera siendo un medio simple, elaborado a base de compuestos de grado industrial y agua potable.

Lo anterior representó una ventaja para intentar la producción de las actividades celulolíticas a una escala mayor y probablemente cuando se requiera a un nivel industrial, sobre todo cuando en lo que se refiere a los costos de materias primas, ya que la mayoría de los estudios sobre la producción de enzimas microbianas son realizados a nivel laboratorio y por lo general, utilizan reactivos de grado analítico y agua destilada.

4.2.-Modificación del medio de cultivo original con reactivos grado industrial.

Considerando que las cepas de *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* fueron inicialmente seleccionadas en el medio original de Mandels (Mandels y Weber, 1969), el cual contiene como fuente orgánica de nitrógeno en su composición a la proteosa peptona, se procedió a realizar una serie de experimentos a nivel de matraz agitado con el fin de utilizar una sustancia alternativa, no tan costosa y que permitiera también substituir la urea que es utilizada en el medio original con reactivos industriales, debido a que en este material en particular estas cepas no desarrollaban un crecimiento abundante y existían problemas significativos en el perfil del pH durante las fermentaciones tendiendo por lo general a la alcalinidad.

De hecho durante las primeras pruebas realizadas en ese medio se detectó poco desarrollo de micelio, así como un notable incremento del pH hacia la neutralidad, durante la fase de producción de las actividades enzimáticas.

Inicialmente fueron probadas diferentes concentraciones de un mismo lote de agua de cocimiento de maíz líquida, desde un 0.25 hasta el 2.0 % W/V, debido a que la presentación en polvo no funcionó satisfactoriamente. Esta estrategia fué adoptada después de evaluar diferentes tipos de muestras comerciales de agua de cocimiento de maíz, detectándose una gran variación en los niveles de actividades celulolíticas producidas de acuerdo a la muestra probada. Finalmente se procedió a utilizar la presentación líquida ya que fué con la que se obtuvo una menor variación en las actividades enzimáticas, sobre todo la evaluada sobre el papel filtro.

Otro aspecto determinante fue la forma de incorporar el agua de cocimiento de maíz al medio ya que inicialmente era esterilizada junto con los demás nutrientes, pero debido a las variaciones detectadas en el pH inicial, el cual tendía hacia la alcalinidad, se procedió a esterilizarla por separado, adicionándola al medio estéril antes de comenzar la fermentación.

Por lo general se puede considerar que resulta recomendable esterilizar siempre la fuente de nitrógeno por separado, para evitar posibles reacciones secundarias entre las sales minerales del medio durante la esterilización.

Manteniendo los demás componentes del medio sin cambio y no adicionando la urea, fue posible obtener (a una concentración del 1% W/V de agua de cocimiento de maíz), un nivel de actividades celulolíticas muy cercano al logrado cuando las cepas fueron seleccionadas en el medio de Mandels con bagacillo de caña de azúcar como fuente de carbono.

También y tomando en cuenta que el medio de Mandels incluye el *Tween 80* como un componente que favorece la producción de actividades celulolíticas (debido a cambios en la permeabilidad de la membrana celular, con lo cual se incrementa la cantidad de enzimas producidas extracelularmente), se decidió evaluar varios surfactantes de uso

industrial. El que favoreció una mayor producción de todas las actividades celulolíticas y xilanolítica determinadas fue uno conocido como: *Mazu₆₀₀₀*.

Una vez que fue incluido este material desde el inicio de la preparación del medio a una concentración de 0.1 % para *Penicillium* y de 0.2 % para *Aspergillus terreus* fue posible igualar la producción de todas las actividades celulolíticas con las inicialmente logradas en el medio de Mandels con bagacillo de caña antes referido. En forma particular, la medida utilizando el papel filtro como sustrato.

En la Tabla 7 es posible apreciar la composición original y las variaciones realizadas en los medios de cultivo utilizados con las tres cepas para la producción de los filtrados con actividad celulolítica y xilanolítica que se usaron en la sacarificación del bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento, el cual fue el objetivo principal en este estudio.

Finalmente, después de probar otras variables que influyen en la fermentación para la producción de celulasas y xilanasas con estas cepas, como fueron el pH inicial del medio de cultivo, la temperatura de incubación durante la fermentación, la cantidad, el tipo de inóculo y la velocidad de agitación, se llegaron a obtener diferentes condiciones de cultivo para cada cepa, lográndose obtener en matraces con agitación controlada, el perfil de actividades indicado en la Fig. 4 bajo las condiciones señaladas en la misma.

Como es posible apreciar en la misma, las actividades celulolítica y xilanolítica obtenidas corresponden a las características descritas para cada cepa con anterioridad.

Difieren en el tiempo de producción de la actividad enzimática correspondiente lo cual, se encuentra relacionado con la disponibilidad de las porciones cristalinas y regiones amorfas del bagacillo de caña de azúcar nativo, él cual es el inductor de cada una de ellas. No hay una correlación directa entre la velocidad de crecimiento de un microorganismo y el tipo de actividad celulolítica presente en mayor cantidad o bien en un tiempo determinado. Sin embargo se pueden señalar las siguientes diferencias con

respecto a la actividad máxima obtenida con cada cepa en particular: *Aureobasidium*, produce la actividad máxima sobre papel filtro después de los 2 días de fermentación, una actividad sobre carboximetilcelulosa menor a la de las otras dos cepas y una actividad de beta-glucosidasa mayor a la cepa de *Penicillium* y ligeramente menor a la *Aspergillus terreus*.

El perfil de producción de las actividades enzimáticas de la cepa de *Penicillium sp.* refleja que es el microorganismo al cual le llevó mas tiempo aprovechar al bagacillo de caña para tener todas las actividades evaluadas en este trabajo o bien, que el tiempo de máxima producción es posterior a los 6 días de fermentación, tiempo considerado como límite para los objetivos de este trabajo. También conviene no dejar de considerar que la temperatura a la cual se cultivo esta cepa fue diferente a la de las otras dos, lo cual tendría que relacionarse con el crecimiento sobre y la velocidad de aprovechamiento del bagacillo de caña.

Con respecto al tercer microorganismo, la cepa de *Aspergillus terreus* podemos observar en la figura 4, que resultó un buen productor de todas las actividades enzimáticas evaluadas a partir de los 2 días de fermentación y también es la cepa que produjo mayor actividad de beta-glucosidasa y de xilanasas al término de la fermentación, aunque la actividad sobre el papel filtro sea ligeramente menor a la de las otras dos.

Otro factor que puede influir directamente en la producción de la actividad celulolítica es la variación del pH en el transcurso de la fermentación. Haciendo un seguimiento del curso de producción de celulasas y las variaciones en el pH del medio de cultivo durante la fermentación, es notorio 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 comienza a disminuir rápidamente, permanece bajo durante la fase de crecimiento y vuelve a

aumentar de nuevo después de uno o dos días antes de que la celulosa disponible se agote. También se ha observado que la actividad de beta-glucosidasa permanece baja durante el estadio de acumulación de la actividad celulolítica y no aparece hasta que el pH comienza a subir. Después de que la celulosa disponible se consume, la producción de la enzima cesa. Estas características mencionadas fueron las que se presentaron para la cepa de *Aureobasidium sp.* Pero en el caso de las otras dos cepas (*Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus*) el perfil mostrado fue diferente lo cual es posible que se encuentre directamente relacionado con la actividad enzimática predominante en el filtrado de cultivo así como en el tiempo máximo de producción de cada una de ellas en forma particular.

TABLA 7

COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA PRODUCCIÓN DE LAS ACTIVIDADES CELULOLÍTICA Y XILANOLÍTICA

MEDIO DE MANDELS*	MEDIO CON REACTIVOS INDUSTRIALES (ORIGINAL)**	MEDIO CON REACTIVOS INDUSTRIALES (MODIFICADO)
Bagacillo de caña de azúcar KH_2PO_4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ CaCl_2 Elementos traza: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ZnCl_2 CoCl_2 UREA Proteosa peptona <i>Tween 80</i> Agua destilada y reactivos analíticos $\text{pH}_{\text{ae}} 5.5$	Bagacillo de caña de azúcar KH_2PO_4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ UREA Agua potable y reactivos industriales $\text{pH}_{\text{ae}} 5.0$	Bagacillo de caña de azúcar KH_2PO_4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Agua de cocimiento de maíz <i>Mazu₆₀₀₀</i> Agua potable y reactivos industriales $\text{pH}_{\text{ae}} 5.0$

* Mandels y Weber (1969); **Acuña (1991)

Una vez obtenidas las actividades de celulasas y xilanasas en matraces con agitación de 500 ml y debido a que se requería contar con una mayor cantidad de filtrado de cultivo obtenido por fermentación, inicialmente se procedió a realizar la producción pero ahora usando matraces de mayor capacidad. Con esa finalidad, fueron utilizados matraces Erlenmeyer de 1000 ml y matraces tipo Fernbach. Sin embargo, debido a la cantidad de matraces requeridos en cada fermentación y a las variaciones de las actividades obtenidas entre los mismos, se consideró necesario intentar la producción bajo condiciones mas controladas en un fermentador instrumentado de 14 litros de capacidad. Tomando como referencia la experiencia con la que se contaba en nuestro laboratorio, con respecto a la producción de las actividades celulolíticas y xilanolíticas con la cepa de *Aureobasidium sp.*; así como las condiciones de fermentación para obtener cuando menos una actividad de un 4 % de degradación del papel filtro a las 48 hrs de fermentación en fermentadores de 14 litros (utilizando el medio de cultivo con reactivos grado industrial y bagacillo de caña de azúcar sin pretatamiento) (Acuña, 1991) se realizaron varias fermentaciones con las cepas de *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* obteniéndose los resultados presentados en la figura 5. En esta gráfica que representa el promedio de cuando menos 5 corridas de fermentación, se presenta el perfil de actividades obtenido por las tres cepas en fermentadores de 14 litros utilizando un equipo Labroferm, lo cual permitió realizar la fermentación a temperatura de incubación a 29° C para *Penicillium sp.* y de 37° C para *Aureobasidium sp.* y *Aspergillus terreus*.

Otro aspecto que no hay que dejar de considerar es que fue posible trabajar bajo condiciones mas controladas sobre todo de aireación y agitación durante toda la fermentación aunque el objetivo principal de este trabajo no giró en torno a optimizar las mismas sólo se pretendió contar con un volumen de filtrados suficiente para realizar las

pruebas de sacarificación del bagacillo de caña sin tener variaciones de las las actividades enzimáticas durante las pruebas realizadas.

Aunque las actividades obtenidas fueron ligeramente menores a las obtenidas en matraz con agitación, los volúmenes cosechados del fermentador permitían contar con una mayor cantidad de filtrados de cultivo, con las mismas actividades enzimáticas, obtenidas al mismo tiempo. De nuevo, es necesario resaltar que esto es debido a que no se optimizaron las condiciones de cultivo para la fermentación a nivel de 14 litros, ni el medio de cultivo utilizado ya que el objetivo de crecer a los microorganismos en el fermentador, consistió sólo en contar con un lote representativo de cada filtrado de cultivo de cada una de las tres cepas evaluadas, ya que a nivel de matraz no fue posible cosechar grandes volúmenes de ellos.

Una vez determinadas las actividades celulolíticas y xilanolíticas correspondientes, así como el contenido de proteína soluble en los filtrados de cultivo obtenidos de la fermentación, fue posible estandarizarlos a las condiciones que se fijaron, para realizar con el mismo lote de cada uno, todos los experimentos de sacarificación en forma individual y con las combinaciones respectivas de ellos.

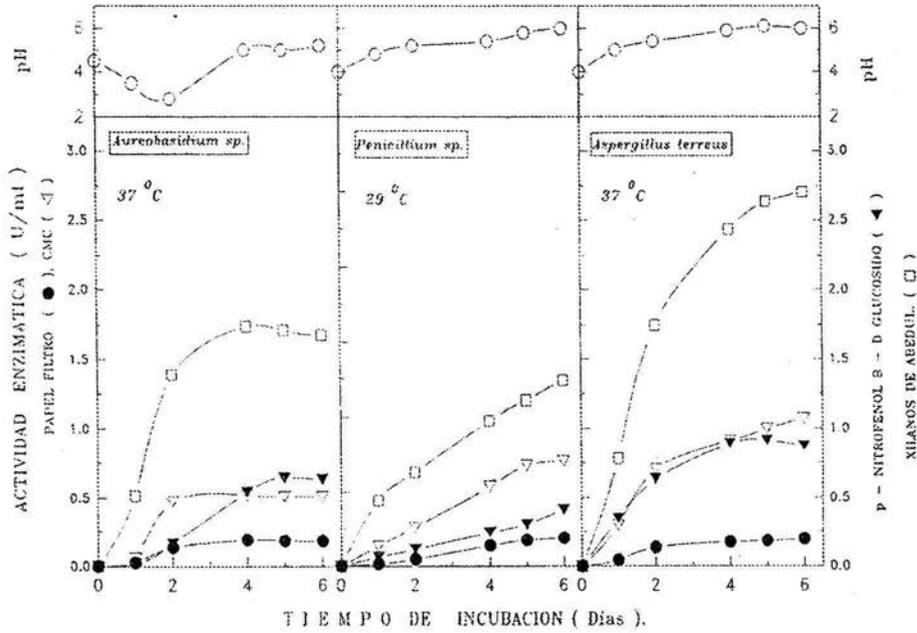


Fig. 4.- Producción de celulasas y xilanasas por fermentación sumergida del bagacillo de caña de azúcar con las cepas de *Aureobasidium sp.*, *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* en matraces con agitación (180 r.p.m.) y a las temperaturas indicadas en cada gráfica, utilizando el medio de cultivo modificado preparado con reactivos tipo industrial y agua de cocimiento de maíz.

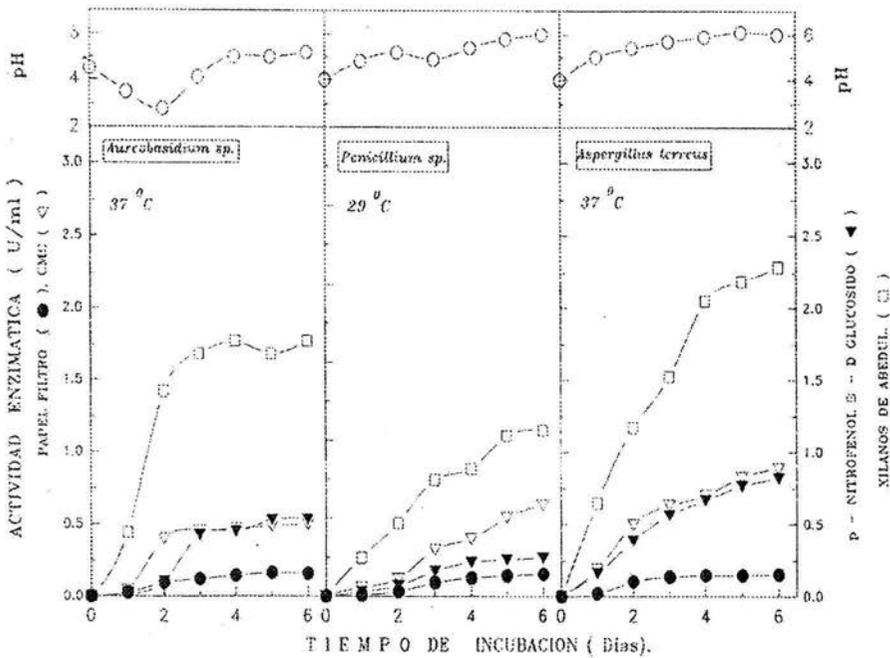


Fig. 5.- Producción de celulasas y xilanasas por fermentación sumergida del bagacillo de caña de azúcar con las cepas de *Aureobasidium sp.*, *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* en un fermentador LABROFERM de 14 L con una velocidad de agitación de 200 r.p.m., una aireación de 0.4 v.v.m., presión de 15 psi., a las temperaturas indicadas en la gráfica y utilizando el medio de cultivo modificado preparado con reactivos tipo industrial y agua de cocimiento de maíz.

4.3.-Estandarización del contenido de proteína soluble y concentración de las actividades enzimáticas de los filtrados de cultivo con actividad celulolítica y xilanolítica.

Como la cantidad de proteína soluble y las actividades enzimáticas obtenidas a nivel del fermentador fueron menores y era necesario contar con una cantidad suficiente de filtrados de cultivo que fuera representativa, para efectuar todos los experimentos de sacarificación de bagacillo de caña sin pretratamiento, se realizó una ultrafiltración después de mezclar los lotes de los filtrados obtenidos por fermentación y aquellos de matraces agitados con los que se contaba de cada cepa por separado.

Fué seleccionado para llevar a cabo la concentración, un equipo pellicon (*Millipore*) con un sistema de flujo tangencial, ya que por este método se pueden concentrar hasta 30 litros del filtrado enzimático en relativamente poco tiempo, y además las proteínas se mantienen en solución durante todo el proceso de ultrafiltración, con lo cual se evita la desnaturalización de las enzimas.

Se utilizó una membrana de ultrafiltración de polisulfona como fué señalado anteriormente ya que las celulasas obtenidas, no hidrolizan ese material a diferencia de las membranas comunmente usadas en esos equipos para concentrar proteínas las cuales, por lo general, son de acetato de celulosa. Aunque el tiempo de operación del equipo es corto y la concentración se hace a baja temperatura, conforme ésta se realiza pueden dañarse las membranas de celulosa por efecto de las enzimas y habría pérdida de proteínas a través de la membrana.

Es necesario señalar que con el tamaño del poro de corte de peso molecular utilizado, que fue el de 32 000 MW, no hay pérdida significativa en la membrana de ninguna de las actividades celulolíticas presentes en los filtrados concentrados bajo las condiciones de operación utilizadas, ni siquiera de la beta-glucosidasa, la cual podría atravesar la

membrana, ya que el intervalo de peso molecular de estas enzimas producidas por los hongos filamentosos es del orden de 30 000 - 43 000 aproximadamente. (Enari y Niké-Paavola, 1987)

De este modo fue posible concentrar 3 veces el filtrado celulolítico original en términos de volumen, llevándolo de 7 litros a 2.33 litros en aproximadamente 75 minutos.

Las fracciones obtenidas del volumen final, guardadas en congelación fueron las utilizadas en los experimentos de sacarificación durante esta fase del proyecto, una vez diluidas y determinadas las actividades celulolíticas correspondientes, así como el contenido de proteína soluble. Vale la pena señalar que la pérdida de actividad por este efecto fue mínima, por lo cual una vez concentrados los filtrados de cultivo a las actividades requeridas fue posible utilizarlos durante todos los experimentos de sacarificación.

La actividad que servía de referencia para conocer el volumen de la dilución necesaria fue la actividad sobre el papel filtro, manteniéndola a un valor de 0.185 ± 0.005 UPF/ml.

4.4.-Sacarificación del papel filtro y el bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento a tiempos cortos de hidrólisis.

Inicialmente se utilizó el papel filtro como sustrato, para evaluar los efectos obtenidos de realizar mezclas de los filtrados de cultivo a diferentes relaciones volumétricas durante la hidrólisis, ya que para la sacarificación de este material es necesaria la contribución tanto de la actividad de endoglucanasas así como de la de las exoglucanasas (David y Thiry, 1981).

De hecho, la actividad sobre papel filtro se considera como una medida relativa de la capacidad hidrolizante total de las preparaciones de celulasas (Urbanszki y cols., 2000) ya que la eficiencia de hidrólisis durante el ensayo de papel filtro es función de la dilución

de la preparación de celulasas que esta siendo evaluada, lo cual también influye en el equilibrio de adsorción-desorción existente.

También por medio de esta técnica, como reporta Joglekar y cols., 1982; es posible conocer de antemano la posibilidad de aplicar prácticamente el sistema celulolítico en una reacción de sacarificación a nivel de reactores controlados.

Además, se considera que el papel filtro puede ser degradado únicamente por sistemas celulolíticos completos que contengan fundamentalmente, los 2 tipos de actividades (endo y exoglucanasas) así como también la de beta-glucosidasa. También la determinación de esta última actividad se considera como un índice directo de la capacidad sacarificante de las preparaciones crudas de celulasas (Canevascini y Gattlen, 1981).

El efecto obtenido a los 60 minutos de sacarificación de 50 mg, de este material celulósico bajo las condiciones señaladas, para las diferentes mezclas de filtrados de cultivo entre las 3 cepas celulolíticas se presenta en las Figuras 6, 7 y 8; así como el realizado por cada filtrado con actividad celulolítica, actuando en forma individual, bajo las mismas condiciones de ensayo.

Con todas las combinaciones efectuadas; el grado de sacarificación que fue evaluado como la cantidad de azúcares reductores producidos por efecto de la hidrólisis enzimática, a los intervalos de tiempo indicados, fue mayor al obtenido con la suma de las actividades de la proporción respectiva de cada filtrado por separado, así como también con respecto al filtrado de mas alta actividad, comparando el efecto bajo el mismo volumen de filtrado de cultivo en todo el experimento.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

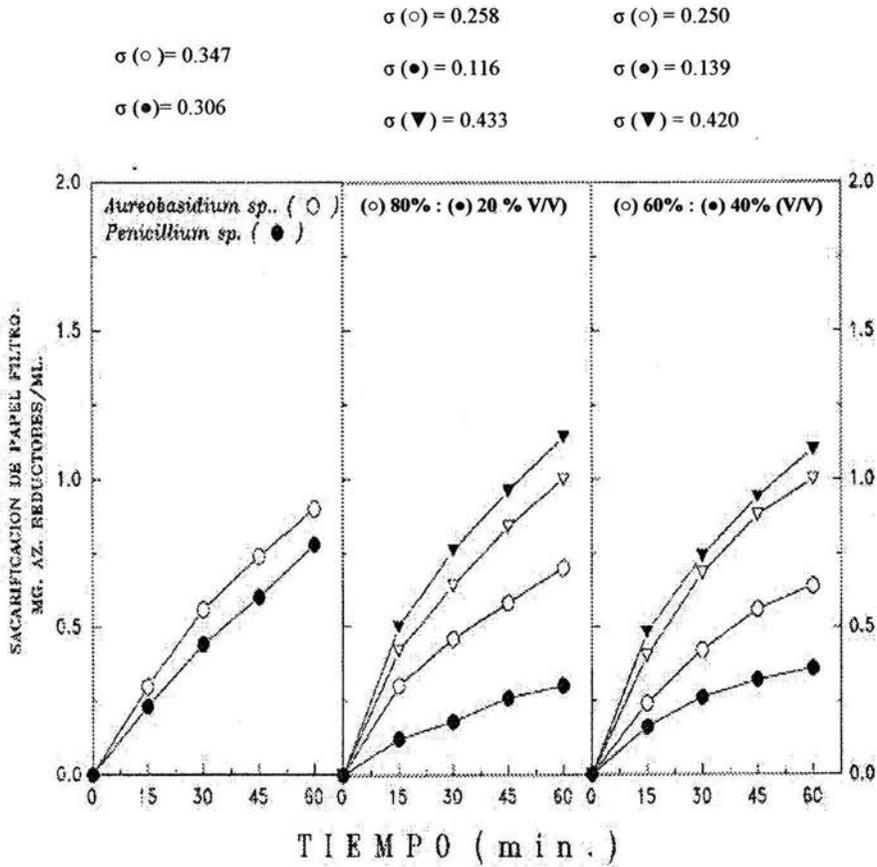


fig. 6.- Sacarificación de 50 mg de Papel Filtro con los filtrados de cultivo de las cepas: *Aureobasidium* sp. (○), *Penicillium* sp. (●) y or las combinaciones de los mismos (▽) a un pH de 4.8, 50°C y una agitación de 120 rpm. Suma de la actividad de cada filtrado por separado (▽). σ = Desviación estandar.

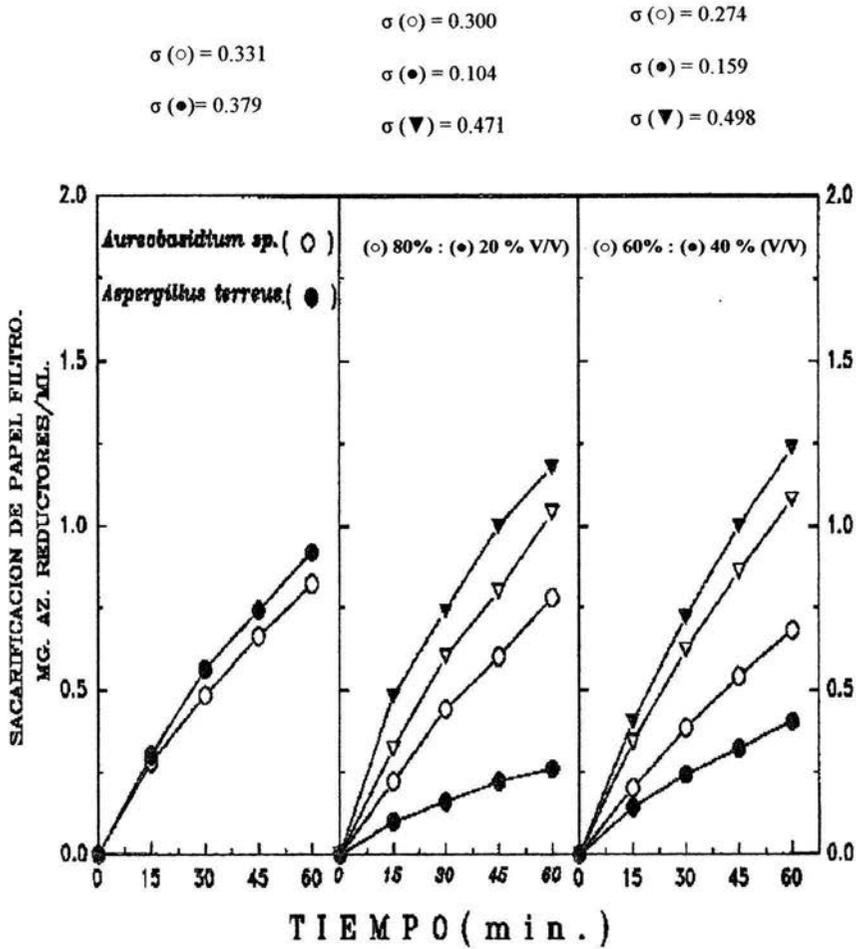


Fig.7 Sacarificación de 50 mg de Papel Filtro con los filtrados de cultivo de las cepas: *Aureobasidium sp.* (\circ), *Aspergillus terreus* (\bullet) y por las combinaciones de los mismos (\blacktriangledown) a un pH de 4.8, 50°C y una agitación de 120 rpm. Suma de la actividad de cada filtrado por separado (∇).
 σ = Desviación estandar.

$\sigma (\circ) = 0.311$	$\sigma (\circ) = 0.223$	$\sigma (\circ) = 0.146$	$\sigma (\circ) = 0.125$
$\sigma (\bullet) = 0.329$	$\sigma (\bullet) = 0.136$	$\sigma (\bullet) = 0.206$	$\sigma (\bullet) = 0.179$
	$\sigma (\blacktriangledown) = 0.407$	$\sigma (\blacktriangledown) = 0.420$	$\sigma (\blacktriangledown) = 0.383$

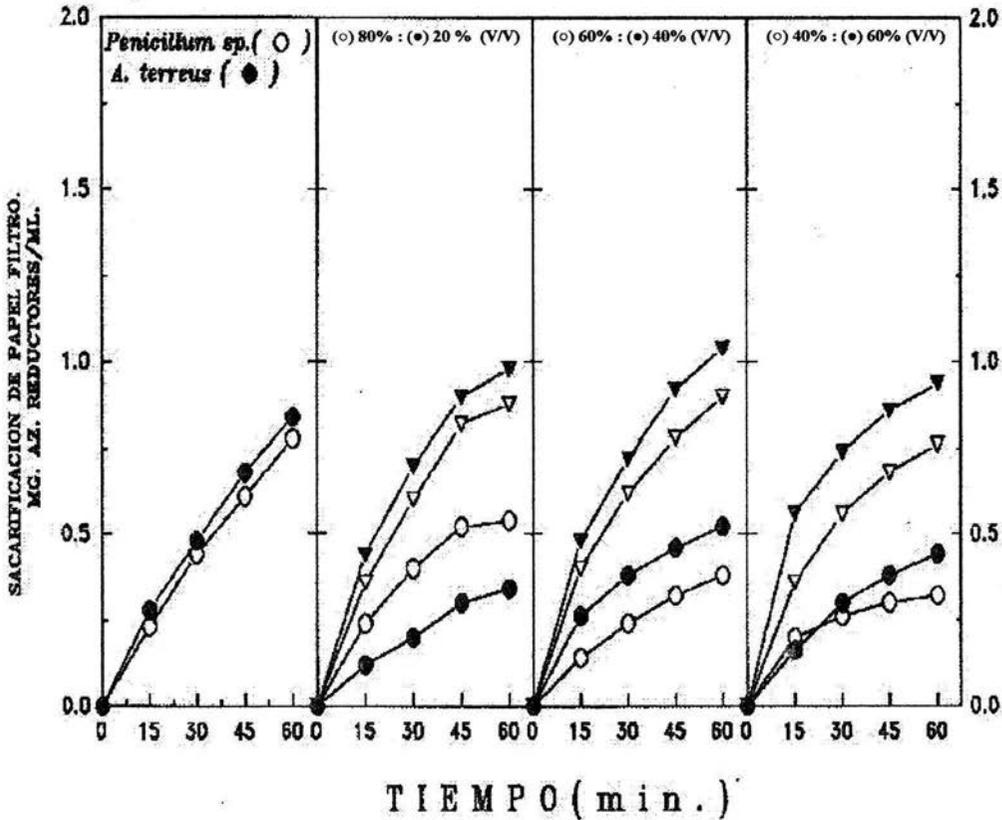


Fig. 8 Sacarificación de 50 mg de Papel Filtro con los filtrados de cultivo de las cepas: *Penicillium sp.* (○), *Aspergillus terreus* (●) y por las combinaciones de los mismos (▼) a un pH de 4.8, 50°C y una agitación de 120 rpm. Suma de la actividad de cada filtrado por separado (▽). σ = Desviación estandar.

Las combinaciones que mostraron mayor cantidad de azúcares reductores fueron las realizadas entre *Aureobasidium/Penicillium* en la relación 80:20, *Aureobasidium/Aspergillus terreus* 60:40 y *Penicillium/Aspergillus terreus* 60:40, respectivamente. Con ello fue posible considerar que existía un cierto grado de complementariedad entre los sistemas celulolíticos de estos hongos para la sacarificación de un material celulósico que contiene en su estructura tanto porciones amorfas como cristalinas, en forma similar a la que presenta un material lignocelulósico nativo, como el bagacillo de caña.

Con el fin de comprobar el efecto detectado sobre el papel filtro, en una serie de experimentos bajo condiciones similares, fue evaluada la sacarificación de 50 mg de bagacillo de caña sin pretratamiento, con las mismas relaciones de mezclado entre los filtrados de cultivo de las tres cepas celulolíticas utilizadas. Los resultados se muestran en las Figuras 9, 10 y 11. El comportamiento de la curva de progreso fue similar a las sacarificaciones efectuadas con los filtrados y sus mezclas sobre el papel filtro como sustrato. De nuevo, se presentó el efecto de sinergismo en todas las combinaciones evaluadas, la cantidad de azúcares reductores obtenida durante la sacarificación del bagacillo fue mayor a la del papel, excepto para la combinación de filtrados de cultivo de *Aureobasidium/Penicillium*, donde prácticamente se obtuvo la misma.

Para las combinaciones de *Aureobasidium/Aspergillus terreus* y *Penicillium/Aspergillus terreus*, las mejores relaciones volumétricas de mezclado fueron para el primer caso, la de 60:40 y para el segundo, la de 40:60. Estos resultados fueron similares a los de otros investigadores (van Wyk y cols., 2000) que probaron la sacarificación de diferentes clases de papel de reuso, utilizando mezclas de celulasas provenientes de *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*.

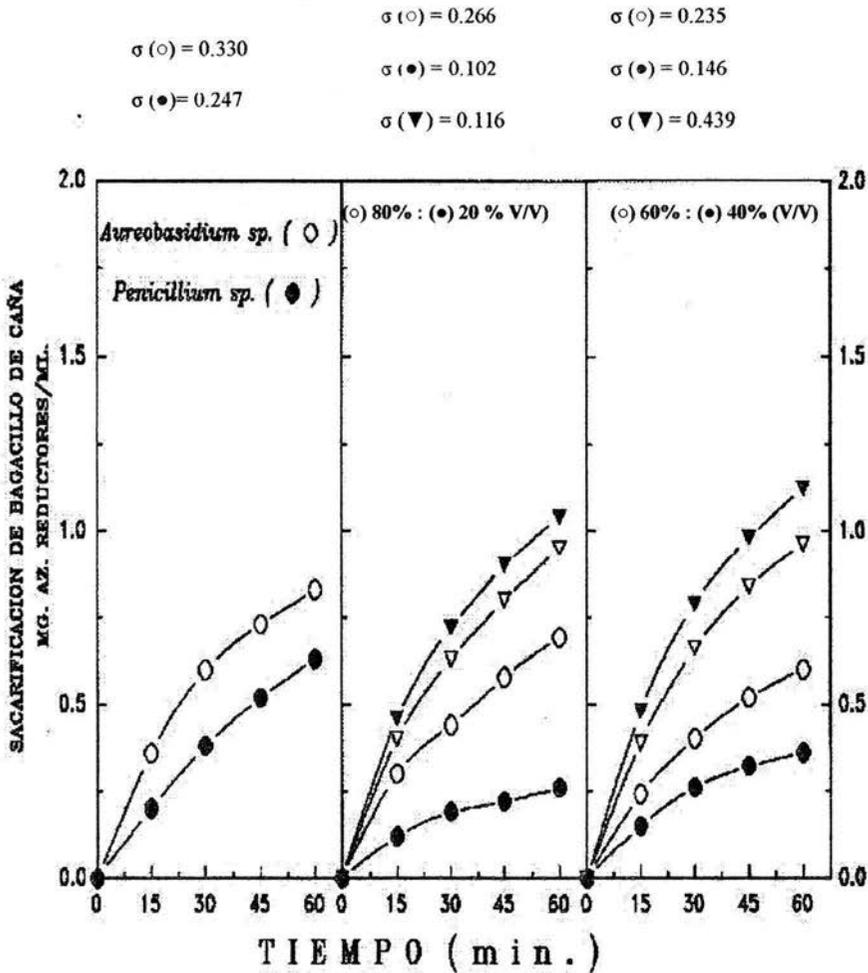


Fig. 9 Sacarificación de 50 mg de Bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento con los filtrados de cultivo de las cepas: *Aureobasidium sp.* (\circ), *Penicillium sp.* (\bullet) y por las combinaciones de los mismos (\blacktriangledown) a un pH de 4.8, 50°C y una agitación de 120 rpm. Suma de la actividad de cada filtrado por separado (∇).
 σ = Desviación estandar.

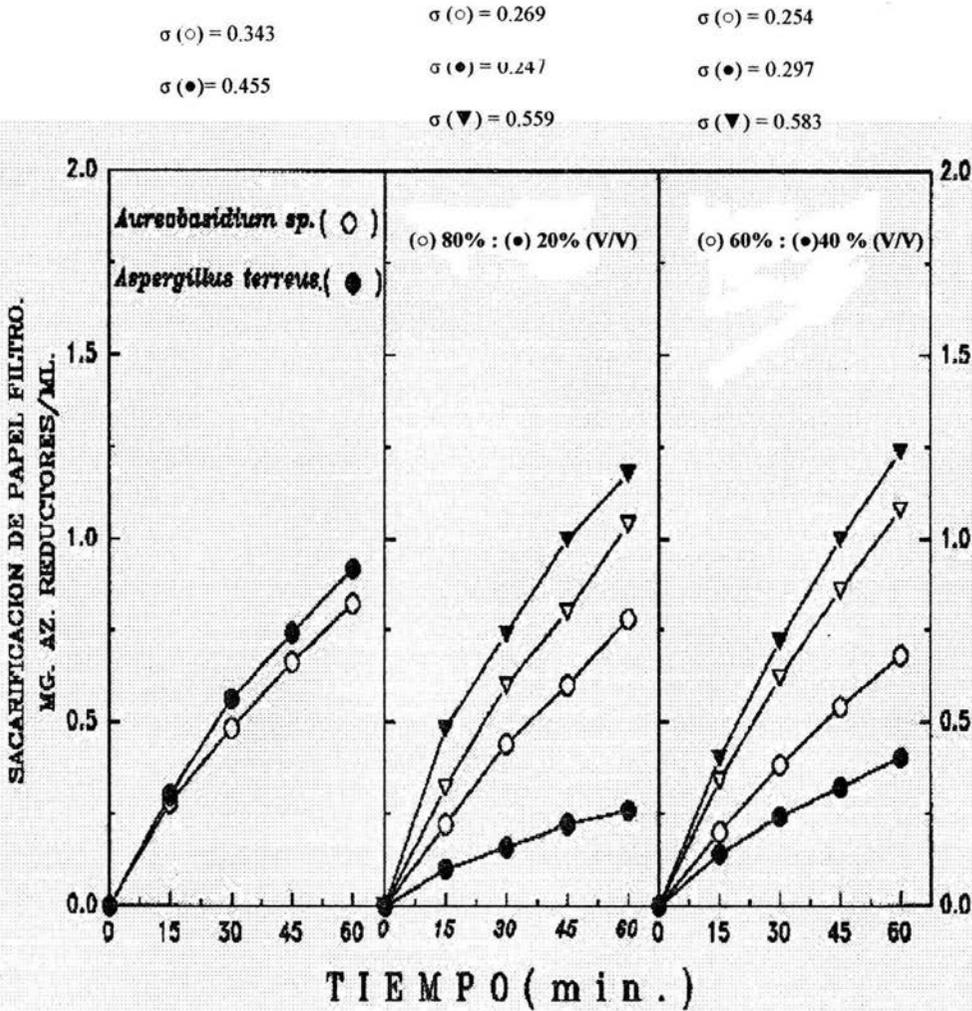


Fig. 10 Sacarificación de 50 mg de Bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento con los filtrados de cultivo de las cepas: *Aureobasidium sp.* (\circ), *Aspergillus terreus* (\bullet) y por las combinaciones de los mismos (\blacktriangledown) a un pH de 4.8, 50°C y una agitación de 120 rpm. Suma de la actividad de cada filtrado por separado (∇).
 σ = Desviación estándar.

$\sigma (\circ) = 0.251$

$\sigma (\circ) = 0.246$

$\sigma (\circ) = 0.166$

$\sigma (\circ) = 0.133$

$\sigma (\bullet) = 0.446$

$\sigma (\bullet) = 0.197$

$\sigma (\bullet) = 0.314$

$\sigma (\bullet) = 0.429$

$\sigma (\nabla) = 0.474$

$\sigma (\nabla) = 0.530$

$\sigma (\nabla) = 0.605$

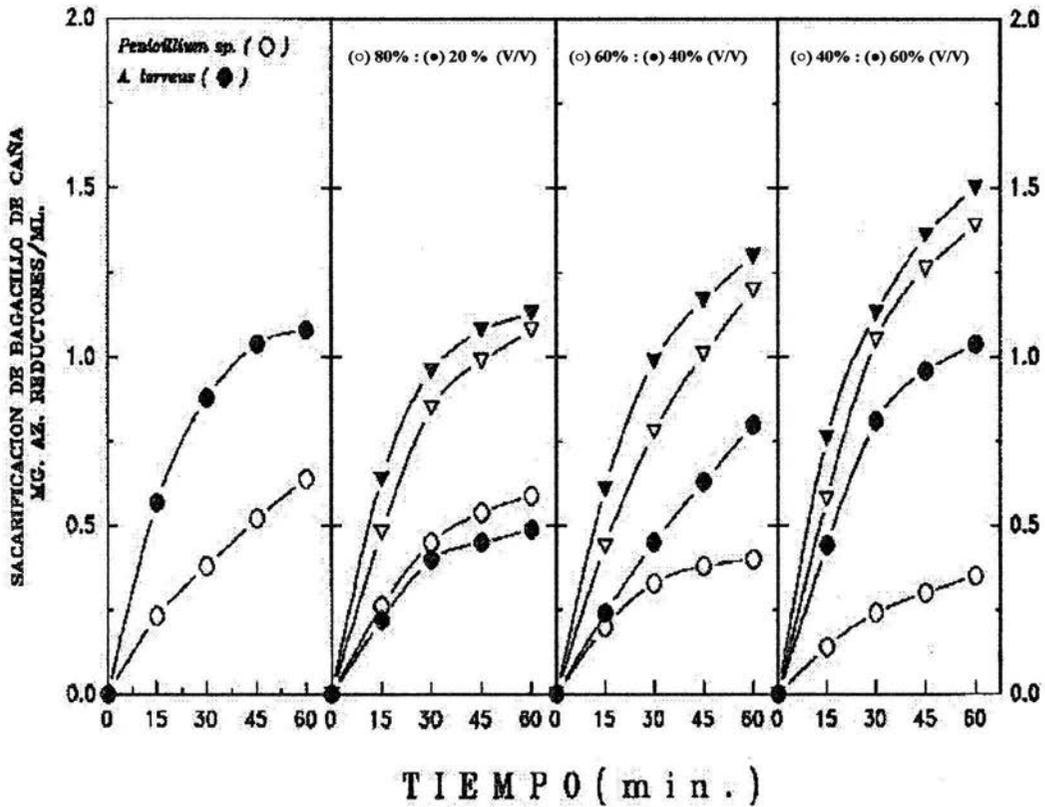


Fig. 11 Sacarificación de 50 mg de Bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento con los filtrados de cultivo de las cepas: *Penicillium* sp. (○), *Aspergillus terreus* (●) y por las combinaciones de los mismos (▼) a un pH de 4.8, 50°C y una agitación de 120 rpm. Suma de la actividad de cada filtrado por separado (▽).

σ = Desviación estándar.

TABLA 8

VELOCIDADES DE REACCIÓN DURANTE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON LOS SISTEMAS CELULOLÍTICOS EVALUADOS.

SISTEMA MICROBIANO	SACARIFICACIÓN DEL PAPEL FILTRO		SACARIFICACIÓN DEL BAGACILLO DE CAÑA	
	VELOCIDAD		VELOCIDAD	
	(mg. az. red./ ml. min)		(mg. az. red./ ml. min)	
	INICIAL	MEDIA*	INICIAL	MEDIA*
<i>Aureobasidium sp.</i>	0.019	0.015	0.024	0.013
<i>Penicillium sp.</i>	0.013	0.013	0.013	0.010
<i>Aureobasidium sp.</i> (80%)	0.019	0.011	0.019	0.011
<i>Penicillium sp.</i> (20%)	0.007	0.005	0.008	0.004
Combinación 80: 20 % (V/V)	0.033	0.018	0.031	0.017
<i>Aureobasidium sp.</i> (60%)	0.015	0.010	0.016	0.010
<i>Penicillium sp.</i> (40%)	0.010	0.006	0.009	0.006
Combinación 60: 40 % (V/V)	0.031	0.017	0.038	0.018
<i>Aureobasidium sp.</i>	0.016	0.014	0.020	0.014
<i>Aspergillus terreus</i>	0.018	0.016	0.037	0.018
<i>Aureobasidium sp.</i> (80%)	0.018	0.013	0.020	0.011
<i>Aspergillus terreus</i> (20%)	0.009	0.004	0.016	0.010
Combinación 80:20 % (V/V)	0.033	0.020	0.040	0.023
<i>Aureobasidium sp.</i> (60%)	0.012	0.012	0.016	0.010
<i>Aspergillus terreus</i> (40%)	0.009	0.007	0.019	0.012
Combinación 60:40 % (V/V)	0.027	0.021	0.043	0.024
<i>Penicillium sp.</i>	0.015	0.013	0.016	0.010
<i>Aspergillus terreus</i>	0.019	0.014	0.038	0.018
<i>Penicillium sp.</i> (80%)	0.015	0.009	0.017	0.010
<i>Aspergillus sp.</i> (20%)	0.007	0.006	0.014	0.008
Combinación 80:20 % (V/V)	0.029	0.017	0.043	0.018
<i>Penicillium sp.</i> (60%)	0.009	0.006	0.012	0.007
<i>Aspergillus sp.</i> (40%)	0.017	0.008	0.015	0.013
Combinación 60:40 % (V/V)	0.032	0.017	0.040	0.021
<i>Penicillium sp.</i> (40%)	0.013	0.005	0.009	0.005
<i>Aspergillus sp.</i> (60%)	0.010	0.007	0.029	0.017
Combinación 40:60 % (V/V)	0.038	0.015	0.051	0.024

* La velocidad media fue calculada de acuerdo a la pendiente de cada gráfica.

En la Tabla 8 se agrupan los valores obtenidos después de calcular las velocidades iniciales de los sistemas enzimáticos evaluados para la reacción de sacarificación, tanto en el papel filtro como con el bagacillo de caña de azúcar. Analizando los valores obtenidos se puede apreciar que la sacarificación del bagacillo de caña de azúcar es mayor al comienzo de la hidrólisis para todos los sistemas enzimáticos evaluados tanto en forma individual como con las combinaciones realizadas con ellos, obteniéndose la más alta con la mezcla de filtrados de *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* en la relación volumétrica 40 : 60 % (V/V). Con respecto a la velocidad media promedio calculada con las pendientes de cada gráfica, las diferencias obtenidas no resultan muy notorias para la sacarificación entre estos dos materiales celulósicos evaluados, pero es ligeramente mayor en el caso de del bagacillo de caña de azúcar. Lo anterior puede estar relacionado con la cantidad de zonas amorfas disponibles al inicio de la reacción hidrolítica ya que el papel filtro por otro lado es un material más homogéneo ya que la celulosa contenida en el mismo ha sido purificada y en el caso del bagacillo se trata de un material nativo el cual no ha recibido ningún tipo de pretratamiento.

Sin embargo, con los resultados experimentales hasta aquí obtenidos fue posible demostrar el efecto del sinergismo GES (por sus siglas en español: grado de efecto sinérgico) de 2 sistemas celulolíticos diferentes. El GES fue definido como la relación existente entre los azúcares reductores producidos por la acción combinada de las mezclas de filtrados con actividad celulolítica sobre el bagacillo y los azúcares reductores totales producidos por cada uno por separado, considerando también que es mayor a la suma de la fracción correspondiente a cada uno de ellos por separado.

Un valor igual o menor a 1.0 indica que no hubo un efecto sinérgico o bien que se presentó un efecto inhibitorio durante la reacción.

Considerando lo anteriormente expuesto, fue posible seleccionar la combinación entre los sistemas celulolíticos, aparentemente con mejor afinidad entre ellos (*Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus*) para sacarificar este material y las relaciones volumétricas de mezclado de los filtrados de cultivo 60:40 y 40:60 lo cual es presentado en la siguiente tabla.

TABLA 9

MEZCLAS DE FILTRADOS DE CULTIVO	Relación Volumétrica V/V	TIEMPO (minutos)									
		Azúcares reductores (mg/ml)					G E S* Grado de efecto sinérgico				
		0	15	30	45	60	0	15	30	45	60
<i>Aureobasidium sp.</i> + <i>Penicillium sp.</i>	80:20	0	0.46	0.72	0.90	1.02	0	1.15	1.14	1.10	1.07
	60:40	0	0.48	0.75	0.95	1.09	0	0.17	0.14	0.13	1.09
<i>Aureobasidium sp.</i> + <i>A. terreus</i>	80:20	0	0.65	0.98	1.20	1.32	0	1.18	1.15	1.10	1.06
	60:40	0	0.63	1.05	1.28	1.45	0	1.19	1.14	1.12	1.08
<i>Penicillium sp.</i> + <i>A. Terreus</i>	80:20	0	0.64	0.96	1.13	1.15	0	1.33	1.19	1.14	1.06
	60:40	0	0.61	0.99	1.17	1.30	0	1.39	1.27	1.16	1.08
	40:60	0	0.83	1.13	1.41	1.53	0	1.43	1.33	1.19	1.10
<i>Aureobasidium sp.</i>	100	0	0.31	0.54	0.73	0.85					N A
<i>Penicillium sp.</i>	100	0	0.23	0.38	0.52	0.64					N A
<i>A. terreus</i>	100	0	0.57	0.88	1.04	1.08					N A

* G E S = Concentración de azúcares reductores producidos por la mezcla de celulasas
Suma de la concentración de azúcares reductores producidos individualmente por cada celulasa.

4.5.-Sacarificación del bagacillo de caña en un reactor en lote de 1000 mL con agitación.

Una vez demostrado que se presentó un cierto grado de complementariedad en la acción de las combinaciones de filtrados con actividad celulolítica realizadas, se procedió a probar 4 de ellas en un reactor agitado de 1 litro de capacidad bajo las mismas condiciones, pero sometidas a un tiempo de hidrólisis mayor en el cual los resultados fueran representativos a de un sistema de mayor escala y es donde se pueden determinar algunas condicioners ambientales que influyen en la velocidad de reacción del sistema enzimático. También era necesario conocer la estabilidad operacional durante las 48 horas de hidrólisis.

Así, las combinaciones de filtrados de cultivo con actividad celulolítica de las cepas de los hongos: *Aureobasidium/Penicillium*, *Aureobasidium/Aspergillus terreus* y *Penicillium/Aspergillus terreus* en las relaciones volumétricas de mezclado: 60:40 para los dos primeros casos y 60:40, 40:60 en el último, fueron las que mostraron un mayor grado de efecto sinérgico (GES).

En las figuras 12, 13 y 14 se puede observar el progreso de la sacarificación de 20 g de bagacillo sin pretratamiento, monitoreando el comportamiento de cada sistema mediante la determinación por triplicado de azúcares reductores a intervalos de tres horas hasta completar un tiempo de 48 h de hidrólisis. La producción de azúcares reductores disminuyó rápidamente con respecto al tiempo de incubación, lo cual se ve reflejado, como lo señala Gregg y Sadler (1996), en una baja productividad y en tiempos largos de proceso o bien, como señala Ooshima y cols. (1990), la interacción sinérgica entre los componentes de las celulasas tiene menor efecto al incrementarse el grado de producción de azúcares solubles.

El comportamiento obtenido con respecto a la obtención de azúcares reductores es similar en todos los casos, tanto para los filtrados con la actividad celulolítica evaluados en forma individual; como con las combinaciones respectivas, ya que ésta disminuye en forma notoria a partir de las 24 horas, lo cual puede ser debido a un incremento de las porciones cristalinas disponibles en el sustrato (Fan y cols., 1980), aunque al existir una complementariedad con las combinaciones de filtrados en las sacarificaciones, tarda más en presentarse este efecto.

También es posible establecer, como lo señala Eriksson y cols. (2002), que para obtener una elevada conversión de la celulosa se requieren también elevadas cantidades de enzima, lo cual, como fue mencionado anteriormente, es uno de los motivos por los cuales el proceso aún no resulta atractivo económicamente.

De igual forma y como lo señala Zhang y cols. (1999), la heterogeneidad del sustrato causa por lo general una cinética no lineal durante la hidrólisis enzimática. Esa no-linearidad observada puede ser explicada por alguno o bien por los tres siguientes factores: inactivación enzimática, inhibición por producto o heterogeneidad del sustrato como ya fue mencionado anteriormente.

El perfil de la curva obtenida para las combinaciones de filtrados de cultivo de *Penicillium A. terreus* (que fueron las que produjeron mayor cantidad de azúcares a las 48 h de reacción) es muy parecido entre ellas. Sin embargo, al calcular la cantidad de azúcares producidos a lo largo de toda la hidrólisis, es notorio que la relación 40/60, es la más elevada.

Así, con la combinación de filtrados de cultivo obtenidos de dos diferentes cepas productoras de actividad celulolítica que tienen el mismo contenido de proteína, es posible obtener 43% mayor cantidad de azúcares reductores en la sacarificación del bagacillo de caña sin pretratamiento, con respecto al filtrado con mayor actividad,

actuando en forma individual y 12 % de incremento en la cantidad de azúcares, considerando la suma de las actividades de cada una por separado sometidas a las mismas condiciones.

Este efecto puede ser considerado como un sinergismo cruzado entre 2 sistemas celulolíticos diferentes, lo cual puede deberse a que existe gran afinidad entre los componentes de cada sistema enzimático. Esto es similar a los estudios realizados con *Trichoderma*, donde el mayor efecto sinérgico entre componentes se presentó a una relación volumétrica particular (Wood y cols., 1989). También puede deberse tan sólo a que los sistemas celulolíticos de *Penicillium* y *Aspergillus terreus* actúan en forma complementaria, haciendo que se exponga la estructura de la fibra de celulosa mas rápidamente a la acción hidrolítica, lo cual puede ser debido a que se propició (con cada combinación), una mejor complementaridad de las actividades entre las endo y exoglucanasas de cada filtrado en particular.

Otro punto de vista, que no se puede dejar de considerar, es que el filtrado de cultivo de *Aspergillus terreus* presenta una actividad de beta-glucosidasa mayor, con respecto a los otros filtrados probados, con lo cual es posible que se reduzca el efecto inhibitorio en la reacción de hidrólisis (ocasionado por la celobiosa) que es mayor al ejercido por la misma glucosa, como producto final de la hidrólisis.

Es posible que la complementación entre los filtrados de estas 2 cepas sea entre la celobiohidrolasa de *Penicillium* y la beta-glucosidasa de *Aspergillus terreus*, sin dejar de considerar la actividad de las endoglucanasas de ambos.

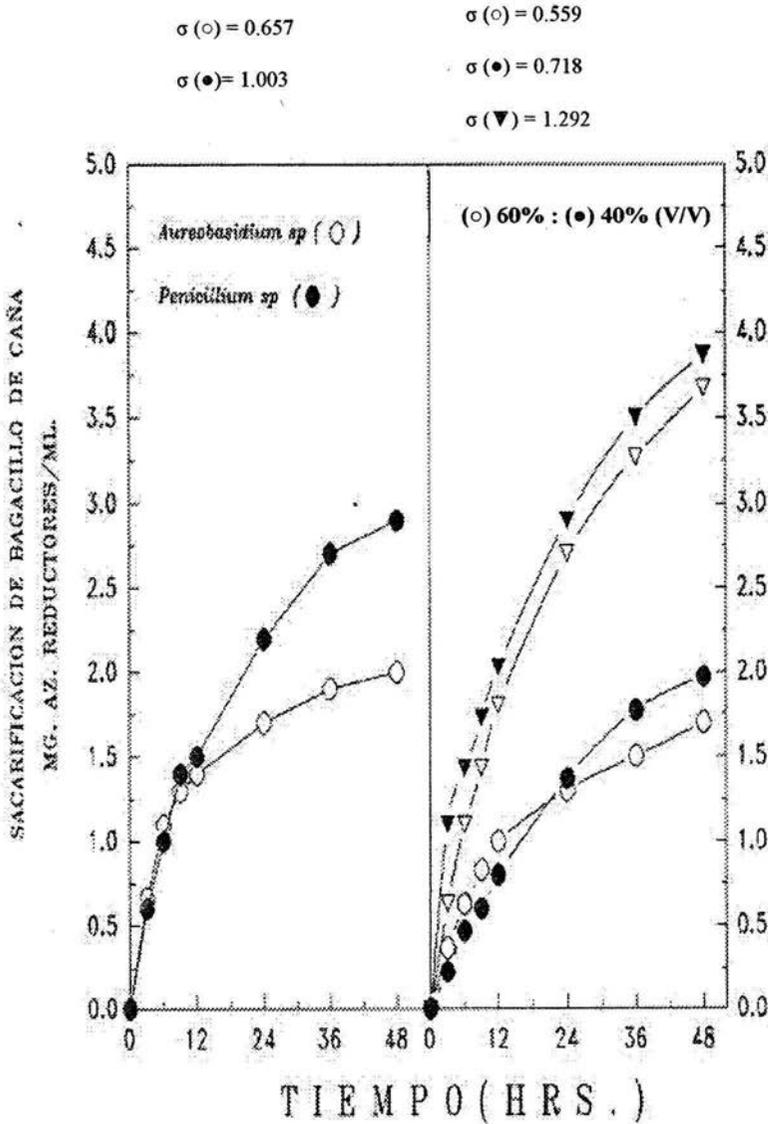


Fig. 12 Sacarificación de 20 G. de Bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento (tamizado a 30 mesh) con los filtrados de cultivo de las cepas de *Aureobasidium sp.* (○) y *Penicillium sp.* (●) y por las combinaciones de los mismos (◀) a un pH de 4.8, 50°C en un reactor de tanque agitado (130-150 golpes/min.). Suma de la actividad de cada filtrado por separado (△).
 σ = Desviación estándar.

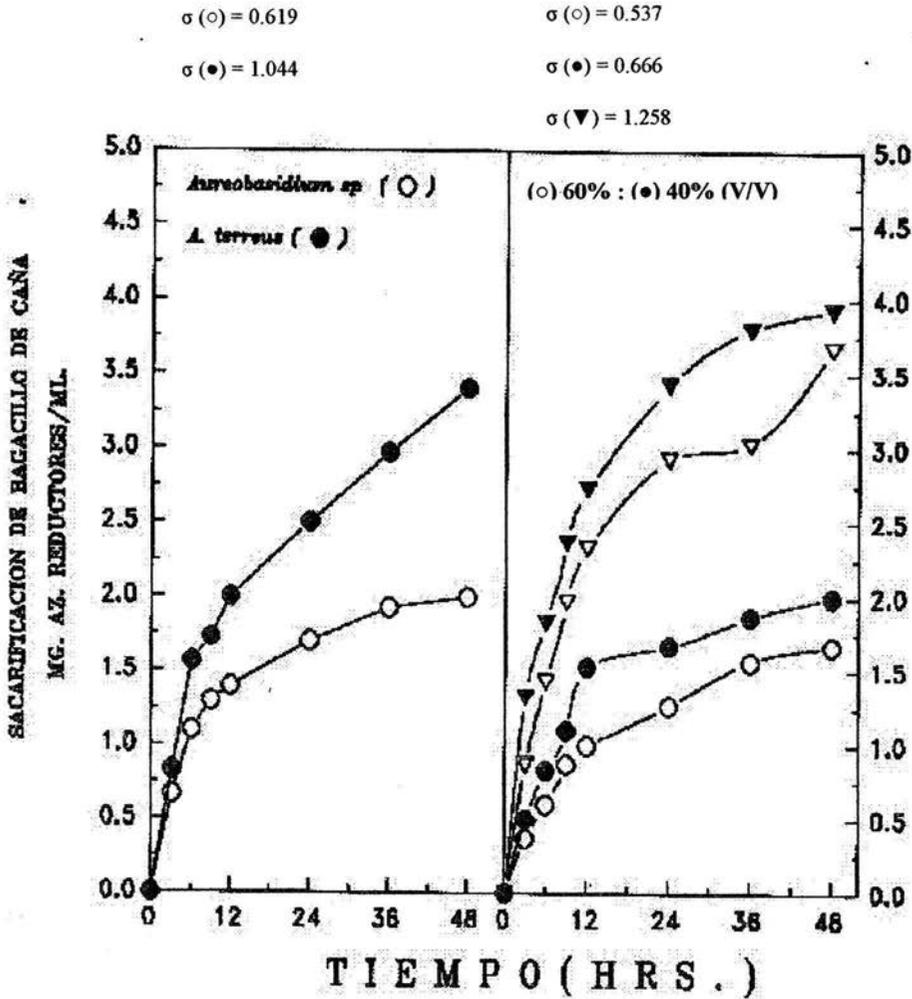


Fig. 13 Sacarificación de 20 G. de Bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento (tamizado a 30 mesh) con los filtrados de cultivo de las cepas de *Aureobasidium sp.* (○) y *Aspergillus terreus* (●) y por las combinaciones de los mismos (▽) a un pH de 4.8, 50°C en un reactor de tanque agitado (130-150 golpes/min.). Suma de la actividad de cada filtrado por separado (▽).
 σ = Desviación estándar.

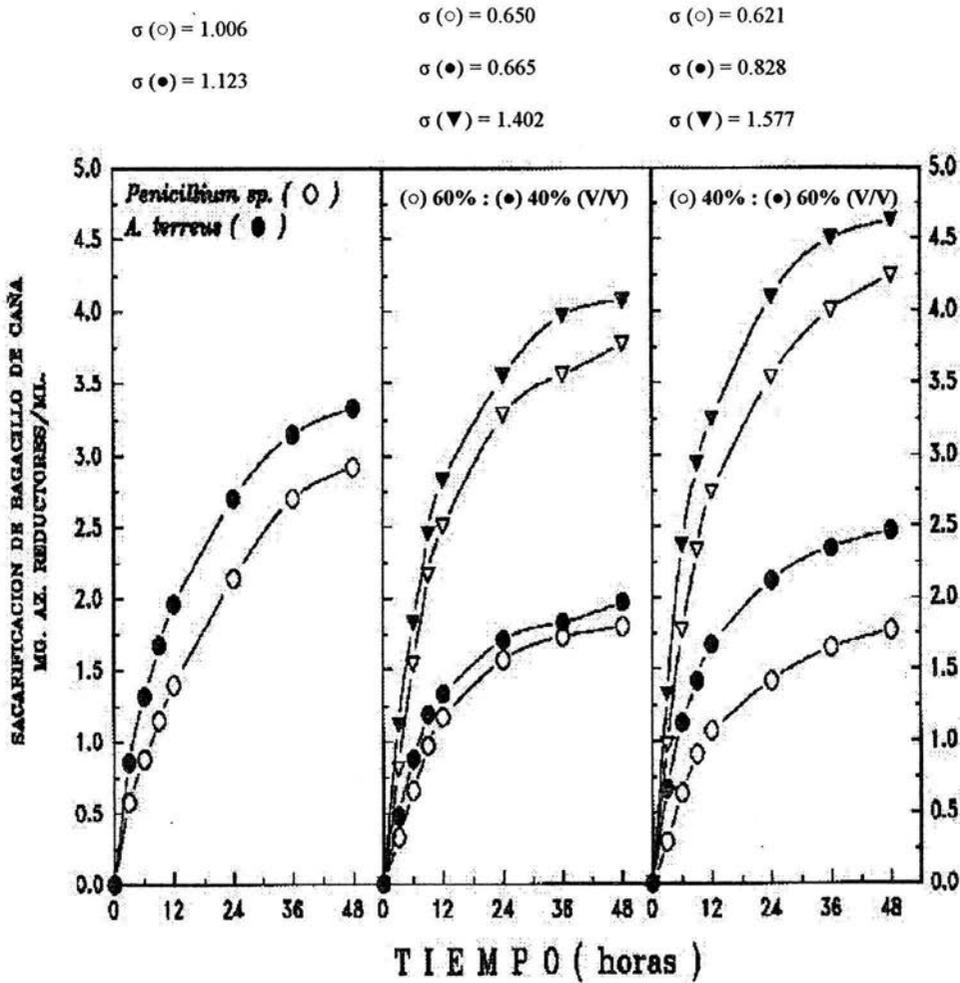


Fig. 14 Sacarificación de 20 G. de Bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento (tamizado a 30 mesh) con los filtrados de cultivo de las cepas de *Penicillium sp.* (\circ) y *Aspergillus terreus* (\bullet) y por las combinaciones de los mismos (\blacktriangledown) a un pH de 4.8, 50°C en un reactor de tanque agitado (130-150 golpes/min.). Suma de la actividad de cada filtrado por separado (∇). σ = Desviación estandar.

4.6.- Evaluación de las condiciones de sacarificación del bagacillo de caña sin pretratamiento en el reactor de 1000 mL con la relación volumétrica 40/60 de los filtrados de cultivo de *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus*.

Una vez seleccionada la mezcla de filtrados de cultivo que mostró la mayor producción de azúcares solubles durante la sacarificación del bagacillo de caña sin pretratamiento (que fue la relación volumétrica de *Penicillium sp./Aspergillus terreus*, 40:60), se decidió conocer su comportamiento al modificar algunas variables, que pueden influir en el comportamiento del sistema durante la reacción hidrolítica en el biorreactor.

Las variables evaluadas consistieron en utilizar bagacillo de caña nativo (sin tamizar a malla 30), lo cual podría influir en los rendimientos finales puesto que podría considerarse que a menor tamaño de partícula, hay mayor cantidad de fibras de celulosa expuestas al ataque enzimático, de forma similar a lo que sucede al someter el material lignocelulósico a un pretratamiento físico, como el molido.

Sin embargo, como se puede apreciar en la Figura 15, el comportamiento mostrado durante la reacción de sacarificación del sistema enzimático mixto, es muy similar al de la figura anterior para la misma relación de mezclado y tan sólo existe una mayor variabilidad en los resultados obtenidos al cuantificar los azúcares reductores. Esto puede ser debido a una falta de uniformidad al muestrear el biorreactor para la determinación de azúcares, sobretodo si no se realiza con rapidez ya que el bagacillo sedimenta en el utensilio utilizado para recolectar las muestras del reactor.

Otro aspecto que se considero importante para una mejor distribución del sistema durante la reacción de hidrólisis fue el efecto del mezclado en el reactor para comparar la eficiencia del sistema enzimático al actuar sobre un sustrato insoluble como la celulosa. Para tal fin se cambió el recipiente del reactor por un vaso de Berzellius el cual es

ligeramente más largo en comparación con la configuración geométrica del vaso de precipitados tradicional.

Siendo notorio a simple vista, que existía una menor superficie para la distribución del bagacillo en el mismo con tan sólo cambiar el tipo de vaso de vidrio ya que aunque tenían la misma capacidad en volumen, el de Berzellius con mayor altura que la de un vaso de precipitado normal., el primero permitió lograr siempre una mayor superficie de contacto con la enzima, aunque es probable que en el de Berzellius exista una mayor adsorción de las celulasas al bagacillo de caña de azúcar.

Como es posible observar en la Figura 16, las variaciones obtenidas son poco significativas para intentar cambiar el sistema.

Con el fin de comprobar si las condiciones de operación inicialmente probadas resultaban favorables para obtener una buena hidrólisis del bagacillo, se procedió a determinar dentro de un intervalo cercano al inicialmente evaluado, los parámetros ambientales que podrían influir en el desempeño del sistema enzimático para la producción de una mayor cantidad de azúcares reductores por efecto de la combinación volumétrica de filtrados con actividad celulolítica. Estas fueron: el efecto de la concentración del sustrato, la temperatura de incubación, el pH óptimo para el sistema, así como la concentración de la enzima.

Con respecto a la concentración de sustrato, en la Figura 17 es notorio que conforme se incrementa la concentración del mismo en el sistema, la producción de azúcares reductores también aumenta desde el inicio. Las variaciones en la obtención de azúcares no resultan muy significativas para el intervalo del 3 al 5 % W/V aunque la pendiente de la curva daría indicios de una velocidad ligeramente mas alta. Sin embargo y con el fin de lograr una mejor distribución del sustrato en el sistema así como también debido a que las suspensiones de 4 y 5 % de bagacillo fueron más difíciles de manejar

(sobre todo durante el muestreo), se prefirió continuar utilizando la del 3% W/V. A esta concentración se obtuvo una conversión de azúcares solubles mayor a los filtrados probados en forma individual. Además esta concentración de bagacillo no estaba muy lejana de la evaluada inicialmente que fué del 3.3% W/V. Otro aspecto que es necesario no dejar de considerar, al igual que en el trabajo de Mandels y Stenberg, (1976), es que cuando la concentración del sustrato aumenta, la cantidad de azúcares también es mayor, pero el porcentaje de conversión obtenido es más bajo.

Como es comunmente observado para el caso de las celulasas, con un exceso de sustrato, una gráfica de azúcares reductores producidos *versus* concentración de enzima es una curva de tipo hiperbólico. También en forma similar, una curva no-lineal es obtenida para las gráficas de azúcares reductores *versus* tiempo de hidrólisis a una determinada concentración de enzima (Satller y cols., 1989; Adney y cols., 1994; Zhang y cols., 1999).

Esta no-linearidad no solamente hace difícil comparar la efectividad de diferentes celulasas sobre la velocidad y extensión de la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos sino que también que conforme la hidrólisis procede, la velocidad disminuye y casi se detiene antes de que todo el sustrato pueda ser degradado completamente. Esta situación puede ser analizada en la Tabla 10 después de calcular las velocidades iniciales obtenidas en el reactor de agitado de un litro. Aunque las velocidades mostradas por las combinaciones de filtrados son casi el doble con respecto a las obtenidas por cada sistema por separado, el valor obtenido es mucho menor que en el sistema inicialmente evaluado. En lo general, esto sucede cuando se prueban los sistemas enzimáticos a una mayor escala y aunque las condiciones aparentemente sean las mismas existen factores ya mencionadps como la superficie de contacto con el sustrato, la homogeneidad del mismo en el sistema que influyen en la operación del

sistema de reacción. Sin embargo en las combinaciones realizadas con respecto a los sistemas celulolíticos heterogéneos la velocidad obtenida fue mayor por lo cual el efecto de sinergismo cruzado es reproducible también con este volumen de trabajo.

En la Figura 18, se observa el efecto en la variación de la temperatura de operación del biorreactor durante 48 horas de hidrólisis. El comportamiento obtenido es típico para sistemas enzimáticos poco resistentes al efecto de elevación de la temperatura con lo cual pudimos establecer que el sistema celulolítico mixto obtenido con *Penicillium/Aspergillus terreus*, tiene una máxima actividad catalítica a los 50°C, temperatura a la cual, habían sido realizadas las pruebas de sacarificación desde el principio del proyecto, la cual, por otro lado, es igual a la considerada como la cual normalmente se trabajan las celulasas de *Trichoderma viride*.

Con respecto al pH óptimo de reacción del sistema mixto como se observa en la Figura 19, el pH de máxima actividad de sacarificación del sistema celulolítico de *Penicillium/A. terreus* en la relación de mezclado 40:60, fue de 4.6.

Finalmente, fue posible comprobar, tal y como se presenta en la Figura 20, que la concentración de enzima probada en todos los experimentos realizados desde el inicio, con los sistemas celulolíticos individuales así como con los mixtos, fue la más recomendable para los ensayos de sacarificación realizados. Se observó que no existe una gran diferencia entre la cantidad de azúcares obtenida al principio de la hidrólisis y prácticamente es la misma a las 24 horas para las 3 últimas concentraciones que fueron: 0.19, 0.28 y 0.37 unidades sobre papel filtro/ml (UPF/ml). Se puede observar que la pendiente de las curvas obtenidas para ese rango de concentraciones son muy similares desde el inicio y la diferencia de azúcares reductores obtenidos después de las 12 horas es muy pequeña (~ 0.25 mg az. red./ml).

Ese efecto es similar al detectado por Mandels y Stenberg (1976) ya que, cuando la concentración de la enzima aumenta, los azúcares también se elevan pero, la cantidad producida por unidad de enzima es menor.

En todas las reacciones de sacarificación realizadas tanto a tiempos cortos como largos de hidrólisis se utilizaron 0.190 UPF/ml, ya que desde la etapa de producción por fermentación sumergida en matraces agitados, la actividad máxima obtenida se encontraba dentro de ese valor. Esto se debe a que las actividades para el ensayo en papel filtro (antes de la conversión a unidades/ml) se encontraban dentro del intervalo de 1.85-2.0 mg. az. red. /ml filtrado a la hora de hidrólisis.

Otro aspecto que fue necesario evaluar antes de probar el sistema celulolítico mixto a una escala mayor, fue el efecto de la agitación sobre la reacción de sacarificación del bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento. En la Fig. 21, se puede asumir que el sistema también puede operar, sin agitación ya que el comportamiento obtenido, prácticamente es el mismo. Esto puede ser ocasionado por un efecto de adsorción, el cual es mostrado por las celulasas sobre la superficie de la fibra de celulosa durante la hidrólisis. En un futuro convendría analizar este efecto más ampliamente, ya que a suspensiones de bagacillo superiores al 3 % W/V se dificulta el manejo y el sistema se vuelve muy heterogéneo. La ventaja de utilizarlo con agitación es lograr una mayor homogeneidad en el sistema durante la reacción de hidrólisis lo cual también, facilita en gran medida la toma de muestras durante el seguimiento de control del mismo durante la operación del mismo.

TABLA 10

VELOCIDADES DE REACCIÓN DURANTE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON LOS SISTEMAS CELULOLÍTICOS EVALUADOS EN UN REACTOR DE 1 L CON AGITACIÓN.

SISTEMA MICROBIANO	SACARIFICACIÓN DEL BAGACILLO DE CAÑA	
	VELOCIDAD (mg az. red./ ml min)	
	INICIAL	MEDIA*
<i>Aureobasidium sp.</i>	0.003	0.033
<i>Penicillium sp.</i>	0.003	0.055
<i>Aureobasidium sp.</i> (60%)	0.002	0.030
<i>Penicillium sp.</i> (40%)	0.001	0.041
Combinación 60 : 40 % (V/V)	0.006	0.071
<i>Aueobasidium sp.</i>	0.003	0.031
<i>Aspergillus terreus</i>	0.004	0.056
<i>Aureobasidium sp.</i> (60%)	0.002	0.029
<i>Aspergillus terreus</i> (40%)	0.002	0.034
Combinación 60 : 40 % (V/V)	0.007	0.064
<i>Penicillium sp.</i>	0.003	0.056
<i>Aspergillus terreus</i>	0.004	0.061
<i>Penicillium sp.</i> (60%)	0.001	0.034
<i>Aspergillus terreus</i> (40%)	0.002	0.034
Combinación 60 : 40 % (V/V)	0.006	0.071
<i>Penicillium sp.</i> (40%)	0.001	0.033
<i>Aspergillus terreus</i> (60%)	0.003	0.042
Combinación 40 : 60 % (V/V)	0.007	0.079

* La velocidad media fue calculada de acuerdo a la pendiente de cada gráfica.

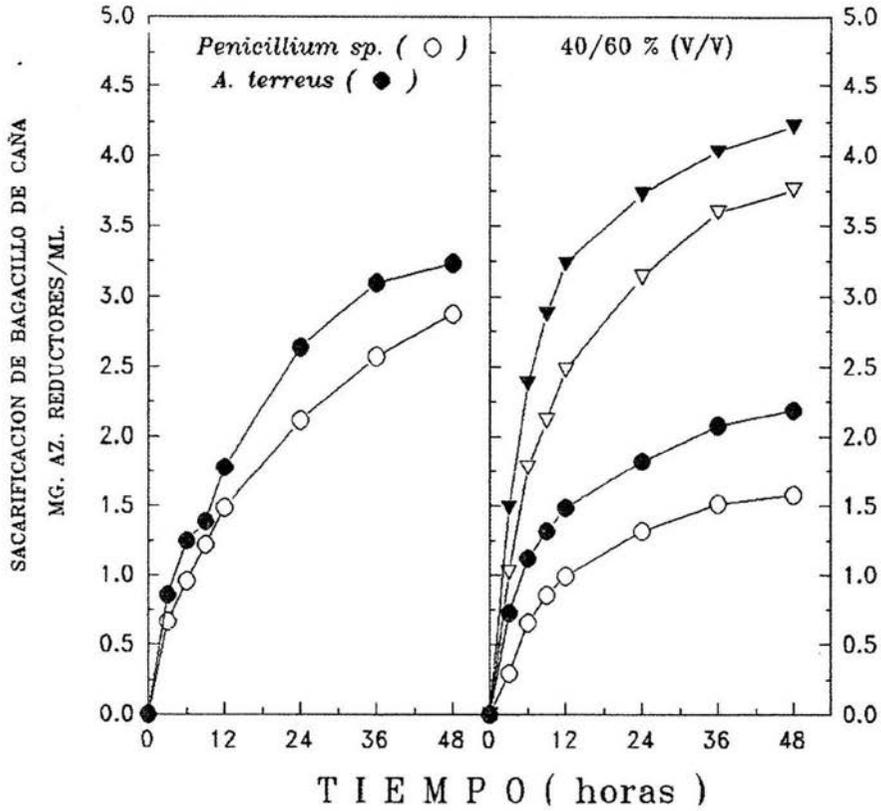


Fig. 15 Sacarificación de 20 G. de Bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento (sin tamizar) con los filtrados de cultivo de las cepas de *Penicillium sp.* (○) y *Aspergillus terreus* (●) y por las combinaciones de los mismos (▼) a un pH de 4.8, 50°C en un reactor de tanque agitado (130-150 golpes/min.). Suma de la actividad de cada filtrado por separado (▽).

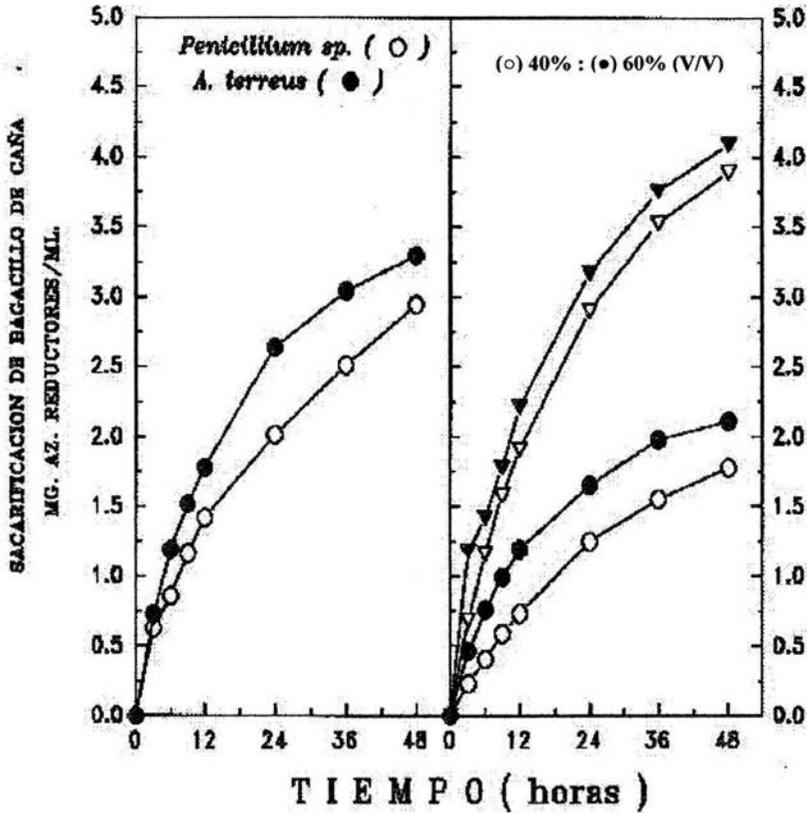


Fig. 16 Sacarificación de 20 G. de Bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento (tamizado a 30 mesh) con los filtrados de cultivo de las cepas de *Penicillium sp.* (○) y *Aspergillus terreus* (●) y por las combinaciones de los mismos (▽) a un pH de 4.8, 50°C en un reactor de tanque agitado (130-150 golpes/min.) con una menor superficie de distribución.
Suma de la actividad de cada filtrado por separado (▽).

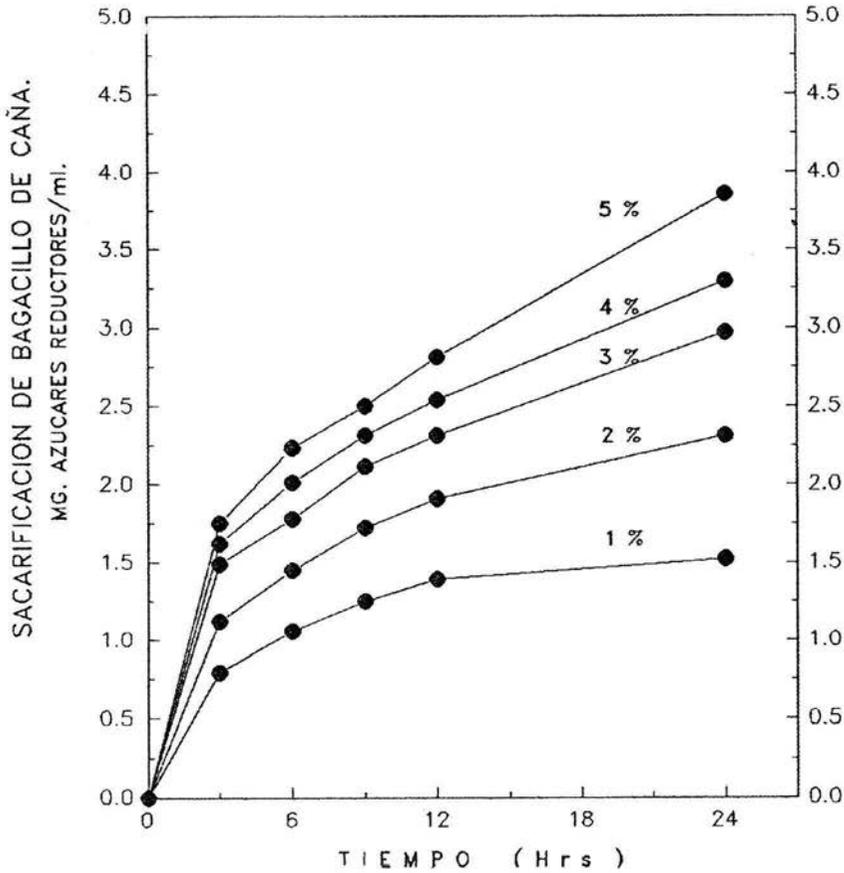


Fig. 17 Efecto de la concentración de sustrato (●) en la sacarificación del bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento en un reactor de tanque agitado (130-150 golpes/min), utilizando la combinación de filtrados de *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* (relación: 40/60%) a un pH de 4.8 y 50°C

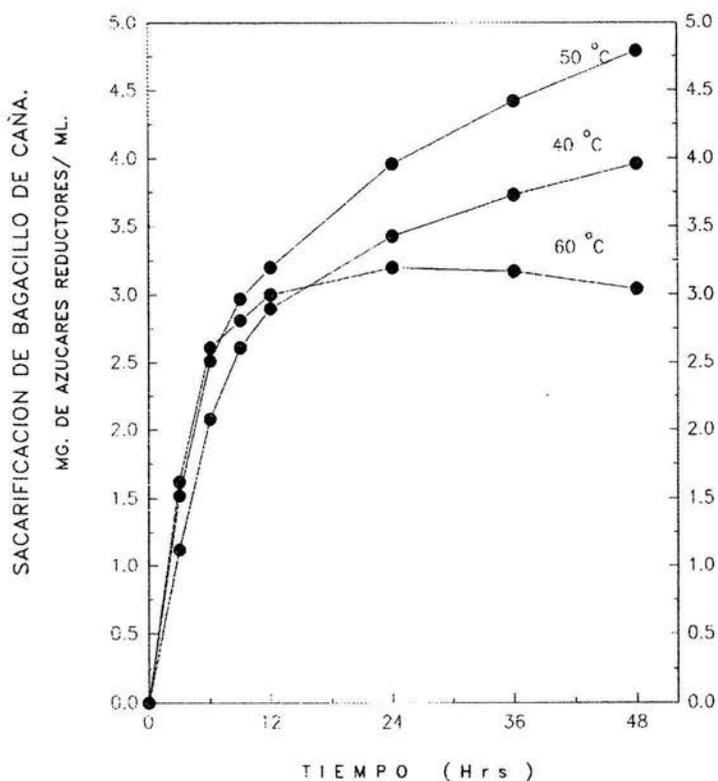


Fig. 18 Efecto de la temperatura de incubación (●) en la sacarificación del bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento en un reactor de tanque agitado utilizando la combinación de filtrados de cultivo de *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* (relación 40/60%).
 CONDICIONES: 18 G de Bagacillo tamizado a 30 mesh
 Solución amortiguadora de citratos 0.075 M, pH 4.8
 Agitación: 130-150 golpes/min

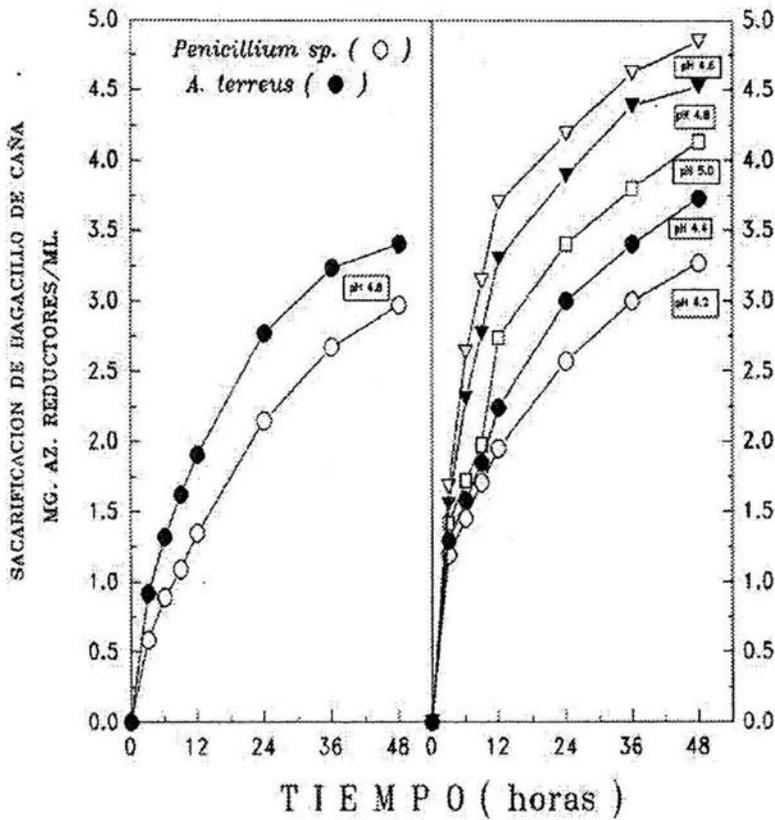


Fig. 19 Sacarificación de 20 G. de Bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento (tamizado a 30 mesh) con los filtrados de cultivo de las cepas de *Penicillium sp.* (○) y *Aspergillus terreus* (●) y por las combinaciones de los mismos, relación 40/60% (○, ●, □, ▼, ▽) a los pHs indicados en la gráfica, a 50°C en un reactor de tanque agitado (130-150 golpes/min.).

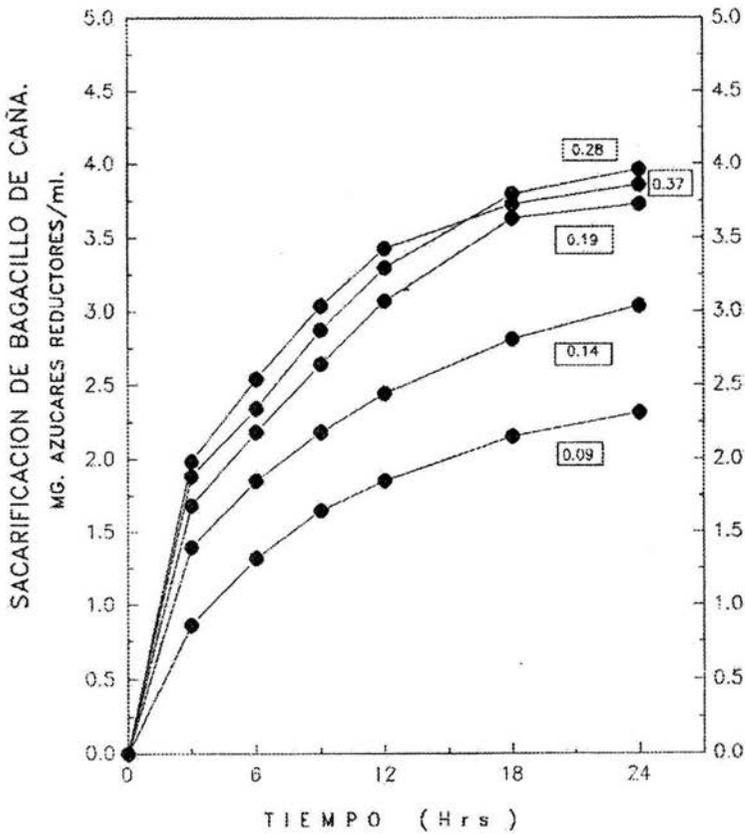


Fig. 20 Efecto de la concentración de enzima (●) en unidades de actividad sobre papel filtro/mL (UPF/mL) durante la sacarificación del bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento en un reactor de tanque agitado de 1000 mL con la combinación volumétrica 40/60% de los filtrados de cultivo de las cepas *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus*.

CONDICIONES: Bagacillo 18 G.

Solución amortiguadora de citratos 0.075M, pH 4.6

Agitación: 130-150 golpes/min.

Temperatura 50°C.

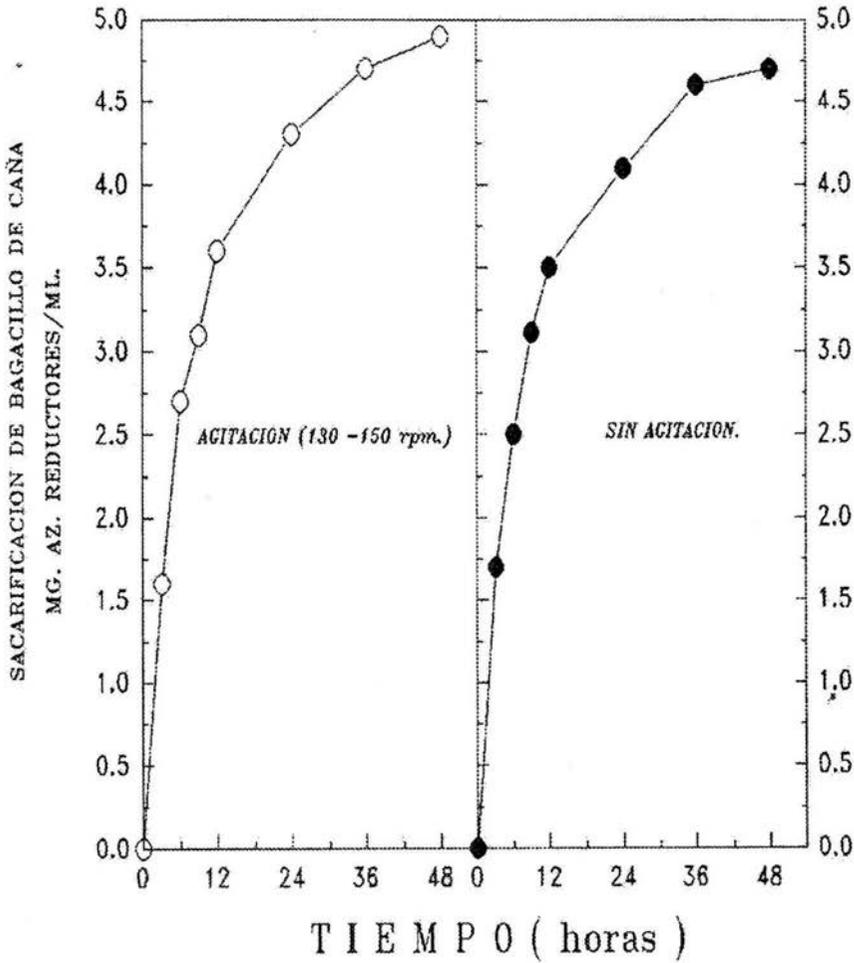


Fig. 21 Sacarificación de 18 G. de Bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento (tamizado a 30 mesh) en un reactor en lote de 1 litro, con y sin agitación con la combinación de filtrados de cultivo de las cepas de *Penicillium sp.* y *A. terreus* en la relación volumétrica 40/60% a un pH de 4.6 y 50°C.

4.7.-Evaluación de las condiciones de sacarificación del bagacillo de caña sin pretratamiento con el sistema celulolítico mixto de *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* en un reactor en lote de 5 L con agitación.

Una vez que fueron establecidos aquellas condiciones ambientales y de operación que influyen directamente en la reacción de sacarificación del bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento, con la combinación de filtrados de cultivo con la actividad celulolítica producidos por las cepas de *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus*, también sobre bagacillo nativo, se consideró conveniente evaluar el comportamiento a una escala mayor (en un biorreactor en lote de tanque agitado de 5 litros de capacidad), similar al usado en las etapas anteriores.

No se utilizó alguna estrategia en particular para probar el sistema a una escala mayor, sino que tan sólo se pretendió intentar repetir el comportamiento del sistema celulolítico mixto, al someterlo a las mismas condiciones, fijando los parámetros establecidos en la etapa de estandarización de las mismas. En la Figura 22 se presenta el comportamiento obtenido por el sistema celulolítico mixto y así como también el de cada celulasa por separado. Fue posible obtener de nuevo el comportamiento de sinergismo con la mezcla seleccionada entre los filtrados de cultivo con actividad celulolítica, la velocidad media de hidrólisis a las 48 horas, obtenida con el promedio de la pendiente de la curva, fue de 0.076 mg. az. red./ml min., muy similar a la del reactor de un litro bajo condiciones de reacción similares (0.079 mg. az. red./ml min). Estas velocidades son bajas tal y como señala Schwarz, 2001 donde no se puede dejar de considerar que la hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos por lo general es un proceso lento e incompleto.

Así, en el biorreactor de 5 litros con la mezcla obtenida al combinar los filtrados de cultivo con la actividad celulolítica con un contenido similar de proteína soluble, en la proporción volumétrica 40:60 de *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus*, es posible

obtener (a las 48 horas de hidrólisis) un 27.9% de azúcares reductores de una suspensión al 3 % de bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento bajo las siguientes condiciones:

pH: 4.6 (Solución amortiguadora: citratos 0.075 M)

Temperatura: 50°C.

Concentración de enzima: 0.19 UPF/ml

Agitación: 150 rpm.

Presión: atmosférica.

En la Tabla 11 son agrupadas todas las características de los sistemas celulolíticos evaluados, así como el porcentaje de conversión en azúcares solubles obtenidos durante la sacarificación del bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento en el reactor de 5 litros con agitación, es evidente que el sistema se vuelve mas eficiente desde el inicio de la reacción de hidrólisis para la conversión de azúcares solubles lo cual representa un 43% mayor cantidad a la obtenida con respecto al filtrado de cultivo con mayor actividad evaluado en forma individual bajo las mismas condiciones.

Con los resultados experimentales obtenidos durante el desarrollo de este trabajo, ha sido posible demostrar la producción de una mayor cantidad de azúcares solubles por efecto de la combinación de dos sistemas celulolíticos diferentes con respecto a cada filtrado evaluado en forma individual durante la sacarificación de un material lignocelulósico sin pretratamiento. También fue evidente un efecto de sinergismo entre dos sistemas celulolíticos de diferente origen.

Esto permitirá continuar evaluando otras opciones biotecnológicas encaminadas a mejorar los rendimientos de azúcares solubles utilizando sistemas biológicos mejorados en una reacción de sacarificación enzimática de materiales lignocelulósicos, como el

bagacillo de caña de azúcar, intentando aprovecharlos y con la posibilidad de integrar un bioproceso de aplicación industrial.

$$\sigma (\circ) = 0.806$$

$$\sigma (\diamond) = 1.453$$

$$\sigma (\bullet) = 0.860$$

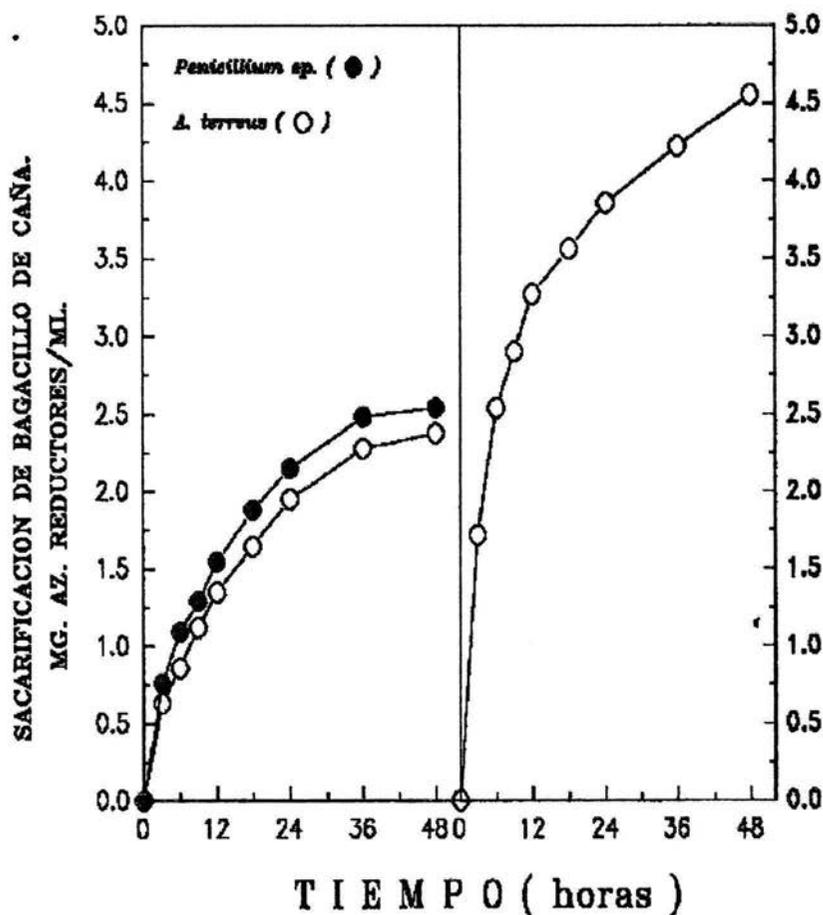


Fig. 22 Sacarificación de 75 G de Bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento con los filtrados de cultivo de las cepas de *Penicillium sp.*(●), *Aspergillus terreus* (○) y con la relación volumétrica 40/60% (◇), respectivamente (0.19 UPF/mL) a un pH de 4.6 y 50°C en un reactor en lote de 5 L con agitación de 150 rpm., una temp. De 50°C y un pH de 4.6, σ = Desviación estandar.

TABLA 11

PORCENTAJE DE SACARIFICACIÓN DEL BAGACILLO DE CAÑA DE AZÚCAR NATIVO CON LOS FILTRADOS DE CULTIVO DE *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* EN FORMA INDIVIDUAL Y CON LAS COMBINACIONES DE ELLOS (EN LA RELACIÓN VOLUMÉTRICA 40:60) EN UN REACTOR EN LOTE DE 6L CON AGITACIÓN.

FILTRADO CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA*	RELACIÓN %	PROTEINA SOLUBLE (mg/ml)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA** Unidades / ml.			PORCENTAJE DE SACARIFICACIÓN*** H O R A S							
			PFasa	CMCasa	β-glucosidasa	3	6	9	12	18	24	36	48
<i>Penicillium sp.</i>	100	0.50	0.185	0.73	0.380	3.6	5.5	6.7	8.5	10.3	12.1	13.9	14.5
<i>Aspergillus terreus</i>	100	0.54	0.194	1.073	0.870	4.8	6.7	7.9	9.7	11.5	13.3	15.2	15.8
<i>Penicillium sp.</i> + <i>Aspergillus terreus</i>	40:60	0.52	0.185	ND	ND	10.3	15.8	17.6	20.0	21.8	23.6	26.1	27.9

* A los 5 días de cultivo.

** Las actividades enzimáticas fueron determinadas de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC (Ghose, 1987).

*** El porcentaje de sacarificación (%SAC) fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula: %SAC. = (P/S) (0.55) donde P es la concentración de azúcares reductores (mg/ml) en el hidrolizado y S es la concentración de bagacillo (mg/ml) multiplicada por 0.55 debido a que este material contiene aproximadamente un 55% de celulosa (Srinivasan y Han, 1969).

ND: No determinada

5.0 CONCLUSIONES

- Se demostró que es posible producir por fermentación líquida filtrados de cultivo con diferentes relaciones de actividades celulolíticas con las cepas de hongos filamentosos de *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* en un medio preparado con reactivos grado industrial, agua potable y bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento. Fue posible substituir la urea por agua de cocimiento de maíz y se adicionó un surfactante usado en la industria de fermentaciones (Mazu₆₀₀₀) con lo cual fue posible hacer modificaciones al medio de cultivo originalmente formulado para el hongo levaduriforme *Aureobasidium sp.*
- Fueron determinadas las concentraciones a las cuales deben ser adicionados al medio modificado, el agua de cocimiento de maíz y el Mazu₆₀₀₀; así como el pH inicial y la temperatura de la fermentación para obtener una mayor producción de las actividades celulolítica y xilanolítica. Estas fueron diferentes para cada cepa y corresponden para *Penicillium sp.* a: 1.0 % de agua de cocimiento de maíz esterilizada por separado y 0.15 % de Mazu₆₀₀₀, un pH inicial de 4.5 y una temperatura de 29°C durante 5 días de fermentación. Para *Aspergillus terreus* fueron: 1% de agua de cocimiento de maíz esterilizada por separado y 0.2 % de Mazu₆₀₀₀, un pH inicial de 4.5 y una temperatura de 37°C también durante 5 días de fermentación.
- Se demostró que los filtrados de cultivo con un mismo contenido de proteína soluble, obtenidos de 3 hongos con diferente nivel de actividad celulolítica, son capaces de sacarificar el papel filtro y el bagacillo de caña sin pretratamiento cuando son usados en forma individual o bien al ser mezclados en diferentes relaciones volumétricas, lográndose un incremento en la cantidad de azúcares reductores obtenida, dependiendo de la proporción de mezclado y del sistema

mixto evaluado; manifestándose en todos los casos, un efecto de sinergismo. El grado de sinergismo detectado depende en gran parte de la relación volumétrica probada lo cual está directamente relacionado con los componentes de cada sistema celulolítico así como del tipo de sustrato utilizado durante la reacción de hidrólisis como lo señalan Baker y cols. (1998).

- Al probar las combinaciones entre los filtrados de cultivo que mostraron un mayor grado de sinergismo en un reactor en lote con agitación y los filtrados en forma individual al mismo tiempo; el efecto sinérgico se presentó de nuevo en todos los casos, pero el porcentaje de conversión del bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento, en azúcares solubles fue significativamente mayor para la relación volumétrica 40/60 entre los filtrados de cultivo de *Penicillium sp.* y *Aspergillus terreus* respectivamente debido a que se logró obtener un 42% mayor cantidad de azúcares reductores con respecto a la obtenida por el filtrado con mayor actividad celulolítica actuando en forma individual y aproximadamente un 12% de incremento en la velocidad y extensión de la sacarificación a la lograda con la suma teórica por la acción de cada celulasa por separado.
- Se evaluó el sistema celulolítico mixto en un volumen mayor de operación al utilizar un reactor en lote de 5 litros con agitación, manifestándose el mismo efecto complementario entre las actividades enzimáticas mejorando la eficiencia de hidrólisis, incrementando la producción de azúcares reductores del bagacillo de caña de azúcar con un 27.9% de conversión, lo cual, representa un aumento del 43% con respecto al filtrado de cultivo con mas alta actividad celulolítica al actuar en forma individual.

-
- Este efecto puede ser considerado como un sinergismo cruzado manifestado por 2 sistemas celulolíticos diferentes pero con actividades enzimáticas complementarias.
 - Aún no es posible intentar evaluar el sistema desarrollado ni otros similares a una escala mayor, con miras a desarrollar un bioproceso industrial económicamente atractivo, debido en parte a la baja velocidad de reacción, así como a la inversión requerida, hasta que se realicen cambios que lo hagan competitivo como podrían ser: el utilizar microorganismos celulolíticos con una mayor actividad, obtener sistemas enzimáticos con mayor actividad específica o bien, otras alternativas menos costosas para el pretratamiento de los materiales celulósicos.
 - Como señala Schwarz (2001), una opción viable sería contar con una formulación artificial obtenida por la combinación de celulasas la cual actúe efectivamente a bajas concentraciones durante una sacarificación enzimática.
 - Los materiales lignocelulósicos como el bagacillo de caña siguen representando un sustrato con gran potencial para su aprovechamiento, cambiando las estrategias biotecnológicas para lograrlo. También sería recomendable intentar otras posibilidades como el cultivo mixto entre microorganismos celulolíticos, desarrollar pretratamientos biológicos más eficientes, la fusión de protoplastos, la mutagénesis dirigida por técnicas de ingeniería genética para obtener híbridos productores de sistemas celulolíticos completos que resulten eficientes para sacarificar un material celulósico específico. Esto permitiría desarrollar bioprocesos integrales en los cuales la inversión sea menor con la finalidad de que resulten económicamente rentables.

6.0 BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, M.E. (1991). Evaluación de los parámetros físico-químicos que afectan la producción de celulasas y xilanasas por *Aureobasidium*. Tesis Maestría en Investigación Biomédica Básica, UACP y P del CCH-UNAM.
- Adney W.S., Ehrman C. I., Baker J.O., Thomas S.R., Himmel M.E. (1994). In: Himmel M.F., Baker J.O., Overend R. P., editors. Enzymatic conversion of biomass for fuels production. Washington, D.C.; American Chemical Society., 218-235.
- Andren R. K., Erickson R.J. and Medeiros J. E. (1976). *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6: 177.
- Araujo A. and D'Souza J. (1986). *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 1503-1509.
- Award M. and Lewis L.N. (1980). *J. Food Sci.* **45**, 1625-1628.
- Baker J.O., Ehrman C.I., Adney W.S., Thomas S.R., and Himmel M.E. (1998). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70**, 395-403.
- Bayer E. A., Morag E. and Lamed R. (1994). *Trends. Biotechnol.* **12**, 379-386.
- Béguin P. and Aubert J. P. (1994). *FEMS. Microbiology Reviews* **13**: 25-58.
- Beldman G., Voragen A. G. J., Rombouts F. M. and Pillnik W. (1988). *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 173-178.
- Bikales N. M.; Segal, L. (1971). In: *Cellulose and cellulase derivatives*, parts 4 and 5. Willey. N.York.
- Blanco A., Díaz P., Zueco J., Parascandola P., Pastr FIJ (1999). *Microbiology* **145**: 2163-2170.
- Brandt D. Hontz L. and Mandels M. (1973) *AIChE Symp. Ser.* 69 (**133**), 127-33.
- Burns D. S., Ooshima H. and Converse A .O. (1989). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **20/21**, 79.
- Canevascini G. and Gattlen C. (1981). *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 1573-1590.

- Carlite M. J. and Watkinson S. C. (1997). *The fungi*. Academic Press, New York, N. Y. p. 269-275.
- Chang M., Terry Y., Chou C. and Tsao G. T. (1981). *Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol.* **20**, 15-42.
- Chaudhary K. and Tauro P. (1982). *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 185-187.
- Chaudhary P., Kumar N. and Deobagkar D. (1997). *Biotechnol. Adv.* **15**, 315.
- Clarke J.A. (1997). *Biodegradation of Cellulose: Enzymology and Biotechnology* (Technomic Publ., EUA).
- Converse A. O. Kwarteng I. K., Grethlein H. E. and Ooshima H. (1989). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **20/21**, 63.
- Cowling E. B. and Kirk T. K. (1976). *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 14*; 95-123.
- Dale B. and Moreira (1982). *Fourth Symposium in Energy Production and Conservation*. Published by John Wiley & Sons.
- David C. and Thiry P. (1981). *European Polymer Journal* **17**, 957-960.
- Desphande, V., Eriksson K.-E. and Pettersson B. (1978). *Eur. J. Biochem.*, **90**, 191.
- Deubald A. and Crawford D. (1987). *Appl. Biotechnol. Microbiol. No. 26*, 158-163.
- Dewey O. and Bokless S. (1982). *Biotech. Bioeng.* **26**, 1047-1067.
- Doi R.H., Kosugi A., Murashima K., Tamaric y Han S. O. (2003). *J. Bacteriol.* **185**, 5907-5914.
- Domingues F. C., Queiroz J. M. S., Cabral J.M.S. and Fonseca L.P. (2001). *Biotechnol. Lett.* **23**, 771-775.
- Dunlop C. E., Thompson J. and Chiang L. C. (1976). *A.I. CH. E, Symp. Ser.* **72**, 58-63.

- Dwevedi C. P. and Ghose T. K. (1979). *J. Ferment. Tech.* **57**, 15.
- Eley M. and Clifford H. (1988). *Appl. Biotech. Bioeng.* **32**, 564-568.
- Enari T. M., Markkanen P., Korhonen E. (1975). In: *Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose*. Aulanko, Finland, 12-14 March 1975. SITRA, Helsinki., 171.
- Enari T. M., Niké-Paavola M.-L. and Nummi M. (1980). In: *Proceedings 2nd International Symposium on Bioconversion and Biochemical Engineering*. **1** (T. K. Ghose, ed.), IIT, Delhi, 87.
- Enari T. M. (1983). In: *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Edited by William M. Fogarty. Department of Industrial Microbiology., University College, Dublin; Ireland. Applied Science Publishers. LTD., 183-223.
- Enari T. M. and Niku-Paavola M. J. (1987). *CRC. Crit. Rev. Biotechnol.* **5**, 67-87.
- Eriksson K.-E. (1975). In: *Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose* (M. Bailey, T.-M. Enari and M. Linko, eds.). STTRA. Hellsinki, 263.
- Eriksson T., Borjesson J., Tjerneld F. (2002). *Enz. Microb. Technol.* **31**, 353-364.
- Estadísticas azucareras. (1989). Comisión Nacional de la Industria Azucarera. Unión Nacional de Productores de Azúcar S.P.P. MÉXICO.
- Fan L.; Young H. and Gharpuray S. (1989). *Adv. Biochem. Biotech.* **35**, 157-187.
- Fan L. T.; Lee Y. H. and Beardmore D. H. (1980). *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 177-199.
- Farkas V., Liskova M. and Biely P. (1985). *FEMS Microbiol. Lett.* **28**, 137-140.
- Focker, B.; Marzetti, A.; Sarto V., Beltrame P.L. and Carniti P. (1984). *J. Appl. Polym. Sci.* **29**, 3329.
- Fuchs K. P., Zverlov V. V., Velikodvorskaya G. A., Lottspeich F., Schwarz W. H. (2003). *Microbiol.* **149**, 1021-1031.
- Gallo B. J. (1978). *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **8**, 89-101.

- Gallo B. J. (1981). U.S. Patent No. 4, 275.
- García Kirchner O. (1983). Producción Microbiana de Celulasas y su Utilización en la Sacarificación de Materiales Celulósicos. Tesis Profesional de la Licenciatura en Q. F. B., Facultad de Química, UNAM.
- Gharpuray M. M., Lee Y. H., Fan L. T. (1983). *Biotechnol. Bioeng.* **25**; 157-172.
- Ghose T. K. and Das K. (1971). *Adv. Biochem. Eng.* **1**, 55-84.
- Ghose T. K. (1987). *Pure Appl. Chem.* **59**, 2, 257-268.
- Ghosh A., Al-Rabaii S., Ghosh B. K., Trimino-Vasquez H., Eveleigh D. E. and Montenecourt B. S. (1982). *Enz. Microb. Technol.* **4**, 110-113.
- Goksoyr J., Eidsa G., Eriksen J., Osmundsvag K. (1975). In: Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose. Aulanko, Finland, 12-14. March 1975. SITRA, Helsinki, 217.
- Goksoyr J. and Erikson J. (1980). In: *Microbial Enzymes and Bioconversions. Economic Microbiology* **5**, 285. Edited by A. H. Rose. Academic Press.
- Gould M. (1983). *Biotech.* **V**, 26.
- Goyal A.; Gosh B. and Eveleigh D. (1991). *Biores. Technol.* **36**, 37-50
- Gregg D., Saddler J.N. (1996). *Biotechnol. Bioeng.* **51**, 375-83.
- Gusakov A. V., Sinitsyn A. P. and Klyosov A. A. (1987). *Biotechnol. Bioeng.* **29**, 906.
- Gutiérrez-Correa M., Tengerdy R. P. (1997). *Biotechnol. Lett.* **19**, 665-7.
- Halliwel G. y Griffin M. (1973). *Biochem. J.* **135**, 587-594.
- Hannele K. & Siegler J. (1985). *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 411-414.

- Henrissat B., Driguez H., Viet C. and Shulein M. (1985). *Bio/Tech.* **3**, 722-726.
- Henrissat B., Terri T. T. and Warren A. J. (1998). *FEBS Lett.* **425**, 352-354.
- Huitrón C.; Saval S. and Acuña M. E. (1984). *Ann. N.Y. Ac. Sci.* **434**, 110.
- Mega T. & Matsushima Y. (1979). *J. Biochem.* **85**, 335.
- Memoria del II Seminario Nacional sobre la Agroindustria en México. Alternativas para el desarrollo agroindustrial. Tomo II. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México., marzo 1991.
- Irwin D. C., Spezio M., Walker L. P. and Wilson D. B. (1993). *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 1002-1013.
- Irwin D. C., Zhang S., Wilson D. B. (2000). *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1125-1132.
- Janshekar H. and Fietcher. (1989). *Adv. Biochem. Biotech.* **27**, 101-139.
- Joglekar A. V., Karanth N. G. and Srinivasan M. C. (1983). *Enz. Microb. Technol.* **5**, 25-29.
- Kanda T., Wakabayashi K. and Nisizawa K. (1980). *J. Biochem.* **87**, 1635-1639.
- Katz M. and Reese E. T. (1968). *Appl. Microbiol.* **16** (2), 419.
- Kim E., Irwin D.C., Walker L.P., Wilson D.B. (1998). *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 494-501.
- Kirk T.K., Connors W. J. and Zeikus J. G. (1977). In: *The structure. Biosynthesis and Degradation of Wood.* Loewus. F.A. y V.C. Runeckles (Ed). *Recent Adv. Phytochem.* Vol. II. Plenum Press. New York.
- Klyosov A. A. and Rabinovitch M. L. (1980). *Enzyme Engineering: Future Direction;* Wingar L.B., Berezin Z.V. and Klyosov A., eds., Plenum Press. New York.
- Knowles J., Lehtovaara P. y Teeri T. (1987). *Trends Biotechnol.* Vol. **5**, 255-261.

- Kosarik N., Ig D. C. M., Russell I. and Stewart G. C. (1980). *Adv. Appl. Microb.* **26**, 148.
- Kurakate M., Ooshima H. and Harano Y. (1991). *App. Bioch. Biotech.* **27**, 111-121.
- Lamed R., Setter E. and Bayer E. A. (1983). *J. Bacteriol.* **156**, 828-836.
- Larios G., Gilbón A., Lara Y. and Huitrón C. (1982). *Enz. Eng.* **6**, 353-354.
- Laser M., Schulman D., Allen S. G., Lichwa J., Antal M. J. and Lynd R. (2002). *Biores. Technol.* **81**, 33-44.
- Lathan M. J. and Wolin M. J. (1977). *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 297-301.
- Lee Y-H. and Fan L. T. (1980). *Adv. Bioch. Eng.* **18**. Springer, Berlin, Herdelberg N. Y., 101.
- Lin K. W., Ladich M. R., Voloch M., Patterson J. A. and Noller C. H. (1985). *Biotech. Bioeng.* **27**, 1427-1433.
- Linko M. (1977). *Adv. Biochem. Eng.* **5**, 25-48.
- Lowry J. O. H., Rosenbrough N. J., Farr R. L., and Randal R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lynd L. R. and Zhang Y. (2002). *Biotechnol. and Bioeng.* **77**, 467-475.
- Mandels M. and Reese E. T. (1957). *J. Bacteriol.* **73**, 269-278.
- Mandels M. and Weber J. (1969). *Adv. Chem. Series.* **95**, 391-414.
- Mandels M.; Weber J. and Parizek R. (1971). *Appl. Microbiol.* **21** (1), 152-154.
- Mandels M. (1975) *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **5**, 81-105.

- Mandels M. and Stenberg D. (1976). *J. Ferm. Tech.* **54**, 267-86.
- Mandels M. and Andreotti R.E. (1978). *Process. Biochem.* **13** (5), 6.
- Mandels M. (1982). *Annual Reports on Fermentation Process.* **5**, 2, 35-78. Edit. George T. Tsao. Academic Press.
- Manonmaui H. K. and Sreekantiah K. R. (1987). *Enzyme Microbiol. Technol.* **9**, 8, 484-488.
- Mega T. and Matsuhinia Y. (1979) *J. Bioch.* **85**, 335.
- Mc Neil M., Darvill A. G., Fry S. C., Albershein P. (1984). *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 625-663.
- Miller G. L. (1959). *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Millett M. A., Baker A. J. and Satter L. D. (1975). *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 5*, 21-33.
- Mohagheghi A. & Grohman K. (1988). *Appl. Biochem. Biotech.* **19**, 263-277.
- Montenecourt B.; Nhlapo S.; Trimiño-Vázquez H.; Cuskey S., Schamhart D. H. J. and Eveleigh D. (1981). In: "Trends in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals". (A. Hollander Edt.) Plenum Press., N.Y., 33-53.
- Montenecourt B. S. (1983) *Trends Biotechnol.* **5**, 156-161.
- Morozova E. S. (1975). In *Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose.* Aulanko, Finland 12-14 March. SITRA, Helsinki, 193.
- Mottet A., Thonart P. H. and Paquot M. (1979). *Hydrolyse enzymatique de la cellulose, une voie de développement possible. Commercialisation, Technologie et Utilisation du Bois de Peuplier.* Centre de Populiculture du Hainaut, comptes rendus du Colloque du 27 avril, 29-38.
- Nieves R. A., Ehrman C. I., Adney W. S., Elander R. T. and Himmel M. E. (1998). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 301-304.

- Norkrans B. (1950). *Physiol. Plant.* **3**, 75.
- Nystrom J. M. and Allen A. L. (1976). *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**, 55-74.
- Odelson D. A. and Breznak J. A. (1985). *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 622-626.
- Ohara H., Karita S., Kimura T., Sakka K., Ohmiya K. (2000). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 254-260.
- Ooshima H., Burns D. S. and Converse A. O. (1990) *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 446.
- Ozkan M. S., Desai G., Zhang Y., Stevenson D. M., Beane J., Guerinot M. L. and Lynd L. R. (2002). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 275-280.
- Paquot M. and Thonart P. H.. (1986). *Interferón y Biotecnología*, **3**, 2, 87-102.
- Persson I. Tjerneld F. and Hahn-Hägerdal H. (1991). *Process Biochemistry* **26**, 65-74.
- Pere J., Ellmen J., Gullichsen J. Viikari L. (1999). *Cellulases In: 27th EUCEPA conference, ATIP, Grenoble, France*, 39-42.
- Petterson L.G. (1975). *Proc. Symp. Enz. Hydrol. Cellulose*. Bailey, M. Enari, T.M. Linko, M., Eds. Finland., 255.
- Pettersson G., Fagerstam L., Bhikhabhai R. and Leandoer K. (1981). In: *The Ekman – Days International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, SPCI, Stockholm*, 111-39.
- Peterson A. (1987). *Fungal Enzymes*. 101-129.
- Pommier J-C., Fuentes J.-L., Goma G. (1989). Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry, part I: the basic laboratory work. *TAPPI (Tech. Asoc. Pulp. Pap. Ind.) J.* **72**, 187-191.
- Puri V. P.(1984). *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1219-1222.
- Reczey K., Brumbauer A., Bollok M., Szengyel Z. and Zacchi G. (1998). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70-72**, 225-235.

- Reese E. T. and Mandels M. (1980). *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 323.
- Rivero D.B. and Emert G.H. (1988). *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 278.
- Romero M.D., Aguado J., González L., Ladero M. (1999). *Enz. Microb. Technol.* **25**, 244-250.
- Ryu D. D. Y. and Mandels M. (1980). *Enz. Microb. Technol.* **2**, 91-102.
- Ryu D. D. Y., Lee S. B. Tassinari T. and Macy C. (1982). *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1047-1067.
- Saddler J. N. (1986). *Microbiological Sciences* **3**, 84-87.
- Saddler J. N. Nogan C. M., Louis-Seize G. and Yu E. K. C. (1984). In: *Proceedings of the 1st. Bioenergy specialist meeting on Biotechnology* (ed. S. Hasnain, J. Lamptey and M. Moo-Young). Waterloo: Waterloo University Press. 83-92
- Sattler W., Esterbauer H., Glatter O., Steiner W. (1989). *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 1121-1234.
- Scharffner C. and Toledo T. (1991). *Biotechnology and Bioeng.* **37**, 12-16.
- Shall I. and Brewil C. (1989). *Appl. Biochem. Eng. Biotechnol.* **38**, 53-84.
- Sheehan J. and Himmel M. (1999). *Biotechnol. Prog.* **15**, 817-827.
- Showhat Ali M. D., Akhand A. A., Gómez P. F. and Sarker R. I. (1993). *J. Bain Microbiol.* **33**, 3, 155-159.
- Schurz J. (1978) In: Ghose T.K. (ed). *Bioconversion of cellulosic substrates into Energy Chemicals and Microbial Protein. Symp. Proc. BERC II T. Delhi, New Delhi*, 37.
- Schwarz W. H. (2001). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 634-649.

- Sidhu M. S. and Sandhu D. K. (1985). *Exp. Mycol.* **9**, 1-8.
- Sinitsyn A. P., Gusakov A. V. and Vlasenko Y. E. (1991). *App. Bioch. Biotechnol.* **30**, 43-59.
- Srinivasan V. R. and Han Y. W. (1969). *Adv. in Chem. Ser.* **95**, 447-468.
- Stenberg D. (1976). *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 5*, 107.
- Stenberg D., Vijayakumar P. and Reese E. T. (1977). *Can. J. Microbiol.* **23**:139-197.
- Stevens B. J. H. and Payne J. (1977). *J. Gen. Microbiol.* **100**, 381-393.
- Stone J. E., Scallan A. M., Donefer E. and Ahlgren E. (1969). *Adv. Chem. Ser.* **95**, 219-241.
- Stork G., Pereira H., Wodd T. M., Dusterhoft E. M., Toft A., Puls J. (1995). *TAPPI (Tech. Assoc. Pulp. Pap. Ind.) J* **78**: 79-88.
- Stutzenberg F. (1972) *Appl. Microbiol.* **24**, 77.
- Taj-Aldeen S. J., Al-Habbeeb E. K. and Abdulla S. K. (1990). *Cryptogamic Botany* **2**, 25-29.
- Tanaka M. and Matsuno R. (1985). *Enzyme and Microbial Technology* **7**, 197-204.
- Tangnu S. K., Blanche H. W. and Wilke C. R. (1981). *Biotech. Bioeng.* **23**, 1837-1849.
- Teeri T.T., Reinikainen T., Ruohonen L., Jones T. A. and Knowles J. K. C. (1992). *J. Biotechnol.* **24**, 169.176.
- Terri T. T. (1997). *Trends Biotechnol.* **15**, 160-167.

- Teeri T. T., Koivula A., Linder M., Wohlfahrt G., Divne C. and Jones A. T. (1998). *Biochem. Soc. Trans.* **26**, 173-178.
- The Filamentous Fungi vol. **4**. Fungal Technology. Edited by: John E. Smith, David R. Berry, Bjorn Kristiansene. Edward Arnold (Publishers) LTD. 1983, 266-279 and 301-326.
- Toyama N. and Ogawa K. (1972). *Proc. IV 1FS. Ferment. Technol. Today, Soc. Ferment. Technol., Osaka.*, 743-757.
- Toyama N. (1976). In *Symposium on enzymatic conversion of cellulosic materials: Technology and Applications. Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 6*, John Wiley and Sons, New York., 207.
- Tsao G. T. (1978). *Proc. Biochem.* **12** (10), 12-14.
- Urbánszki K., Szakács G. and Tengerdy R. P. (2000). *Biotechnology Letters* **22**, 65-69.
- van Wyk J.P.H., Mogale M.A. and Seseng T.A. (2000). *Biotechnology Letters* **22**, 491-494.
- Vallander L. and Eriksson K. E. (1985). *Biotech. Bioeng.* **27**, 650-659.
- Waldron Jr C. R. and Eveleigh D. E. (1986). *App. Microb. Biotechnol.* **24**, 487-492.
- Walker L. P., Wilson D. B., Irwin D. C., Mc Quire C., Price M. (1992). *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1019-1026.
- Welmar P. J. and Watson W. M. (1985). *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 1540.
- Wilke C. R., Yang R. D. and Stockar von U. (1976). *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**, 155-176.
- Wilson J. R. and Mertens D. R. (1995). *Crop. Sci.* **35**, 251-259.
- Wood T. M. (1968). *Biochem. J.* **109**, 217-27.

- Wood T. M. (1969). *Biochem. J.* **115**: 457-464.
- Wood T. M. and Mc Crae S. I. (1975). Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose, 5, M. Bailey, T. M. Enari and T. M. Linko, eds., Helsinki, Finland., 111-37.
- Wood T.M. and Mc Crae S.I. (1977). *Carbohidr. Research Rev.* **57**, 117-133.
- Wood T.M. and Mc Crae S.I. (1977). In *Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy Chemicals and Microbiological Protein* (Edit by T.K. Ghose) 111, New Delhi.
- Wood T. M. and Mc Crae S. I. (1979). *Adv. Chem. Ser.* **181**, 181-209.
- Wood T. M. (1981). In: *The Ekman Days International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, SPCI, Stockholm, 111:31.
- Wood W. E., Neubauer D .G. and Stutzenberger F .J. (1984). *J. Bacteriol.* **160**, 1047-1054.
- Wood T.M., Mc Crae S. I. and Bhat K.M. (1989). *Biochem. J.* **260**, 37-43.
- Wood T.M. (1992). *Biochem. Soc. Trans.* **20**, 46-53.
- Woodward J., Lima M. and Lee N. E. (1988). *Biochem. J.* **255**, 895-899.
- Wright J. D., Wyman C. E. and Grohmann K. (1988). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **18**, 75-90.
- Zhang S., Wolfgang D.E., Wilson D.B. (1999). *Biotechnol. Bioeng.* **66**, 1, 35-41.
- Zhu Y. S., Wu Y. Q., Chen W., Tan C., Gao J. H., Fei J. X. and Shih C. N. (1982). *Enz. Microb. Technol.* **4**, 3-12.